

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação  
para *Alphavirus* em soros de eqüinos  
do Estado do Paraná.**

ROSÁRIA REGINA TESONI DE BARROS RICHARTZ

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná, para a obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Veterinárias.

CURITIBA

1994

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS INIBIDORES DE  
HEMAGLUTINAÇÃO PARA *ALPHAVIRUS* EM SOROS DE EQUÍNOS  
DO ESTADO DO PARANÁ**

Elaborada por

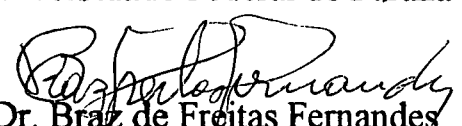
**ROSÁRIA REGINA TESONI DE BARROS RICHARTZ**

como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná

Comissão Examinadora:

  
Orientador: Dr. Yasuyoshi Hayashi  
Universidade Federal Paraná

  
Dr. Metry Bacila  
Universidade Federal do Paraná

  
Dr. Braz de Freitas Fernandes  
Universidade Federal do Paraná

**Ao Mauro "in memoriam" pelo amor e,  
aos meus filhos  
Maurício, Mariana e Marisa  
pelo amor, carinho e compreensão,  
razão de tudo.**

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir o presente trabalho desejo expressar meus sinceros agradecimentos a todas aquelas pessoas, que direta ou indiretamente, colaboraram para a sua realização.

Ao Professor Yasuyoshi Hayashi pela orientação, dedicação e confiança a nós dispensados.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, Ex-Coordenador do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, para quem não temos palavras que traduzam nossa gratidão por todo o incentivo, carinho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Antonio Felipe Wouk, Coordenador do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Ao meu Pai, Sogra, Irmãos e demais familiares, pelo carinho dedicado.

À amiga Dra. Sônia Maria Biesdorf, pelo apoio, ajuda e constante dedicação e incentivo.

Aos amigos Dra. Elza Maria Galvão Ciffoni e Prof. José Ricardo Pachaly, pelo incentivo, apoio e auxílio na realização do trabalho.

À diretoria do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelo estágio concedido na seção de vírus transmitidos por artrópodos e, em especial as Dras. Elza Nassar e Lisiex Coimbra, pela paciência, carinho e dedicação dos ensinamentos na parte de produção de insumos básicos, para a execução do trabalho.

À Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná, pela liberação concedida.

Aos veterinários de campo, da Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná.

Ao Dr. Dalmir Mexico Martins, Ex-Coordenador do Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti" e atual Diretor do Departamento de Fiscalização, da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná.

Aos funcionários do Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti".

Ao Sr. Jurandir Cabral pela dedicação e auxílio nos trabalhos de laboratório.

As funcionárias do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, em especial as Sras. Deleuse Cherobin, Tânia Mara Schrank e Sílvia W. Boscelmann pela dedicação e presteza constantes.

A Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão de bolsa de estudos.

## CONTEÚDO

I.	INTRODUÇÃO.....	01
II.	REVISÃO DA LITERATURA.....	05
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
	3.1. LOCALIZAÇÃO E ÉPOCA.....	41
	3.2. SORO SANGUÍNEO DE EQUÍNO.....	41
	3.3. SOLUÇÕES.....	41
	3.3.1. Soluções para colheita e lavagem de eritrócitos	42
	3.3.1.1. ACD(Ácido Cítrico-Citrato-Dextrose).....	42
	3.3.1.2. DGV(Dextrose-Gelatina-Veronal).....	42
	3.3.2. Soluções com pH específico.....	43
	3.3.2.1. Soluções estoque.....	43
	3.3.2.1.1. Cloreto de Sódio 1,5 M.....	43
	3.3.2.1.2. Fosfato de Sódio dibásico 2,0 M.....	43
	3.3.2.1.3. Fosfato de Sódio Monobásico 2,0 M....	43
	3.3.2.2. Soluções de trabalho.....	43
	3.3.2.2.1. NaCl 0,15 M-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M.....	43
	3.3.2.2.2. NaCl 0,15 M-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M.....	43
	3.3.3. Diluentes ajustados.....	44
	3.3.4. Diluentes dos antígenos e outros reagentes usados nos testes de HA e HI.....	44
	3.3.4.1. Soluções estoque.....	45
	3.3.4.1.1. Cloreto de Sódio 1,5 M.....	45
	3.3.4.1.2. Cloreto de Sódio 8,5%.....	45
	3.3.4.1.3. Ácido Bórico 0,5 M.....	45
	3.3.4.1.4. Hidróxido de Sódio 1 N.....	45
	3.3.4.1.5. Solução Salina-Borato(BS), pH 9,0....	45
	3.3.4.1.6. Albumina Bovina 4%.....	45
	3.3.4.1.7. PBS(Phosphate Buffer Saline) pH 7,2..	46
	3.3.4.1.8. Albumina Bovina 7,5%.....	46
	3.3.4.1.9. Sacarose 8,5%.....	46
	3.3.4.1.10. Solução de Antibióticos.....	46
	3.3.4.2. Diluentes de trabalho.....	47
	3.3.4.2.1. Cloreto de Sódio 0,85%.....	47
	3.3.4.2.2. Solução Salina-Borato-Albumina-Bovina (BABS) 0,4%, pH 9,0.....	47
	3.3.4.2.3. PBS/Albumina Bovina 0,75%.....	47
	3.3.4.2.4. Suspensão de Kaolin.....	47

3.4. PREPARO DO ANTÍGENO E SOROS IMUNES PARA O TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA).....	48
3.4.1. Obtenção de cérebro infectado.....	48
3.4.2. Obtenção de antígeno.....	49
3.4.3. Soros imunes.....	50
3.5. PREPARAÇÃO DE HEMÁCIAS DE GANSO.....	52
3.6. COLHEITA DE SANGUE EQUÍNO.....	54
3.7. TRATAMENTO DO SORO.....	54
3.7.1. Tratamento do soro com Kaolim.....	54
3.7.2. Adsorção de aglutininas.....	55
3.8. TESTE DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA).....	56
3.9. TESTE DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HI).....	58
4.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	60
4.2. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	60
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO FRENTE AO VÍRUS EEE.....	62
4.2. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO FRENTE AO VÍRUS WEE.....	64
4.3. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO FRENTE AO VÍRUS VEE.....	65
4.4. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO POR TÍTULO PARA O VÍRUS EEE.....	67
4.5. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO POR TÍTULO PARA O VÍRUS WEE.....	68
4.6. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO POR TÍTULO PARA O VÍRUS VEE.....	70
4.7. TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO, POR TIPOS DE REAÇÕES, PARA OS <i>Alphavirus</i> EEE, VEE E WEE.....	71
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>VII. RESUMO.....</b>	<b>86</b>
<b>VIII. SUMMARY.....</b>	<b>87</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. REBANHO EQUÍNO DO PARANÁ .....	01
2. CLASSIFICAÇÃO ANTIGÊNICA DOS <i>ALPHAVIRUS</i> .....	06
3. CONCENTRAÇÃO HIDROGÊNIONICA DE TAMPÕES FOSFATOS-NaCl....	44
4. AMOSTRAGEM DE SOROS ANALISADOS EM RELAÇÃO À INCIDÊNCIA DE ENCEFALOMIELEITE EQUÍNA NO ESTADO DO PARANÁ.....	61
5. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VIRUS EEE POR REGIÃO DO PARANÁ.....	63
6. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VIRUS WEE POR REGIÃO DO PARANA.....	64
7. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VIRUS VEE POR REGIÃO DO PARANÁ.....	66
8. RESULTADO DO TESTE DE HI POR TÍTULO PARA O VÍRUS EEE....	67
9. RESULTADO DO TESTE DE HI POR TÍTULO PARA O VÍRUS WEE....	69
10. RESULTADO DO TESTE DE HI POR TÍTULO PARA O VÍRUS VEE....	70
11. TIPOS DE REAÇÕES POSITIVAS NO TESTE HI POR REGIÃO.....	72
12. RESULTADO DO TESTE HI POR REAÇÃO ESPECÍFICA.....	73
13. RESULTADO DO TESTE HI POR REAÇÃO CRUZADA.....	74
14. RESULTADO DA SOROLOGIA POR NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, POR TIPO DE REAÇÃO E POR REGIÃO DO PARANÁ, 1991.....	77
15. RESULTADO DO TESTE HI, POR TÍTULO PARA OS <i>ALPHAVIRUS</i> EEE, VEE, WEE, PARANÁ. 1991.....	79
16. RESULTADO DA SOROLOGIA NO TESTE DE HI, POR TIPO DE REAÇÃO E POR REGIÃO DO ESTADO DO PARANÁ, 1991.....	80
17. RESULTADO DA SOROLOGIA (HI) NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA OS VIRUS DAS ENCEFALOMIELITES EQUINAS LESTE, OESTE E VENEZUELANA. PARANÁ, 1991.....	81



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fluxograma da preparação de antígeno viral da encefalomielite eqüina.....	51
2. Distribuição da população eqüina analisada no ano de 1991, no Estado do Paraná.....	62
3. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI frente ao vírus EEE por Região do Paraná.....	63
4. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI frente ao vírus WEE por Região do Paraná.....	65
5. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI do vírus VEE por Região do Paraná.....	66
6. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus EEE.....	68
7. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus WEE.....	69
8. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus VEE.....	71
9. Distribuição das reações ocorridas no teste HI por Região do Paraná.....	72
10. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI por número de amostras positivas, por tipo de vírus e por região.....	78
11. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para os <i>Alphavirus</i> EEE, VEE, WEE.....	79
12. Distribuição dos soros reagentes pelo teste de HI, aos vírus EEE, VEE, WEE. Paraná, 1991.....	82
13. Distribuição das regiões positivas aos <i>Alphavirus</i> EEE, VEE, WEE.....	82
14. Incidência de encefalomielites eqüinas leste, oeste e venezuelana no Paraná. 1991.....	83

## I. INTRODUÇÃO

O Estado do Paraná possui um rebanho eqüino de 444.259 cabeças. A região que concentra maior número de animais (Tab.1) é a de Guarapuava (GRP) 11,6%, seguida das regiões de Curitiba (CTA) 9,7%, Ponta Grossa (PGO) 9,6%, Umuarama (UMU) 8,8%, Irati (IRI) e Ivaiporã (IVP) 6,7% cada. Estas regiões perfazem 53% do total do rebanho. As demais regiões, compreendendo Cascavel (CSC), Cornélio Procópio (CRP), Francisco Beltrão (FNB), Jacarezinho (JZO), Londrina (LDA), Maringá (MGA), Paranaguá (PGA), Paranavaí (PVA), Pato Branco (PBC), Toledo (TOO) e União da Vitória (UVA), participam com percentuais menores, perfazendo os 47% restantes (IBGE, 1987).

TABELA 1. REBANHO EQÜINO DO PARANÁ.

NÚCLEO REGIONAL	NÚMERO DE CABEÇAS	%
CAMPO MOURÃO	28.326	6,4
CASCADEL	16.567	3,7
CORNÉLIO PROCÓPIO	15.254	3,4
CURITIBA	42.965	9,7
FRANCISCO BELTRÃO	13.761	3,1
GUARAPUAVA	51.480	11,6
IRATI	29.890	6,7
IVAIPORÃ	30.020	6,7
JACAREZINHO	26.371	6,0
LONDRINA	13.612	3,1
MARINGÁ	16.358	3,7
PARANAGUÁ	830	0,2
PARANAVAÍ	25.900	5,8
PATO BRANCO	16.382	3,7
PONTA GROSSA	42.767	9,6
TOLEDO	9.047	2,0
UMUARAMA	39.121	8,8
UNIÃO DA VITÓRIA	25.608	5,0
<b>TOTAL</b>	<b>444.259</b>	<b>100,0</b>

FONTE: IBGE 1987

Apesar do rebanho eqüino participar com apenas 0,5% do efetivo da pecuária paranaense (85.219.359 cabeças), sua importância é relevante, na medida em que desempenha papel fundamental na força de trabalho animal, nas pequenas propriedades rurais, com áreas entre 1 a 50 ha, e que 86% destas utilizam arados de tração animal na exploração agropecuária (IBGE, 1987; SEAB, 1992).

A partir de 1984, o Estado do Paraná implantou o Programa de Tração Animal, visando a melhoria do rebanho eqüino e das condições sócio-econômicas dos pequenos produtores rurais. Um acompanhamento sanitário dos animais destinados a esse tipo de exploração econômica tem sido realizado, incluindo a execução de exames laboratoriais de brucelose, leptospirose e anemia infecciosa eqüina (SEAB, 1984).

Outras doenças, porém, são importantes e deveriam ser avaliadas, tais como as encefalites eqüinas, causadas por arbovírus e que em estimativa moderada de custo com a doença, levada a efeito no Estado da Flórida, Estados Unidos da América (EUA), alcança mais de US\$ 1.000.000 por ano (WILSON et al., 1986).

Alguns arbovírus de diferentes famílias, gêneros e grupos sorológicos são capazes de determinar quadros clínicos característicos de encefalomielite no homem e em animais domésticos. Dentre os causadores de encefalomielites eqüinas estão os vírus da encefalomielite eqüina leste (EEE), da encefalomielite eqüina oeste (WEE) e da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE) (MONATH, 1981; PETERS & DALRYMPLE, 1990).

Nas encefalites eqüinas, o homem e os eqüídeos são hospedeiros acidentais e terminais na cadeia epidemiológica. A doença dissemina-se essencialmente devido ao ciclo que ocorre entre os animais reservatórios (aves e roedores silvestres) e os vetores (mosquitos) (ACHA & SZYFRES, 1986).

O Paraná contempla, entre outros estados do Brasil e países da América Latina, o roteiro migratório das aves silvestres *Netta paposaca* e *Anas versicolor*, *A. georgica*, *A. spinicauda*, *A. sibilatrix* e *A. platalea*. Estas aves são abundantes na Argentina e no Chile, onde nidificam, principalmente nas províncias centrais e do sul desses países, realizando deslocamentos até ao norte, cruzando o paralelo 25 de latitude sul e alojando-se na Bolívia, Paraguai e Brasil, no período de setembro a março (CEPANZO, 1982).

Como essas aves constituem-se em reservatórios naturais do vírus da encefalomielite, podem estar servindo como fonte na disseminação da doença para o homem e para os eqüídeos do Estado do Paraná.

No período de 1980 a 1990, o Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti", laboratório do Estado do Paraná, processou 685 amostras de cérebros eqüinos para diagnóstico de raiva, sendo que desse total, 129 amostras apresentaram resultados positivos e o restante negativos.

Esses resultados significaram que cerca de 80% das amostras encaminhadas ao Laboratório, ficaram sem diagnóstico diferencial, uma vez que foram negativas para raiva e, no histórico desses animais, a sintomatologia era compatível com encefalite.

No Estado de São Paulo, a análise de 150 amostras de cérebros eqüinos, recebidos para diagnóstico de raiva durante três anos, além de ter demonstrado um aumento percentual acentuado da raiva nessa espécie, reforçou a necessidade da execução do diagnóstico diferencial daquelas encefalites, indistinguíveis clinicamente, ou seja, a encefalite eqüina, a encefalite herpética e a raiva (KOTAIT et al., 1990).

Baseados nesses fatos, pretendeu-se avaliar a situação da encefalomielite no Paraná, através de levantamento sorológico em eqüinos, determinando-se anticorpos inibidores da hemaglutinação para os vírus leste (EEE), oeste (WEE) e venezuelano (VEE).

## II. REVISÃO DA LITERATURA

As encefalomielite eqüinas Leste (EEE), Oeste (WEE) e Venezuelana (VEE), são causadas por arbovírus pertencentes à família TOGAVIRIDAE, gênero *Alphavirus* e sorologicamente estão incluídos no Grupo A da classificação universal dos arbovírus. Os Togaviridae são vírus que possuem ácido ribonucleico (RNA), de fita simples e aspecto linear não segmentado. Apresentam coeficiente de sedimentação variando de 250-275 S (Svedberg), estáveis à faixa de pH de 6,0 à 9,0 . São sensíveis aos solventes lipídicos e aos detergentes iônicos e não-iônicos, sendo rapidamente inativados pela ação da radiação ultravioleta e pela temperatura de 56°C, mas são relativamente resistentes à tripsina.

Apresentam como estrutura um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica que está envolvido por um envelope, constituído por uma dupla membrana lipídica contendo duas glicoproteínas específicas para cada tipo viral, E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>. A glicoproteína E<sub>1</sub> funciona como hemaglutinina e a E<sub>2</sub> como indutora de anticorpos neutralizantes.

As partículas virais íntegras apresentam diâmetro de 50-65 nanômetros (nm). Possuem entre cinco a sete precursoras para as proteínas estruturais e não estruturais. Multiplicam-se no citoplasma das células hospedeiras, especialmente nas organelas citoplasmáticas. Possuem aglutininas capazes de aglutinar hemácias de ganso e antigenicamente são relacionadas entre si. A

classificação antigênica é mostrada na Tabela 2 (SHOPE & SATHER, 1979; JOKLIK, 1988; PETERS & DALRYMPLE, 1990).

TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO ANTIGÊNICA DOS ALPHAVIRUS.

Complexo Antigênico	Espécie(vírus)	Subtipo	Variedade
<i>Western equine encephalitis (WEE)</i>	<i>WEE</i>	vários	
	y 62-33		
	Highlands J(HJ)		
	Fort Morgan(FM)		
<i>Venezuelan equine encephalitis (VEE)</i>	<i>VEE</i>		
		Sindbis	Ockelbo
		Babanki	
		Kyzylagach	
		I	A-B
		I	C
		I	D
		I	E
		I	F
		II Everglades (EVE)	
		III Mucambo (MUC)	MUC Tonate 71D-1252
		IV Pixuma (PIX)	
<i>Eastern equine encephalitis (EEE)</i>	<i>EEE</i>		
		V Cabassou (CAB)	North America South America
		VI AG80-660	

FONTE: PETERS & DALRYMPLE, 1990.

O conhecimento da estrutura antigênica das glicoproteínas do envelope (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>) dos *Alphavirus* é importante para compreender a

enfermidade causada pelo vírus, a variação antigênica e a virulência.

Vários trabalhos foram desenvolvidos nessa área, com técnicas modernas de laboratório, como os de RÖHRIG et al.(1985, 1988) em que identificaram 12 epítomos na superfície da glicoproteína do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE), cepa vacinal TC-83, usando anticorpos monoclonais. Muitos desses anticorpos identificaram um domínio de neutralização crítica na glicoproteína E<sub>2</sub> do VEE. Anticorpos monoclonais específicos para epítomos agrupados ao redor do epítomo E<sub>2c</sub> foram eficientes neutralizadores do vírus desafio virulento. Anticorpos monoclonais específicos para epítomos distais desse domínio de neutralização crítico, falharam na neutralização da infectividade do vírus.

RICO-HESSE et al.(1988) relataram a produção de anticorpos monoclonais úteis na identificação das variedades enzoóticas do vírus VEE pelo teste de Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay). Usou-se esses anticorpos para investigar a relação antigênica de 11 vírus VEE associados com epizootias(IC) e focos endêmicos (ID) ao norte da América do Sul. Esses anticorpos diferenciaram nitidamente os isolamentos epizoóticos e enzoótico tão bem como distinguiram variações dentro da variedade ID. Um anticorpo definiu uma cripta antigênica situada sobre a glicoproteína E<sub>2</sub>.

STANICK et al.(1985) encontraram dois marcadores distintos para os subtipos I-D e I-E das cepas de vírus VEE. Um desses marcadores foi caracterizado pelo fato dos subtipos I-D e I-E



serem eluidos em frações distintas por cromatografia de hidroxilapatita, a pH 6,5. O segundo marcador foi obtido pelo ponto isoelétrico, das glicoproteínas do envelope E<sub>1</sub>, distinto que é para as duas variantes indicadas. Não houve diferença significativa no ponto isoelétrico da glicoproteína do envelope E<sub>2</sub>.

RICO-HESSE et al.(1988) estudaram o grau de variação genética, dentro de um grupo sorológico do vírus VEE, e o parentesco viral com outros antecessores isolados dentro do mesmo País, por análise genômica (Finger printing oligonucleotide). De 16 materiais isolados (RNA) pertencentes ao subtipo I, 12 mostraram grande grau de heterogeneidade, embora fossem indistinguíveis sorologicamente. Uma cepa enzoótica de referência da Colômbia mostrou mais parentesco genético para três cepas epizoóticas isoladas no mesmo País, que sua cepa protótipo do próprio sorogrupo isolada no Panamá. Assim, o parentesco genético dentre as cepas VEE na Colômbia parece ser uma função geográfica antes de epidemiológica.

YAMAMOTO et al.(1985) analisaram a atividade biológica das glicoproteínas dos Alphavirus, tendo isolado oito diferentes anticorpos monoclonais contra duas glicoproteínas do vírus WEE. Cinco de oito anticorpos monoclonais mostraram ser específicos para E<sub>1</sub> e três para a proteína E<sub>2</sub>, por ELISA e radioimunoprecipitação. Três dos cinco anti E<sub>1</sub> e todos os anticorpos monoclonais anti E<sub>2</sub>, inibiram a hemaglutinação por vírions purificados. Um anti E<sub>1</sub> e dois anti E<sub>2</sub> anticorpos monoclonais possuíam alta atividade vírus neutralizante.

CALISHER et al. (1988) reavaliaram o complexo antigênico do WEE, além de 14 vírus relacionados estreitamente com o WEE, para a cepa Fleming do vírus WEE. Todos os vírus foram testados cruzadamente por soro neutralização. Os resultados demonstraram que as cepas Mc Millan, R-43738, AG 80-646, Be AR 102091 e Y 62-33 são subtipos ou variedades do vírus WEE, cepa Fleming. Em razão dos resultados obtidos, CALISHER et al. (1988) lançaram a hipótese de que os pássaros, sendo os principais hospedeiros vertebrados para esses vírus, disseminariam os vírus norte e sul, de continente a continente. Vírus do complexo WEE, com menor diferença antigênica pode desenvolver-se em condições ecológicas discretas.

O conceito de grupos antigênicos dentro dos arbovírus foi estabelecido há muitos anos. Uma vez que o conceito é aceito, a questão que logicamente se apresenta é se a exposição prévia de um hospedeiro individual ou de um rebanho a um ou muitos vírus de um determinado grupo antigênico, poderia protegê-lo ou não num desafio subsequente com outros vírus do mesmo grupo. (CASALS & BROWN, 1954; CASALS, 1957; CASALS, 1963).

Há um número de relatos na literatura mostrando que animais experimentais podem ser protegidos em alguns graus contra infecção fatal por um arbovírus, por prévia imunização com outro agente imunologicamente relacionado. (CASALS & BROWN, 1954; CASALS, 1957; CASALS, 1963).

CUNHA (1942) estudou a imunidade cruzada entre os vírus EEE e WEE com o vírus BAÍÁ, isolado no Brasil, não observando qualquer imunidade cruzada entre eles. Cobaias vacinadas e

comprovadamente imunes aos vírus WEE e EEE morreram quando inoculadas com o vírus Baía e cobaias imunes ao vírus Baía morreram quando inoculadas com os vírus WEE e EEE.

Assim, proteção cruzada têm sido reportada entre Encefalite primavera-verão russa (RSSE) e vírus da doença de Louping (CASALS, 1944); entre Encefalite japonesa B (JBE) e Encefalite Murray Valley (MVE) (POND et al, 1955); entre JBE, MVE e Encefalite St Louis (HAMMON & SATHER, 1956); entre Sindbs e WEE (PARKS & PRICE, 1958).

Segundo CASALS (1963), proteção cruzada foi observada principalmente quanto mais estreitamente ligados os membros do grupo entre si, isto é, um contra o outro.

Para detectar tal imunidade cruzada, é necessário dar injeções repetidas de um agente sensibilizante, empregando uma via de inoculação periférica, ao contrário da via intracerebral para o vírus desafio.

Em outro estudo, como o relatado por PRICE (1956), a capacidade do vírus vacinal suprimir a viremia, induzida em animal experimental pelo agente desafio, foi usada como indicador de resistência.

A Fundação Rockefeller, segundo CASALS (1963) interessou-se, há muitos anos no estudo da resistência cruzada intra-grupos, em parte por proporcionar um meio adicional para a detecção do parentesco do grupo, mas principalmente por causa de sua sustentação na questão da imunização do grupo e suas possíveis implicações epidemiológicas. A questão levantada é como uma exposição anterior de uma população para um grupo de vírus

afetaria o resultado de uma epidemia devido a introdução de outro vírus do mesmo grupo.

Estudos de desafio cruzado com vírus do grupo A foram de particular interesse porque com, poucas exceções, esses vírus não mostram reação antigênica marcada pelos testes de neutralização (N), de fixação de complemento (FC) e de inibição da hemaglutinação (HI). O teste HI foi o que apresentou maior número de reações cruzadas entre os membros dos mesmo grupo, seguido do teste de FC e do teste de N, que mostrou ser o mais específico.

Apesar disso, no teste HI o título mais alto caracterizou a especificidade do vírus, quando soro de camundongo que foi imunizado com um vírus do grupo A foi desafiado com o mesmo antígeno (CASALS, 1963).

Os resultados relacionados aos testes desafio cruzado, obtidos por CASALS (1963) elucidam proteção marcada (cruzada) nos casos em que anticorpos do soro dos animais, em teste na hora do desafio, estavam com títulos baixos ou impossíveis de serem demonstrados.

No caso de aumento de resistência devido à vacinação cruzada no qual a reação imune seguindo desafio foi estudada, havia um aumento marcado na taxa dessa reação, levando a títulos mais altos que nos controles dentro do mesmo período de tempo e também por um aumento no número de antígenos com o qual os soros dos animais vacinados reagiram.

Verificou-se que dentro de um ou dois dias após desafio, a resposta imune manifestava-se no camundongo vacinado, na forma de

fase negativa, uma indicação talvez de que anticorpos circulantes estavam sendo retidos por combinação com o vírus desafio.

Contudo, não pode ser concluído que a resposta exagerada de anticorpos, detectada pelos testes HI e FC nos camundongos vacinados seguindo desafio, fosse a causa de sua resistência aumentada para esse desafio.

Essa resposta poderia ser devida a dois fatores, a resistência aumentada e os títulos mais altos de anticorpos, ambas manifestações concorrentes de um estado imune alterado. Entretanto, dado o fato de que anticorpos HI ou FC, ou ambos, podem às vezes, ser acompanhados por anticorpos N e o fato novo de que os anticorpos FC podem de certa maneira avaliar o progresso de uma infecção, pareceu ilógico concluir que, nesses casos descritos de taxa acelerada de desenvolvimento de reação cruzada, anticorpos heterólogos possam ser responsáveis ou possam contribuir para a sobrevivência dos animais vacinados desafiados.

Isso poderia acontecer se a taxa de invasibilidade ou de replicação do vírus desafio for baixa, em comparação com a taxa de desenvolvimento de anticorpos nos animais sensibilizados (CASALS, 1963).

Segundo CRANS & SCHULZE (1986), numa pesquisa em que evidenciaram o vetor epizoótico primário, *Coquillettidia perturbans* (Diptera:Culicidae), da EEE em cavalos, constataram um aumento de 64 vezes no título de amostras de soro, de um garanhão de 14 meses, num período de 24 horas, a partir do aparecimento dos sinais neurológicos, frente ao antígeno EEE.

Para estudar a duração dos anticorpos neutralizantes em pássaros infectados naturalmente com vírus EEE e WEE (cepa Highlands J), MAIN et al. (1988) examinaram, por um período de 12 anos, numa área pantanosa, no sudoeste de Massachusetts, 10.127 amostras de sangue originárias de 8.417 pássaros capturados em armadilhas, em três locais de estudo diferentes. Desse total, 1.227 aves, representando 20 espécies, foram recapturadas 2,7 vezes/ave e 2.937 amostras de sangue (2,4 por ave) foram colhidas.

Além de isolar o vírus EEE e WEE (HJ) de sete espécies de pássaros, foi observado, também, ser efêmera a duração de anticorpos neutralizantes detectáveis em algumas espécies dessas aves enquanto que em outras, eram extremamente longas.

Embora esses estudos tenham sido limitados a dois vírus, permitiram ilustrar o cuidado que se teve na interpretação dos levantamentos sorológicos. Por outro lado, as diferenças constatadas no tempo de neutralização dos anticorpos pelas distintas espécies de aves, parecem ser o resultado de condições fisiológicas inerente a cada espécie.

De conformidade com WILSON et al. (1986) foi elaborado um levantamento sobre encefalomielite eqüina leste, em cavalos da Flórida, EUA para avaliar o número de casos de encefalomielite, diagnosticados como EEE, por informações de veterinários, em que constataram que as informações recebidas foram 173% maiores que o número relatado, de casos confirmados, pelo laboratório (apenas 50% dos veterinários utilizam-se do laboratório para confirmação do diagnóstico da EEE).

A maioria dos animais afetados pela doença (78%) não possuíam histórico de vacinação e pareciam ser animais jovens, menores de três anos. Destacando-se que 67% dos veterinários recomendavam vacinação para esses animais.

Ainda no relato dos veterinários, 64% informaram que a maior incidência da doença estava associada com certos locais e suas práticas, normalmente perto de fonte de água, como rios ou pântanos.

WALTON et al.(1989), para observarem a imunidade protetora cruzada entre vírus da encefalomielite em eqüideo (pônei, cavalo, burros, mulas) inocularam 18 eqüideo com vírus EEE e 18 com vírus WEE. Desses animais, 12 eqüideo sôro-positivos para vírus EEE e 15 sôro-positivos para o vírus WEE sobreviveram, além de 10 não imunizados, sôro-negativos, que foram utilizados para controle. Todos esses animais foram desafiados com uma cepa patogênica de vírus VEE, para determinar imunidade protetora cruzada.

A infecção desafio produziu 90% de mortalidade nos controles, ou seja, nos eqüideo não imunizados, 40% de mortalidade nos eqüideo sôro-positivos WEE e enquanto que todos os eqüideo sôro-positivos para EEE sobreviveram.

As respostas de anticorpos neutralizantes em placa para vírus VEE em eqüideo sôro-positivos para EEE e WEE, foram similares em tempo de início e título para resposta de anticorpos dos eqüideo não imunizados.

Anticorpos neutralizantes para o vírus EEE ou WEE foram detectáveis em 19 dos 27 animais após inoculação com o vírus

desafio VEE.

Os burros e mulas foram mais resistentes para os efeitos letais da infecção com os vírus VEE ou EEE do que foram os pôneis e cavalos, embora a doença clínica severa tenha se desenvolvido em alguns desses eqüideo. Essa resistência sugere que pôneis e cavalos, burros e mulas não são igualmente suscetíveis à infecção com os vírus da encefalomielite eqüina.

Após a infecção primária, o perfil de anticorpos neutralizantes de eqüideo inoculados com vírus VEE e WEE desenvolveu-se como esperado, para vírus homólogos e heterólogos. Entretanto, baixa concentração de anticorpos neutralizantes heterólogos, para vírus VEE e WEE, foram produzidos em eqüideo inoculados com vírus EEE após infecção primária, e para vírus EEE em eqüideo inoculados com vírus WEE, após desafio de imunidade com vírus VEE.

Embora anticorpos neutralizantes para vírus VEE e WEE não foram detectados antes do começo do estudo, algumas exposições prévias à *Alphavirus* relacionados, pode ter ocorrido.

Resposta de anticorpos heterólogos, após exposição para dois tipos de vírus da encefalomielite, foi relatado por BYRNE (1964).

Embora os resultados das observações de campo não controladas durante a epizootia de VEE, ocorrida no Texas, em 1971, indicavam pequena proteção cruzada em eqüideo de anticorpos neutralizantes WEE e EEE, estudos de laboratório com espécies de campo mostravam a possibilidade da ocorrência de proteções cruzadas (CALISHER & MANESS, 1975).



## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial de encefalomielite eqüina é levado a efeito através da detecção de antígenos virais de espécimes colhidos de animais mortos ou sacrificados. Para tanto utiliza-se as técnicas de imunofluorescência, ou de isolamento de vírus. O isolamento do vírus é feito a partir da inoculação, em sistemas apropriados (camundongos recém nascidos ou cultivos celulares), de sangue total, ou soro ou de preparações apropriadas de fragmentos do sistema nervoso central. A identificação é feita através dos testes de fixação de complemento (FC) e imunofluorescência e, finalmente, através de sorologia em que se usa rotineiramente duas amostras de soro, uma na fase aguda da doença e outra no período de convalescência dos animais sobreviventes. Os testes mais usados são a inibição da hemaglutinação (HI), neutralização (N) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992.

Segundo MEHSEEN JOSEPH (1970) o diagnóstico sorológico é um teste indireto no qual o nível (título) de anticorpo no soro de um paciente é determinado para um vírus específico.

Os testes mais usados para este propósito são: Neutralização (N), Inibição da Hemaglutinação (HI) e Fixação do Complemento (FC).

Como regra geral, anticorpos fixadores de complemento aparecem mais tarde que anticorpos neutralizantes e inibidores da hemaglutinação, seu título no pico da infecção sendo baixo, não persistindo por muito tempo.

Portanto, anticorpos fixadores do complemento são normalmente indicativos de infecção recente.

A reação sorológica serve para dois importantes propósitos em virologia:

1- Confirmar que o vírus isolado é o agente etiológico e não um vírus latente ou um " Carrier strain ".

2- Estabelecer uma etiologia por meio do aumento no título de anticorpos, na ausência de isolamento do vírus.

SOUTHAM & GREENE (1958) ao estudarem comparativamente três técnicas para a detecção de anticorpos de *Alphavirus*, a inibição da hemaglutinação (HI), a fixação do complemento (FC) e a neutralização (N), observaram que através do aumento no título de anticorpos, nessas técnicas, seria praticável suas utilizações para diagnóstico ou trabalhos de levantamentos sorológicos.

A técnica da HI detectou anticorpos no soro mais cedo do que a fixação de complemento ou a neutralização. Foi demonstrado o contínuo crescimento no título durante a segunda semana, o qual poderia permitir um diagnóstico sorológico baseado nesse crescimento de título entre soros da fase aguda e convalescente da doença.

A persistência dos anticorpos por períodos longos, pelo menos 6 meses e o aparecimento de título em soros em que a infecção não foi induzida, faz com que a técnica seja aplicada a estudos epidemiológicos.

CALISHER et al. (1981) relataram que soros colhidos para diagnóstico ou levantamento sorológico de arbovírus podem dar evidência presuntiva da infecção com um subtipo viral específico.

Em análise epidemiológica, isto é algumas vezes útil para definir o agente etiológico específico, obtendo uma resposta de anticorpos.

Testes de sorologia diferencial podem ser usado para determinar presuntivamente o subtipo infectante.

Quando testes de fixação do complemento (FC) ou anticorpos fluorescentes indicam que o vírus está relacionado com o complexo Alphavirus VEE, WEE, EEE ou para vírus do sorogrupo Bunyamwera ou Califórnia, estudos adicionais devem ser executados para identificar o vírus, subtipo ou variedade.

Segundo CALISHER et al.(1983), o diagnóstico de infecção em eqüinos causado por vírus WEE freqüentemente é feito na base da combinação dos achados epidemiológicos e clínicos. A confirmação sorológica de tal infecção geralmente é difícil devido a necessidade de avaliar amostras de soros pareados, ou é impossível devido a morte do animal infectado.

Os testes HI, FC e N de uma única amostra de soro de cavalo na fase aguda da doença causada pelo vírus WEE, pode ser usado para dar evidência presuntiva para infecção com vírus WEE.

Contudo, anticorpos HI e N contra vírus WEE podem persistir por anos. São produzidos após vacinação com WEE ou WEE/VEE vacina bivalente e em potros podem ser encontrados como consequência da imunidade materna (colostro). Portanto, uma simples amostra não deve ser usada para fazer um sorodiagnóstico confirmativo para infecção com vírus WEE, usando os testes HI, FC e N.

Cavalos infectados experimentalmente (SPONSELLER, 1966) ou naturalmente (CALISHER, 1983; MANESS, 1981) com vírus WEE ou EEE

não produzem anticorpos neutralizantes ou HI do 5° ao 10° dia após infecção. Anticorpos circulantes aparecem no dia ou próximo do início da doença clínica, quando o tempo de viremia diminui para níveis mínimos detectáveis.

Com isso, o isolamento do vírus WEE ou EEE do soro é menos provável e, o diagnóstico do WEE, EEE na base da detecção de anticorpos HI, FC e N seria presuntivo.

GIBBS *et al.* (1988) estudaram a imunidade passiva e a vacinação de potros contra encefalite eqüina leste na Flórida, EUA, observando que as éguas vacinadas aproximadamente três semanas antes do parto, geralmente tinham títulos de HI para vírus EEE de 40 a 160, no parto. Amostras de colostro tiveram valores similares e o título do potro com um dia de idade refletiu claramente o título colostrado.

Por analogia, o título do soro de uma égua foi um indicador do título da imunidade passiva adquirida pelo potro.

O título de anticorpos derivados do colostro em potros diminuiu progressivamente. Aos dois meses de idade 23% dos potros estudados tiveram os títulos inferiores a 10, no teste de HI.

Na primeira vacinação, com três meses, 50% dos potros tinham títulos de anticorpos menores que 10, no teste de HI. Aos quatro meses, antes da segunda vacinação, todos aqueles potros vacinados tinham anticorpos detectáveis.

A administração da segunda dose de vacina não induziu necessariamente a um aumento de anticorpos detectáveis, mas a maioria dos potros estudados (90%) manteve ou atingiu um título de anticorpos maior que 40, no teste HI.

Após a terceira vacinação, aos 10 meses de idade, o título tinha caído para menos do que 20 (HI). A vacinação, nessa idade, resulta em resposta anamnésica.

Aos 11 meses, os títulos foram geralmente mais altos (moda 80) que aqueles seguidos da vacinação aos quatro meses (moda 40).

Anticorpos HI para WEE seguiram uma tendência similar ao obtido para EEE.

Recomendou-se nas áreas de alto risco da Flórida, vacinar os potros aos três, quatro e cinco meses de idade e depois bianualmente.

Segundo HETRICK et al. (1960) os resultados dos testes sorológicos em quatro cavalos infectados experimentalmente com vírus EEE, mostraram o aparecimento de anticorpos HI detectáveis no quinto dia após a inoculação (títulos de 10, 20, 20, 40 respectivamente). Anticorpos neutralizantes apareceram entre o 7° e 14° dia após a inoculação ( p.i. ).

Os títulos de HI do 7° dia mostraram aumento de duas vezes ou mais sobre aqueles do 5° dia e os do 14° dia alcançaram seus valores máximos (1280, 320, 320, 320 respectivamente). Após esse dia, os títulos começaram a declinar e mesmo em baixos níveis foram detectáveis até um ano (40, 160) após a inoculação.

Em contrapartida, os anticorpos neutralizantes alcançaram valores máximos meses após a inoculação e mantiveram-se nesses níveis por pelo menos um ano (3,6; 2,7; 2,3; 3,2).

A medida de anticorpos HI variou de acordo com as unidades de antígeno empregadas nos testes, sendo maiores com duas unidades (320) em comparação a quatro unidades (160) e oito

unidades (80) ou 160, 80 e 40 respectivamente.

## **EPIDEMIOLOGIA**

Os vírus das encefalomiелites eqüinas leste, oeste e venezuelana se mantêm na natureza através de ciclos bem definidos, onde os vetores são constituídos de diversas espécies de mosquitos e de várias espécies de vertebrados silvestres que atuam como hospedeiros.

As aves silvestres são os principais hospedeiros dos vírus EEE e WEE, amplificando ou disseminando esses vírus, enquanto os roedores silvestres o são para o vírus VEE.

O homem e os eqüideo são hospedeiros acidentais desses vírus, infectando-se ao penetrarem em seus nichos ecológicos.

Os ciclos de transmissão desses vírus podem ser classificados de duas formas, o ciclo silvestre e o ciclo urbano. No ciclo silvestre os hospedeiros primários, aves e roedores, se infectam nas florestas onde coabitam os vetores potenciais. Várias espécies de mosquitos, da família *Culicidae*, podem servir como transmissores, especialmente os do gênero *Culex*, sendo esses vetores chamados de enzoóticos. No outro ciclo, urbano, peri-urbano e rural, os eqüideo são os principais hospedeiros vertebrados para os três vírus. Geralmente, outras espécies de mosquitos estão envolvidos na transmissão da doença. São mosquitos domiciliares ou que habitam o peri-domicílio. Neste caso são chamados de vetores epizoóticos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1992).

O vetor principal do vírus WEE no oeste dos EUA é o *Culex tarsalis*, porém o *Aedes dorsalis*, pode funcionar como transmissor em áreas onde é predominante. O ciclo básico da infecção é mantido pela transmissão da ave virêmica à ave suscetível, por meio dos vetores que podem infectar o homem ou o eqüideo, ocasionando ou não a doença clínica. No leste dos EUA, o vetor principal passa a ser o *Culiseta melanura*, transmitindo a infecção entre as aves silvestres e raramente aos eqüideo.

Geralmente um surto epizoótico precede de uma a mais semanas os casos humanos, devendo isto servir como alerta às autoridades em Saúde Pública, para providenciarem medidas de controle. (ACHA & SZYFRES, 1986)

No leste dos EUA, o ciclo básico da infecção da EEE desenvolve-se entre aves silvestres e mosquitos (*Culiseta melanura*). O vírus da EEE tem sido isolado de sangue de grande número de espécies de aves silvestres, tanto residentes como migratórias. Quando o vírus escapa de seus focos naturais endêmicos a outras áreas adjacentes, origina-se um novo ciclo entre os pássaros e os mosquitos locais.

Na costa Atlântica dos EUA, atribui-se ao *Aedes sollicitans* um papel importante como vetor da EEE. Abundante em água salobre, alimenta-se de sangue de aves, de eqüideo e do homem. Acredita-se que o *A. sollicitans* é o principal vetor da encefalomielite eqüina durante os surtos nas populações humanas e eqüinas.

Um estudo sobre as fontes de alimentação de mosquitos no sudoeste de Massachussetts, sugere que *Coquilletidia perturbans*, *Aedes canadensise* e *A. vexans* poderiam ser vetores de vírus para

eqúideo e homem (ACHA & SZYFRES, 1986).

Nos países tropicais das Américas, os vetores principais parecem ser *Culex nigripalpus*, *C. teniopus*, *Aedes taeniorhynchus* entre outros.

Na Venezuela, obteve-se múltiplos isolamentos do vírus de mosquitos *C. panacossa* e *C. dunnii* em um período interepizootico (WALDER et al., 1984).

STAMM (1958) observou o envolvimento de espécies de aves como o pardal inglês e o pombo doméstico, no ciclo silvestre endêmico do vírus EEE.

No Norte do Brasil, na região de Belém, a EEE é enzoótica na selva úmida, porém, não se tem esclarecido o ciclo básico desse vírus (ACHA & SZYFRES, 1986).

Os focos naturais da infecção enzoótica por VEE encontram-se nas selvas úmidas da América tropical e em regiões pantanosas. O ciclo de infecção se desenvolve entre roedores, como os gêneros *Sigmodon*, *Proechimys*, *Peromyscus* e *Oryzomys* e também marsupiais que são os reservatórios principais e mosquitos de várias espécies de *Culex (melanoconion)*, que servem de vetores para transmitir a infecção de animais virêmicos aos suscetíveis.

O vírus epizootico depende dos eqúideo como hospedeiros primários. A circulação do vírus ocorre através de mosquitos equinófilos, transmitindo a infecção de um eqúideo virêmico a outro suscetível, como também ao homem e a outros vertebrados (ACHA & SZYFRES, 1986).

ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ENCEFALOMIELEITE EQUINA VENEZUELANA (VEE).



Em 1938, KUBES & RIOS isolaram o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE) do cérebro de um cavalo proveniente do deserto da península da Guajira, na Venezuela.

CAUSEY et al.(1954) isolaram de um macaco (*Cebus*) sentinela o vírus BeAn 8, como uma cepa do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE), no Brasil.

SHOPE et al.(1964) fizeram a diferenciação desse vírus e o classificaram como Mucambo, um subtipo do VEE.

Na Colômbia, durante uma epizootemia ocorrida em 1967, isolou se o vírus VEE de cavalos, de soro humanos, de víscera de mamíferos marsupiais, quirópteros, carnívoros e roedores. Artrópodos hematófagos mais comuns ao isolamento foram *Simulium* (*S. exiguum*, *S. metallicum*, *S. callidum*) e o mosquito *Aedes sexlineatus* (CEPANZO, 1967).

No estudo de arbovírus na floresta de Bush Bush, em Trinidad, no período de setembro de 1959 a dezembro de 1964, o vírus VEE foi encontrado em quase todo o período de estudo, exceto em 1964. De 262 cepas descobertas, 68 foram de famílias de animais sentinelas, 32 roedores, 161 mosquitos e um de marsupial (*Marmosa mitis*). O *Culex portesi* foi o responsável por 103 dos 161 isolamentos do VEE em mosquitos. O roedor mais importante do isolamento foi o *Oryzomys laticeps* (14/32). Em famílias de camundongos sentinelas, foi encontrado o vírus em maior quantidade (63/68) ( JONKERS et al. 1968).

WONG CHIA & SCHERER (1971) isolaram o vírus VEE de um morcego frugívoro, *Artibeus turpis*, no México e detectaram sua importância como fonte de vírus para vetores mosquitos, homem e

eqüinos em sua fase virêmica.

SOUZA-LOPES & SACCHETTA (1978) durante uma vigilância epidemiológica efetuada em certas áreas florestais do Estado de São Paulo, Brasil, verificaram a introdução de um Alphavirus pertencente ao complexo do vírus da encefalomielite eqüina venezuelana e identificaram como sendo uma amostra do vírus mucambo, sendo esta a primeira vez que foi assinalada a presença de um membro do citado complexo no Sudoeste do País. Essa introdução foi detectada através do isolamento do agente e pela presença de anticorpos na população local, bem como em aves e mamíferos silvestres.

O vírus mucambo foi considerado como amostra endêmica do complexo viral da VEE, pois não foram observados quadros clínicos evidentes em cavalos e no homem.

Relatou-se ainda, o papel das aves silvestres na introdução desse vírus, importante como agente patogênico para o homem e animais domésticos.

#### ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ENCEFALOMIELEITE EQÜINA LESTE (EEE).

TEN BROEK & MERRIL (1933) isolaram, na costa leste dos Estados Unidos, de eqüinos com encefalomielite, um vírus que foi denominado tipo leste (EEE).

No Brasil, DUPONT<sup>1</sup> (1913) observou em eqüinos do Estado do Paraná, sinais de encefalite nos animais chamando-a de "peste de

---

<sup>1</sup>Dupont, O. Moléstia de Borna? Rev. Zoot. Vet., 5:198-201, 1915 citado por WIGG;M.D.Isolamento de uma amostra de vírus WEE em *Haemagogus Janthinomys*.Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia da UFRJ visando à obtenção do grau de mestre em ciências biológicas (Microbiologia).Universidade Federal do Rio de Janeiro.Rio de Janeiro. 1977.

cegar" e relatou que os carroceiros sofriam importantes perdas desde 1895.

Em 1915, DUPONT, citado por WIGG, voltava a observar casos de doença denominando-a como "moléstia de Borna" e realizava tentativas infrutíferas de isolamento, em laboratório, de seu agente causal.

Em 1937, CARNEIRO, de um surto em cavalos com sintomatologia nervosa, ocorrido em Tatui, São Paulo, isolou pela primeira vez, o vírus da encefalomielite eqüina leste, tendo concluído que o mesmo não se relacionava com o vírus da "doença de Borna". Seguiram-se os isolamentos desse vírus por CUNHA (1943) em Pernambuco; SANTOS et al.(1946) no Rio de Janeiro; ALICE (1951) na Bahia; NILSSON & SUGAY (1962) em Itaporanga, São Paulo.

Isolamento do vírus de outras espécies foram efetuados e CHAMBERLAIN et al. (1938) e PAGAC et al. (1992) relataram o isolamento do vírus EEE do mosquito, *Culiseta melanura* (Coquillett).

WALDER et al.(1984) isolaram o vírus EEE e cepas ID de VEE de mosquitos, na maioria das vezes *Culex (melanoconion) spp* e hamsters sentinelas, na região de Catatumbo, Venezuela.

SOLER NODARSE et al.(1985) obtiveram isolamento do vírus EEE de uma pomba ( *Columba livia domestica* ) durante um surto epizootico em pombas, ocorrido no final de 1970, na colina universitária da cidade de Havana, Cuba.

TULLY et al.(1992) diagnosticaram o vírus EEE em um lote de avestruz em Lousiana, EUA.

MITCHEL et al.(1992) relataram o isolamento de 14 cepas do

vírus EEE do mosquito *Aedes albopictus* coletados em Polk, Flórida, EUA, na realidade o primeiro isolamento de um arbovírus de importância veterinária e de saúde pública.

NASCI et al.(1993), durante uma epizootia de EEE ocorrida em cavalos em Ohio, EUA, isolaram o vírus de cavalos e mosquitos.

#### ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ENCEFALOMIELETTE EQUINA OESTE (WEE).

O vírus da encefalomielite eqüina oeste (WEE) foi isolado pela primeira vez, a partir de cérebro de cavalo, durante uma epizootia em eqüinos no grande vale central da Califórnia, EUA , em 1930 (MEYER et al. 1931).

O vírus da Encefalomielite Eqüina Oeste (WEE), foi isolado pela primeira vez no Brasil por BRUNO LOBO et al.(1961) como uma amostra de vírus sorologicamente relacionada ao grupo WEE/Sindbis (Amostra nº 1257), a partir de um cavalo doente do Jôquei Clube do Rio de Janeiro e que veio a morrer.

WIGG (1977) isolou, pela primeira vez no Brasil, o vírus WEE do mosquito do gênero *Haemagogus janthinomys*, no município de Linhares , Estado do Espírito Santo, Brasil.

CALISHER et al.(1985) numa investigação sobre arbovírus na Argentina, no período de 1977 a 1980, identificaram e caracterizaram novos subtipos de WEE e VEE (subtipo VI) a partir de mosquitos *Culex (melanoconion)*, não sendo associados com a doença em eqüinos.

REISEN et al.(1990) estudaram a persistência de arbovírus no período de 1983 a 1988, em Kern, Califórnia, EUA. O vírus WEE

foi isolado com frequência durante 1983 dos mosquitos *Culex tarsalis* e *Aedes melanoconion* e também detectado por soroconversão em frangos sentinelas.

SMITH et al.(1993) isolaram o vírus WEE de mosquitos *Culex tarsalis*, *Coquillett* e *Cx. pipiens*, de uma epizootia ocorrida em 1987 e uma enzootia no ano de 1991, no Colorado, EUA.

VASCONCELOS et al.(1991) isolaram, na Amazônia Brasileira, os vírus WEE e EEE de aves silvestres, especialmente de espécies pertencentes à família Formicariidae confirmando o importante papel desempenhado por essas aves como hospedeiros vertebrados primários desses vírus. Segundo os mesmos autores, para o vírus Mucambo (subtipo III do vírus VEE), os roedores constituem os principais hospedeiros vertebrados, com duas espécies importantes, *Oryzomys capito* e *Proechmys guyannensis*. Por outro lado, roedores, marsupiais e répteis têm sido encontrado infectados com EEE, WEE e VEE podendo desempenhar papel secundário na manutenção e na disseminação desses vírus.

#### DOENÇA NO HOMEM

Na WEE, a doença normalmente começa com sintomas inespecíficos e generalizados de febre, dor de cabeça, mal estar e dores, por um período de um a quatro dias. Sonolência e letargia, fotofobia, vômitos e rigidez da nuca, sinal de infecção neurológica, edindo muitas vezes rapidamente para torpor, coma e em altas proporções, convulsão em crianças . Paresia, tremores e reflexos anormais podem estar presentes. Em casos fatais, os

pacientes morrem após um ou dois dias do desenvolvimento do coma. A recuperação muitas vezes começa, repentinamente e progride rapidamente. Cerca de um terço das crianças sobreviventes sofrem retardamento, dano cerebelar e paralisia espástica (CHERRY, J.D, 1987). Adultos podem ter uma síndrome convalescente prolongada de astenia e queixas neuropsiquiátricas. Infecções congênitas são documentadas e resultam em deterioração neurológica severa e progressiva (MONATH, 1988).

Na EEE, a doença é mais aguda e progride mais rapidamente que as outras encefalites arbovirais. O início é abrupto com febre alta, vômito, sonolência, torpor, coma, mioclonia e convulsões aparecendo dentro de 24 a 48 horas. Sialorréia pode aparecer e dificuldade respiratória e cianose são freqüentes. Uma característica curiosa da doença em criança é o edema facial, periorbital ou generalizado. A morte normalmente ocorre na primeira semana. Nos pacientes sobreviventes, a recuperação inicia-se na segunda semana e pode progredir rapidamente. As sequelas nesses pacientes são muitas vezes severas, principalmente em crianças, com alta mortalidade e sequelas, caracterizadas por retardamento, paralisia espástica e atrofia de substância cerebral ( CHERRY, J.D., 1987, MONATH, 1988).

PRZELOMSKI *et al.* (1988) observaram uma aumento na frequência de EEE em pessoas adultas, enquanto, no passado, era considerada uma doença de crianças.

Na VEE, o período de incubação é de dois a cinco dias. O início é repentino, com febre, calafrios, mal estar generalizado e dor de cabeça, seguidos de mialgia, náusea, vômito e

ocasionalmente, diarréia. Os sintomas agudos generalizados diminuem em quatro a seis dias. Uma síndrome de fadiga convalescente pode seguir até três semanas. Um curso bifásico tem algumas vezes sido observado, com os sintomas agudos reaparecendo após uma rápida remissão, dentro de uma semana após ter iniciado. Evidência do envolvimento de sistema nervoso central (fotofobia, sonolência, confusão) pode estar presente. A encefalite severa desenvolve-se em pequenas proporções naqueles pacientes infectados, principalmente em crianças e, é caracterizado por sinais nas meninges, convulsões, tremor, torpor, coma, paralisia espástica, reflexos anormais, paralisia do nervo cranial, e insuficiência respiratória central. Problemas neurológicos residuais (sequelas) ocorrem naqueles casos severos. Infecção adquirida durante o primeiro e segundo trimestre de gravidez pode resultar em encefalite fetal e morte (CHERRY, J.D., 1987; MONATH, 1988; BELLARD et al. , 1989).

#### DOENÇA NOS ANIMAIS

O vírus da WEE têm muitos hospedeiros mas só manifesta-se clinicamente nos eqüídeo (ACHA & SZYFRES, 1986). O período de incubação dura de uma a três semanas. A febre é a única manifestação clínica antes do aparecimento dos sinais nervosos. Quando estes surgem, a viremia e a febre desaparecem. Os principais sinais são inquietude, andar irregular, incoordenação e sonolência. O animal enfermo investe contra qualquer obstáculo, caminha em círculos e perde todo o sentido de orientação. Durante

a fase letárgica, é comum que o animal fique imóvel, com a cabeça apoiada sobre qualquer lugar ou objeto. Finalmente, na fase paralítica, o animal é incapaz de levantar-se quando cai, tem flacidez do lábio inferior e tem dificuldade de deglutição. A morte pode ocorrer em um ou dois dias, após o aparecimento dos sinais nervosos. Nos animais que se recuperam, são freqüentes as sequelas neurológicas, principalmente a anormalidade dos reflexos. A taxa de letalidade dos eqüinos afetados por sintomatologia encefalomiélica varia entre 20 a 30% podendo chegar a 50% (ACHA & SZYFRES, 1986; MONAH, 1981).

Na EEE os sinais são similares a WEE, porém o curso da doença é mais curto e altamente mortal. A enfermidade tem um curso febril bifásico. De 18 a 24 horas após o início da infecção começa a febre, que dura um dia. Um segundo período febril, se instala em quatro a seis dias após a infecção e dura de um a quatro dias. Neste período aparecem os sinais nervosos. O animal sofre uma profunda depressão, com os membros em abdução, a cabeça encostada no solo e os lábios flácidos. Também é freqüente diarréia ou constipação e grande perda de peso. Alguns animais ficam com hiperexcitabilidade, caminham em círculos e tropeçam em obstáculos. Finalmente caem e não mais se levantam. A morte ocorre entre o quinto e décimo dia após a infecção. A letalidade nos animais com sinais de encefalite é aproximadamente 75 a 90% e naqueles animais sobreviventes é comum lesões cerebrais.

Os vírus EEE e WEE causam a doença tanto em aves domésticas (faisões, perus, patos e galináceos) como em silvestres. A sintomatologia consiste em febre, depressão, diarréia profusa,



alteração na voz, ataxia, tremores, paralisia parcial ou completa de uma ou ambas extremidades, movimentos involuntários em círculos (ACHA & SZYFRES, 1986).

O vírus VEE (Variantes A, B e C do subtipo I) afeta os eqüideo com um período de incubação de um a três dias. A sintomatologia da enfermidade nos eqüideo (cavalos, mulas, asnos) varia de acordo com o grau da infecção. Em alguns animais a doença se manifesta por uma fase febril benigna, com febre de um a dois dias, anorexia, depressão. Estes sinais são acompanhados de ligeira leucopenia e baixa ou nenhuma viremia. Em quatro a seis dias, aparecem anticorpos neutralizantes. Os animais podem recuperar-se sem sequelas. Em outros animais, observam-se um curso característico da doença que é de encefalomielite. A doença se instala abruptamente, com febre alta, depressão profunda, anorexia e perda de peso, diarréia ou constipação. Neste estágio observa-se viremia de alto título, acompanhada de leucopenia. Os sinais encefalíticos são similares a WEE e EEE. Alguns animais enfermos apresentam torpor, membros em abdução para manter o equilíbrio, apoiando a cabeça sobre objetos, às vezes se deitam e não retornam a estação. Outros animais manifestam sinais de excitabilidade, hipersensibilidade ao tato e ruídos, agressividade, caminham em círculos, tropeçam contra obstáculos e apresentam convulsões. A taxa de letalidade é muito alta podendo chegar a 80% (MONATH, 1981; ACHA & SZYFRES, 1986).

INQUÉRITOS SOROLÓGICOS.

Em Trinidad, DOWNS et al. (1956), após um inquérito sorológico em que testaram 36 soros eqüinos, encontraram dois resultados positivos para o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE), porém não concluiu se este resultado indicava uma ocorrência tardia da doença ou uma atividade continuada da enfermidade após 1944, quando ocorreu uma epidemia.

Houve também reação positiva para o vírus da Encefalomielite Eqüina Leste (EEE), onde de 22 soros eqüinos testados, um reagiu positivamente.

LUGINBUHL et al. (1957) estudaram surtos de EEE ocorridos em faisões em Connecticut desde 1951 e em um levantamento realizado em 1952 em que não houve casos, somente cinco de 193 aves foram positivas em teste de neutralização para o vírus EEE.

CAUSEY et al. (1962) na epizootia de EEE, ocorrida em Bragança, Pará, Brasil, de 500 cavalos que viviam na área entre os infectados ocorreu uma taxa de letalidade de 8,2% e um percentual de 61% , utilizando o teste de HI, foi positivo.

FEEMSTER et al. (1958) realizaram estudo sorológico na população de aves em Massachusetts, EUA, durante os anos de 1953, 1956 e 1957 quando 146, 152 e 269 soros foram pesquisados respectivamente na detecção de anticorpos aos vírus da encefalomielite eqüina. A taxa de prevalência foi de 20% para os vírus EEE e WEE.

MCLEAN et al. (1985) investigaram o aumento de casos clínicos de EEE em cavalos e determinaram o hospedeiro vertebrado natural daquele vírus. Cavalos, aves e pequenos mamíferos foram

testados nos municípios de Kalamazoo e St. Joseph, Michigan, EUA, de 25 de Agosto à 5 de Setembro de 1980.

Amostras de soros de quatro cavalos com doença aguda de encefalite e 16 dos 39 companheiros de pasto dos cavalos doentes tiveram anticorpos neutralizantes contra o vírus EEE (46,5%). Não houve isolamento desses 43 soros.

Não houve isolamento de vírus e não foram detectados anticorpos para vírus EEE em 28 amostras de sangue de pequenos mamíferos. Doze cepas de vírus EEE foram isolados de 401 amostras de sangue de aves silvestres (42 espécies) e 22% dos faisões apresentaram títulos de anticorpos para o vírus EEE.

CAUSEY e THEILER (1958), em um levantamento efetuado em soros de residentes de 15 localidades da Amazônia, utilizando 14 tipos diferentes de arbovírus, entre eles o WEE, VEE e EEE, mostraram uma incidência alta (16,7% em 314 soros) para VEE e baixa para EEE (4,9%) e WEE (3,2%). Segundo os autores, a evidência dos resultados baixos não foi conclusiva devido à sobreposição imunológica com outros agentes relacionados imunologicamente.

SANMARTIN e DUEÑAS (1959), na Colômbia, constataram dois fatos bem definidos ao analisarem 478 amostras de soros humanos por meio dos testes de inibição da hemaglutinação (HI) e neutralização (N) com vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE). Primeiro, que as 344 amostras de soros que não tiveram anticorpos inibidores da hemaglutinação também apresentaram resultados negativos no teste de neutralização e, segundo, que no teste HI, as 100 amostras de soros com títulos de 80, 160, 320 ou

mais, foram positivas no teste de neutralização para VEE.

Entre 43 soros com títulos de HI menor ou igual a 10, 20 e 40 havia 30 dos quais no teste de N foram positivos e 13 negativos. Testes comparativos de HI desses 13 soros foram realizados com outros vírus do grupo A (EEE, WEE, MAYARO, SEMLIKI, CHIKUNGUNYA, SINDBIS) e indicaram que em nove casos, o vírus mayaro ou outro relacionado estritamente, poderia ter sido responsável pela produção de baixos títulos de anticorpos do VEE.

Mencionou-se também que todos os soros que apresentaram algum título no teste HI com o vírus EEE, resultaram em negativos no teste de N, com o mesmo vírus.

Após essas observações e os resultados obtidos, sugeriu-se que para o propósito de "screening", o teste de HI para VEE é considerado o método de escolha, deixando para o teste de N somente aqueles soros que apresentarem título menor que 80. Conseqüentemente, o teste de N deveria ser limitado àquelas amostras com título nas reações "in vitro" menor ou igual a 10, 20 e 40. Os soros com títulos de 80 ou maiores no teste HI, poderiam ser considerados como positivos verdadeiros.

TRAVASSOS et al.(1961), em inquérito sorológico realizado em soros de eqüinos, revelou 22,2% de positivos para o vírus WEE, 10% para EEE e 5,6% para VEE.

Em 1961, SCHERER et al., no sul do México detectaram anticorpos neutralizantes contra os vírus EEE e WEE em plasma de aves, suínos e homem, com uma taxa de prevalência máxima de 2% no homem e 6% em aves adultas.

DICKERMAN e SCHERER (1971), na pesquisa sorológica de

anticorpos do vírus VEE, no México, no período de 1960 a 1965, não evidenciaram nenhuma atividade viral nos soros dos eqüinos, galináceos, suínos, caprinos e humanos da região do noroeste e norte, devido o clima árido nessas regiões.

Os soros de aves selvagens, bovinos e suínos da costa mexicana do Pacífico apresentaram pouca evidência de atividade do vírus da Encefalomielite Eqüina Venezuelana. Os títulos pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI) variaram de 20 a 100.

BUCKLEY *et al.*(1972), em inquérito sorológico de soros humanos no Peru, compararam os resultados obtidos por inibição da hemaglutinação (HI) de 27 diferentes arbovírus, entre eles EEE e VEE com teste de neutralização e concluíram que os soros positivos para HI foram confirmados na neutralização com títulos mais altos.

Durante uma epizootemia ocorrida na Colômbia, em 1967, observou-se que no município de Carmelo, antes do surto havia 418 cavalos, dos quais 178 (43%) enfermaram e 90 (21%) morreram. Havia também 28 mulas, três enfermaram (11%) e nenhuma morreu. Um mês depois de iniciado o surto, de 22 cavalos examinados, 89% mostraram anticorpos em teste de inibição de hemaglutinação para o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana, (CEPANZO, 1973).

Segundo TIKASINGH *et al.*(1973), em uma pesquisa da cepa América do Sul do vírus da Encefalomielite Eqüina Leste (EEE), num pequeno vale no noroeste de Trinidad, em que ocorreu dois casos humanos da doença, foram testados em HI, 616 soros humanos apresentando resultado negativo. De 113 espécies de pássaros testados, oito apresentaram HI positivo para o vírus EEE, com

títulos variando entre 20 e 80.

BIGLER et al. (1976), em análise durante 20 anos (1955-1974) a respeito da encefalomielite eqüina leste (EEE) na Flórida, EUA, examinaram 1758 casos clínicos de EEE em cavalos e 25 casos no homem. Desses casos clínicos em cavalos, foram colhidos e analisados pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI) 722 soros, confirmando 39% dos casos, ou seja 278 soros positivos em 1758 soros testados. Cinco casos (1,8%) foram sorológicamente indicativos de infecção recente pelo vírus da encefalomielite eqüina oeste (WEE), e isolaram vírus da encefalomielite eqüina leste (EEE) de oito cérebros de cavalos.

Segundo os autores, a combinação dessas fontes de dados, indicaram que o vírus EEE poderia ter atividade circulante na Flórida, em qualquer época do ano, com pico de transmissão para o cavalo entre os meses de maio e setembro.

KOTAKA et al. (1977) no Paraná, em consequência de epidemia por arbovírus surgida no litoral sul de São Paulo em 1975, constataram a existência dos vírus VEE, EEE e outros. A incidência nos soros de aves foi de 26,4% e 32,4% nos soros humanos pelo teste de HI.

WIGG (1977) realizou inquérito sorológico em 2975 soros humanos de diversas localidades do Brasil, através do teste HI, verificando uma incidência de 6,4 % de positividade para o vírus WEE. Os estados de Goiás (98/472), Minas Gerais (24/285) e Rio de Janeiro (16/905) foram os maiores detentores dessa prevalência, ou seja onde o vírus parece circular com maior intensidade.

O mesmo teste realizado com soros de animais silvestres e

equídeo, mostrou resultados positivos para o vírus WEE em maior taxa para o sagui (57,3%), seguido do rato silvestre (28%), do rato doméstico (26,9%), do preá (25%), dos equídeo (5,4%) e do morcego (1%) ; com títulos hemaglutinantes variáveis entre 10 e 80.

IVERSSON et al.(1983) em pesquisa sorológica para detectar anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale da Ribeira, no município de Iguape, São Paulo, evidenciaram a presença de anticorpos HI numa taxa de 8,31% dos investigados para os grupos A, B, C, Bunyamwera.

Os autores concluíram, que os dados sorológicos sugeriam a circulação de arbovírus patogênicos para o homem (EEE e Subtipo não epidêmico do complexo VEE).

MONATH et al.(1985), na Argentina, em levantamento sorológico de aves domésticas e silvestres, mamíferos silvestres e cavalos conduzidos durante o estudo de arbovírus do período de 1977 a 1980, no intervalo não epizótico, mostrou que a prevalência de anticorpos neutralizantes para EEE foi maior que WEE em todas as espécies e áreas.

A presença de anticorpos em espécies de aves de vida curta e cavalos jovens não vacinados e a demonstração de soroconversão em cavalos durante o período, indicaram que estes vírus são também enzoóticos ou anualmente reintroduzidos na Argentina.

Anticorpos para antígeno 80-646, um novo subtipo do vírus WEE isolado de mosquito *Culex melanoconion* foram encontrados em cavalos e roedores na região norte tropical (MONATH et al., 1985).

Segundo os autores, anticorpos para cepa TC-83 do vírus VEE foram achados em todas as aves estudadas. A presença de anticorpos em alguns cavalos era provavelmente relacionada à vacinação, mas a demonstração da soroconversão em cavalos sentinelas, aves e mamíferos silvestres indicava ativa transmissão do vírus VEE.

QUERALES *et al.* (1985) num estudo soroepidemiológico de encefalite pelo vírus venezuelano na região de Barlovento, Venezuela, descreveram o isolamento do vírus VEE a partir de mosquitos coletados no campo. Observaram também uma atividade viral vigente através de uso de animais sentinelas e sua soroconversão. Na análise de 66 soros humanos pela prova de HI detectaram uma positividade de 12%. Os títulos obtidos variaram de 20 a 640 para VEE e abaixo de 10 para EEE.

CRANS (1986), utilizando frangos para atuar como sentinelas durante uma epizootia de EEE no sul de New Jersey, EUA, concluiu, que esta espécie funcionou pobremente como sentinela para esse vírus, ainda que considerável atividade do vírus foi documentada em New Jersey durante 1984, por confirmação de mortes de eqüinos, isolamento do vírus do mosquito *Culex melanura*, e um caso humano. A maioria desses frangos usados neste teste não desenvolveu anticorpos HI para o vírus EEE.

Segundo HOWARD *et al.* (1988), os resultados obtidos na sorologia de aves para o período de 1978 a 1980, em New York, na prova de HI foram de 26 soros positivos com anticorpos contra o vírus EEE, e 12 foram também positivos para WEE.

Como o títulos de anticorpos EEE foram maiores ou iguais aos



títulos WEE, estes foram considerados sorológicamente de reação cruzada. Os soros positivos para WEE foram igualmente reação de baixo título, nove soros (40), três soros (80) e dois soros (160).

SASAKISILVEIRA *et al.* (1989) estudaram a prevalência de anticorpos contra arbovírus na população humana de portuários e ilhéus da região de Paranaguá, Paraná, em 1026 amostras de soros. Através do teste da HI, 301 amostras reagiram positivamente, sendo 190 soros para Bunyavírus, 84 soros para Flavivírus e 27 soros para Alphavirus (EEE, VEE-Mucambo).

RYDER & BRACHO (1990) estudaram anticorpos contra o vírus VEE na população do distrito de Mara, Zulia, Venezuela. Das 239 amostras de sangue colhidas durante o período de julho a setembro de 1988, 224 foram negativas (93,7%) e 15 foram positivas (6,3%).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZAÇÃO E ÉPOCA

Os dados para a presente pesquisa foram obtidos durante o ano de 1991 e são provenientes de 816 amostras de soro sanguíneo de eqüinos, do Programa de Tração Animal, de diversas regiões do Estado do Paraná, enviadas ao Laboratório Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti".

#### 3.2. SORO SANGÜÍNEO DE EQÜINO

Foram utilizadas 816 amostras de soro sanguíneo de eqüinos, enviadas ao laboratório embaladas, sob refrigeração e acompanhadas de uma ficha de identificação contendo informações sobre o animal e a região.

As amostras de soro, ao chegarem ao laboratório, eram armazenadas em "freezer" a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior manipulação.

#### 3.3. SOLUÇÕES

As soluções utilizadas seguiram o protocolo indicado por CLARKE & CASALS (1957) e SHOPE & SATHER (1979).

Todas as substâncias utilizadas foram com reagentes P.A. (Puro para Análise).

### 3.3.1. Soluções para colheita e lavagem dos eritrócitos

#### 3.3.1.1. ACD (ÁCIDO CÍTRICO-CITRATO-DEXTROSE)

citrate de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) .....	11,26g
ácido cítrico ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) .....	4,00g
dextrose .....	11,00g
água destilada q.s.p.....	500,00ml

A solução foi esterilizada por autoclavação, durante 10 minutos, à temperatura de 115°C e estocada à temperatura de 4°C.

#### 3.3.1.2. DGV (DEXTROSE-GELATINA-VERONAL)

Veronal (barbital) .....	0,58g
gelatina .....	0,60g
Veronal sódico .....	0,38g
cloreto de cálcio ( $\text{Ca Cl}_2$ ) .....	0,02g
sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,12g
cloreto de sódio ( $\text{Na Cl}$ ) .....	8,50g
dextrose .....	10,00g
água destilada q.s.p.....	1000,00ml

O veronal e a gelatina eram dissolvidos por aquecimento em 250 ml de água. Esta solução foi, depois, adicionada das demais substâncias, bem como de água até completar o volume de um litro.

A substância foi esterilizada por autoclavação durante 10 minutos à temperatura de 115°C e estocada a 4 °C.

3.3.2. Soluções com pH específico, usadas para suspensão de células

3.3.2.1. Soluções Estoque

3.3.2.1.1. Cloreto de sódio 1,5 M

NaCl .....	87,68g
água destilada q.s.p.....	1000,00ml

3.3.2.1.2. Fosfato de sódio dibásico 2,0 M

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Anidro) .....	283,96g
água destilada q.s.p.....	1000,00ml

3.3.2.1.3. Fosfato de sódio monobásico 2,0 M

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O .....	276,02g
água destilada q.s.p.....	1000,00ml

3.3.2.2. Soluções de Trabalho

3.3.2.2.1. NaCl 0,15 M - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M

NaCl 1,5 M .....	100,00ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,0 M .....	100,00ml
água destilada .....	800,00ml

3.3.2.2.2. NaCl 0,15 M - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M

NaCl 1,5 M .....	100,00ml
------------------	----------

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 2,0 M.....	100,00ml
água destilada.....	800,00ml

### 3.3.3. Diluentes Ajustados

São compostos da mistura das soluções estoque com a solução de trabalho, obtendo-se assim, soluções com concentração hidrogeniônica adequada para adicionar à suspensão de células. (TABELA 3).

TABELA 3. CONCENTRAÇÃO HIDROGÊNIONICA DE TAMPÕES FOSFATOS-NaCl

pH Final	NaCl-0,15M/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -0,2M	NaCl-0,15M/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -0,2M
5,75	3,0 ml	97,0 ml
6,0	12,5 ml	87,5 ml
6,2	22,0 ml	78,0 ml
6,4	32,0 ml	68,0 ml
6,6	45,0 ml	55,0 ml
6,8	55,0 ml	45,0 ml
7,0	64,0 ml	36,0 ml
7,2	72,0 ml	28,0 ml
7,4	78,0 ml	21,0 ml

O pH era obtido pela adição de volumes iguais de solução salina-borato (3.3.4.1.5), com o diluente ajustado.

Os diluentes ajustados de pH 5,75 a 6,6 foram estocados no refrigerador à temperatura de 4°C, enquanto os de pH 6,8 a 7,4 foram armazenados à temperatura ambiente, para evitar a sua cristalização.

3.3.4. Diluentes dos Antígenos e outros reagentes usados nos teste de Hemaglutinação (HA) e de Inibição da Hemaglutinação (HI)

### 3.3.4.1. Soluções Estoque

#### 3.3.4.1.1. Cloreto de Sódio 1,5 M

NaCl.....87,68g  
 água destilada q.s.p.....1000,00ml

#### 3.3.4.1.2. Cloreto de Sódio 8,5%

NaCl.....8,5g  
 água destilada q.s.p.....100,00ml

#### 3.3.4.1.3. Ácido Bórico 0,5 M

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....30,92g  
 água destilada q.s.p.....1000,00ml

#### 3.3.4.1.4. Hidróxido de Sódio 1 N

NaOH.....58,50g  
 água destilada q.s.p.....1000,00ml

#### 3.3.4.1.5. Solução Salina Borato(BS), pH 9,0

NaCl 1,5 M.....80,00ml  
 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,5 M .....100,00ml  
 NaOH 1 N.....24,00ml  
 água destilada q.s.p.....1000,00ml

O pH foi determinado em potenciômetro.

#### 3.3.4.1.6. Albumina Bovina 4%

Albumina Bovina (Fração V).....4,00g  
 Solução Salina Borato, pH 9,0 q.s.p...100,00ml

O pH da solução foi ajustado a 9,0, com NaOH 2N. A solução

foi esterilizada através de filtração com filtro millipore, em membrana de 0,22 $\mu$ .

3.3.4.1.7. P.B.S (Phosphate Buffer Saline) pH 7,2

Cloreto de Sódio (NaCl).....8,50g  
 Fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....0,56g  
 Fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....0,14g  
 água destilada q.s.p.....1000,00ml

Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 15'.

3.3.4.1.8. Albumina Bovina 7,5%

Albumina Bovina (Fração V).....7,50g  
 P.B.S. q.s.p.....100,00ml

A albumina foi dissolvida lentamente a fim de evitar a formação de espuma, esterilizada em filtro millipore 0,22 $\mu$  e distribuída em alíquotas de 10 ml.

3.3.4.1.9. Sacarose 8,5%.

Sacarose.....8,50g  
 água destilada q.s.p.....100,00ml

Esterilizou-se em filtro millipore 0,22 $\mu$ .

3.3.4.1.10. Solução de Antibióticos.

Penicilina G. Potássica (5.000.000 UI) 1 frasco  
 Estreptomicina (1g).....5 frascos  
 água destilada estéril q.s.p.....50,00ml

Os conteúdos dos seis frascos de antibióticos, foram

misturados completando-se o volume de 50 ml com água destilada estéril e a seguir essa mistura foi distribuída em alíquotas de 2 ml, armazenadas a -20° C.

Concentração usada: Penicilina 200 UI/ml

Estreptomicina 200 µg/ml

### 3.3.4.2. Diluentes de Trabalho.

Estes diluentes foram usados nos antígenos, soros e reagentes dos testes.

#### 3.3.4.2.1. Cloreto de Sódio 0,85%.

NaCl 8,5%.....10ml

água destilada estéril.....90ml

#### 3.3.4.2.2. Solução Salina Borato Albumina Bovina (BABS)

0,4%, pH 9,0.

Albumina Bovina 4%, pH 9,0.....100ml

Solução Salina Borato pH 9,0.....900ml

Essa solução foi preparada semanalmente e estocada à 4°C.

#### 3.3.4.2.3. P.B.S/Albumina Bovina 0,75%

Albumina Bovina 7,5%.....10,0ml

Solução de Antibióticos.....0,2ml

P.B.S.....88,2ml

#### 3.3.4.2.4. Suspensão de Kaolin.

Kaolin (ácido lavado).....25g



Solução Salina Borato, pH 9,0.....100ml

Preparou-se a suspensão adicionando-se Kaolin à solução de salina borato, agitando-se mecanicamente seguida de filtração através de camada dupla de gase. Armazenou-se em geladeira à 4°C. Antes do uso, misturou-se vigorosamente.

#### 3.4. PREPARO DO ANTÍGENO E SOROS IMUNES PARA O TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA).

Os antígenos HA e soros imunes para os vírus da encefalomielite equina leste (EEE), encefalomielite equina oeste (WEE) e encefalomielite equina venezuelana (VEE) foram preparados no INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO, por possuir melhores condições de biosseguridade.

Seguiu-se a técnica de sacarose-acetona, proposta por CLARKE & CASALS (1958) para a produção de antígeno à partir de cérebro de camundongo.

##### 3.4.1. Obtenção de Cérebro Infectado

3.4.1.1. Camundongos recém-nascidos (1 a 2 dias de idade) foram inoculados com 0,02 ml de uma suspensão de cérebro de camundongo infectado com o vírus (solução "stock"), diluído 1:10 em solução tamponada de albumina bovina 0,75%(P.B.S/Albumina Bovina 0,75%).

3.4.1.2. Os camundongos inoculados foram examinados duas vezes ao dia, para observação dos sinais clínicos da doença.

3.4.1.3. Quando a maioria (90%) dos animais apresentavam tais sinais, eram sacrificados e armazenados em "freezer" a  $-70^{\circ}\text{C}$  e o cérebro dissecado no dia do preparo do antígeno.

#### 3.4.2. Obtenção do Antígeno

3.4.2.1. Os cérebros removidos assépticamente foram colocados em placa de Petri e pesados.

3.4.2.2. Quatro volumes de solução aquosa de sacarose a 8,5% foram acrescentados por grama de cérebro, e o material homogeneizado em almofariz com pistilo até a obtenção de uma pasta uniforme. Essa operação foi realizada em banho de gelo.

3.4.2.3. Acrescentou-se lentamente ao homogeneizado 20 volumes de acetona gelada, usando seringa de vidro e agulha n° permanecendo a suspensão cinco minutos em banho de gelo.

3.4.2.4. O sobrenadante foi decantado e adicionado de 20 volumes de acetona, com agitação vigorosa, permanecendo, a seguir, em repouso 1 hora em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

3.4.2.5. A seguir, o sobrenadante foi decantado e o sedimento seco à temperatura ambiente, por 1 hora, em bomba de vácuo.

3.4.2.6. O resíduo seco foi então adicionado de volume de NaCl 0,85% equivalente em p/v a duas vezes o peso em g cérebro utilizado na preparação, ficando durante a noite em câmara fria.

3.4.2.7. A solução foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 10.000 r.p.m/60 minutos e o sobrenadante que contém o antígeno, distribuído em alíquotas de 1 ml, armazenadas em "freezer" a temperatura de -70°C.

As diferentes etapas da obtenção do antígeno viral da encefalomielite eqüina, são mostradas na Figura 1.

### 3.4.3. Soros Imunes

Foram utilizados camundongos albinos "swiss" jovens, em grupos de 6 por caixa, para produção dos soros imunes EEE, WEE e VEE.

3.4.3.1. Preparou-se uma suspensão 1:10 de cérebro infectado com vírus ("stock"), em solução de NaCl 0,85%.

3.4.3.2. Inoculou-se 0,2 ml dessa suspensão, via intraperitonal (IP) em cada camundongo.

3.4.3.3. Foram realizadas 4 imunizações semanais. Ao final do 7º dia da 4ª imunização, colheu-se o sangue dos animais, por via intracardíaca, usando seringa de vidro de 1 ml e agulha 25x7.

3.4.3.4. O sangue colhido foi centrifugado à 3000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, distribuído em alíquotas de 2 ml e armazenados em "freezer" a -20°C.

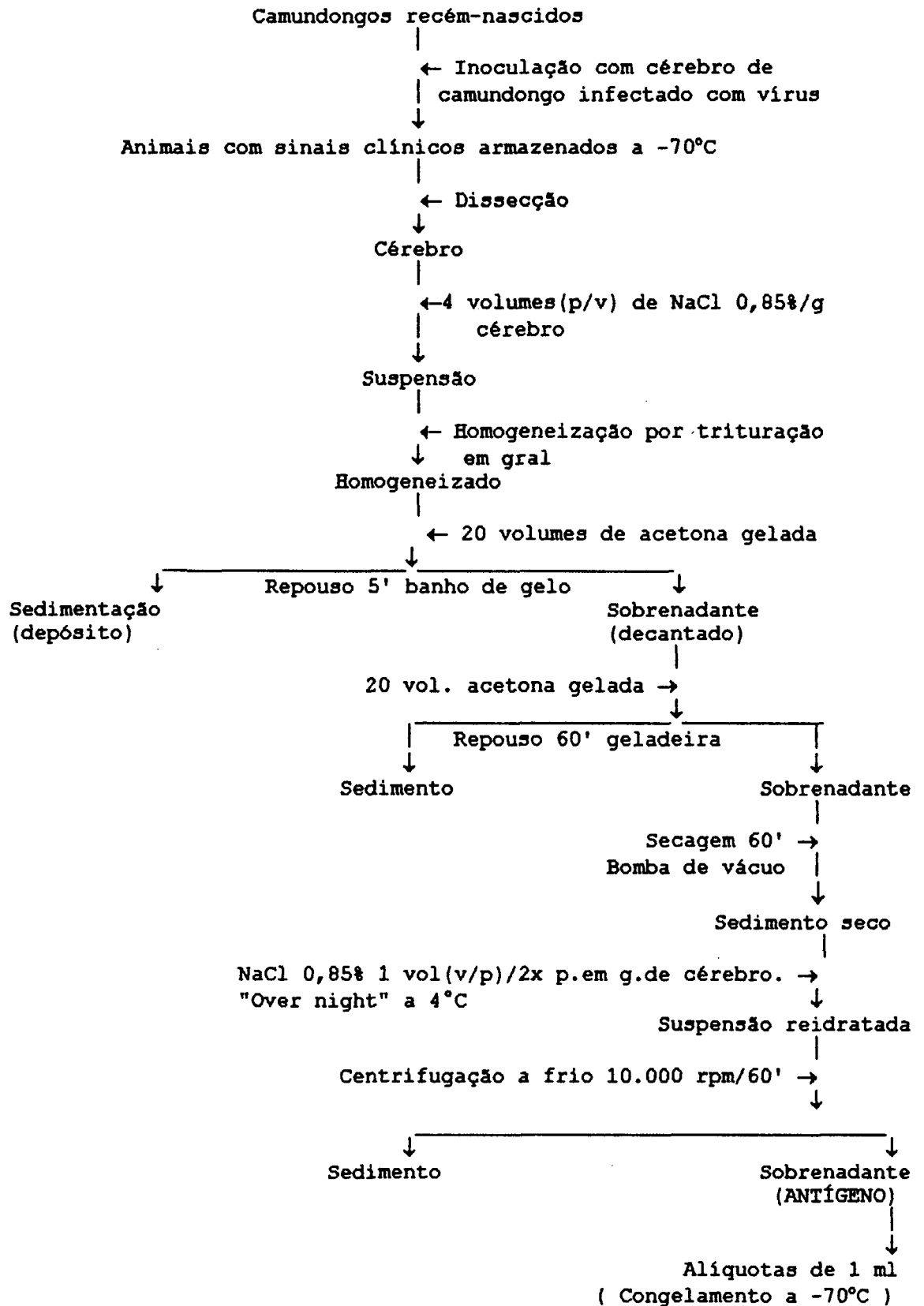


Figura 1. Fluxograma da preparação de antígeno viral da encefalomyelite eqüina.

### 3.5. PREPARAÇÃO DAS HEMÁCIAS DE GANSO.

O ganso doméstico branco, macho e adulto *Anser cinereus* foi a espécie recomendada, por possuir maior sensibilidade aos arbovírus, na técnica de HA e HI. O ganso fêmea não foi usado porque seu ciclo estral poderia resultar em mudanças no título da hemaglutinação.

As hemácias de ganso foram obtidas por punção da veia braquial, lavadas e diluídas, segundo o método proposto por CASALS (1967).

3.5.1. Em uma seringa de vidro estéril, de 10 ml, contendo 1,5ml de anticoagulante ACD (3.3.1.1) foram colhidos 8,5 ml de sangue.

3.5.2. A seguir, o sangue colhido foi centrifugado à 2000 r. p.m. durante 10 minutos, sob refrigeração, a 4°C.

3.5.3. Desprezou-se o sobrenadante e as hemácias foram lavadas quatro vezes em DGV (3.3.1.2), suspendendo um volume de sangue para cada três volumes de DGV, por lavagem.

3.5.4. Na última lavagem, a suspensão de hemácias foi transferida para um tubo cônico estéril, graduado, de centrifugação, e centrifugada à 2000 r.p.m. durante 10 minutos.

3.5.5. Desprezou-se o sobrenadante e de acordo com o sedimento

obtido, parte das hemácias foi suspensa a 8% (v/v) em DGV (3.3.1.2) e, estabilizada a 4°C, em geladeira, por 24 horas para posterior padronização. As hemácias restantes foram lavadas três vezes com a solução de Albumina Bovina 0,4%, pH 9,0 (3.3.4.2.2) e, suspensas, 1:6, nessa mesma solução para serem usadas na adsorção de aglutininas.

3.5.6. Na padronização das hemácias, foi utilizado espectrofotometro Coleman Jr, modelo 6 A, usando tubos de 10 mm de diâmetro, em comprimento de onda de 490 nm.

3.5.6.1. Diluiu-se 1 ml da suspensão de hemácias a 8% com 23 ml do diluente ajustado a pH 7,0 (Tabela 3). A absorbância (Abs) obtida da suspensão de células, na diluição 1:24 da suspensão a 8%, foi 0,75 que era o desejado.

3.5.6.2. Quando necessário, era ajustado o volume de 8% da suspensão de células, por adição ou remoção da solução de DGV, conforme à formula abaixo.

$$\text{Volume Final} = \text{Volume Inicial} \times \frac{\text{Abs. Obtida}}{\text{Abs. Desejada}}$$

onde: Abs = Absorbância

Abs. Desejada = 0,75

3.5.7. As hemácias padronizadas foram diluídas a 1:23 em diluentes ajustados, conforme pH requerido, e usadas imediatamente nos testes de HA e HI.

3.5.8. A suspensão estoque de hemácias foi armazenada em geladeira a 4°C, sendo usada até uma semana após o seu preparo.

### 3.6. COLHEITA DE SANGUE EQUÍNO.

3.6.1. Foram puncionados 10 ml de sangue da veia jugular, colocando em frasco limpo e identificado.

3.6.2. O frasco contendo o sangue puncionado foi mantido em repouso por duas horas, com inclinação de mais ou menos 45°, em temperatura ambiente.

3.6.3. Após essa etapa, o soro foi decantado para outro frasco e encaminhado ao laboratório, sob refrigeração.

3.6.4. No laboratório o soro foi centrifugado a 2000 r.p.m. por cinco minutos e o sobrenadante decantado foi inativado a 56°C, durante 30 minutos e armazenado a - 20°

### 3.7. TRATAMENTO DO SORO

3.7.1. Tratamento do soro com Kaolim.

Os soros foram tratados com uma suspensão de Kaolim para remover os inibidores naturais inespecíficos e adsorvidos com hemácias de ganso com a finalidade de remover as aglutininas inespecíficas. Esse tratamento não afeta as imunoglobulinas da classe IgG (CASALS, 1967; HSIUNG, 1982).

3.7.1.2. Para o volume selecionado de soro, que dependeu do número de antígenos usados no teste, foram adicionados 4 volumes de salina borato, pH 9,0 (3.3.4.1.5) e 5 volumes da suspensão de Kaolim a 25% (3.3.4.2.4).

Soro ( 1 volume).....	0,2 ml
Solução Salina Borato, pH 9,0 ( 4 volumes).....	0,8 ml
Suspensão de Kaolim 25%, pH 9,0 ( 5 volumes).....	1,0 ml

3.7.1.3. Agitou-se a mistura vigorosamente e deixou-se à temperatura ambiente por 20 minutos, agitando-a em intervalos de 5 minutos.

3.7.1.4. Centrifugou-se à 2500 r.p.m. durante 30 minutos. O sobrenadante correspondeu à diluição 1:10 do soro original.

### 3.7.2. Adsorção de Aglutininas

3.7.2.1. Ao soro tratado com Kaolim, adicionou-se 0,6 ml da suspensão 1:6 de hemácias de ganso.

3.7.2.2. Deixou-se a mistura soro-hemácias em banho de gelo, por 20 minutos, agitando a cada 5 minutos.



3.7.2.3. Centrifugou-se à 1500 r.p.m. por 10 minutos, em centrífuga refrigerada, para evitar hemólise das hemácias.

3.7.2.4. Retirou-se o constituído do soro diluído 1:20, pronto para ser testado.

3.7.2.5. Armazenou-se à  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior utilização, observando-se o prazo recomendado (quatro semanas) de manutenção nessas condições, para não ocorrer perda de título.

### 3.8. TESTE DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA).

Após a produção dos antígenos (Figura 1), foram titulados os vírus EEE, WEE e VEE, segundo os procedimentos de SHOPE & SATHE (1979).

3.8.1. Cada antígeno, foi diluído a 1:10 em solução salina borato albumina bovina 0,4%, pH 9,0 (3.3.4.2.2), em banho de gelo e estocada no refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

3.8.2. Para determinar o pH ótimo, os antígenos foram testados em concentrações hidrogeniônicas variando de 5,75 a 7,0.

3.8.2.1. Usando microplacas de fundo em "U", marcou-se no lado esquerdo e em sentido vertical, os diferentes valores de pH. Na parte superior e no sentido horizontal anotou-se a diluição do antígeno, iniciando em 1:10 até 1:20.480. Na parte inferior da

placa fez-se o controle de células (hemácias) dos diferentes valores de pH.

3.8.4. Adicionou-se 0,1 ml da diluição 1:10 de cada antígeno (EEE, VEE, WEE) no 1° poço de cada fileira.

3.8.5. Colocou-se 0,05 ml de BABS 0,4%, pH 9,0 (3.3.4.2.2) em todos os outros poços.

3.8.6. A partir da primeira fileira da microplaca, onde havia sido adicionado o antígeno, fez-se a diluição desse, com 0,05 ml por meio de uma micropipeta multicanal.

3.8.7. Suspendeu-se as hemácias de ganso padronizadas a 1:24 nos diluentes ajustados de pH 5,75 a 7,0, em que a absorbância era igual a 0,75 em comprimento de onda de 490 nm.

3.8.8. Adicionou-se 0,05 ml de cada suspensão de hemácias em diferentes pH's, nas fileiras apropriadas.

3.8.9. Após 30 minutos, em temperatura ambiente (22° a 25°C), realizou-se a leitura das microplacas, registrando os resultados.

3.8.10. Considerou-se como título, a maior diluição em que ocorreu a aglutinação total que correspondeu a 1 UHA (Unidade Hemaglutinante).

3.8.11. Considerou-se como pH ótimo aquele em que o antígeno

apresentou título mais alto.

3.8.12. Determinou-se a diluição de cada antígeno que continha 8 unidades/0,025 ml no pH ótimo, para ser usado no teste de HI.

### 3.9. TESTE DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HI).

Na realização da prova de inibição da hemaglutinação empregou-se também o sistema da microtécnica (SHOPE & SATHER, 1979), utilizando-se todo o material mencionado para a reação da hemaglutinação (HA), além do soro eqüino e dos controles dos soros positivo e negativo, das hemácias, do antígeno e do tratamento do soro.

3.9.1. Distribuiu-se 0,025 ml de BABS 0,4%, pH 9,0 (3.3.4.2.2) em todos os orifícios da microplaca, no sentido vertical, com exceção da 1ª fileira.

3.9.2. Adicionou-se 0,05 ml dos soros tratados na 1ª fileira, em que cada poço correspondeu a um soro. Cada microplaca continha 12 soros a ser testado.

3.9.3. Fez-se a diluição dos soros, com 0,025 ml, a partir da 1ª fileira até a sexta fileira.

3.9.4. Adicionou-se 0,025 ml do antígeno que correspondiam as oito unidades hemaglutinantes (UHA), em todos os orifícios da microplaca, com exceção dos controles do soro e das hemácias.

3.9.5. Incubou-se a mistura soro-antígeno em geladeira a 4°C, durante 18 horas.

3.9.6. O controle do antígeno foi feito em duplicata, colocando-se 0,05 ml do antígeno diluído (8 UHA/0,025ml) nos 1° e 2° poços da 1ª fileira de uma outra microplaca, para posterior diluição.

3.9.7. Adicionou-se 0,05 ml de BABS 0,4%, pH 9,0 (3.3.4.2.2) à partir do 2° poço da 2ª fileira até o 6° poço e no controle das células.

3.9.8. Cobriu-se a microplaca e incubou-se por 18 horas à 4°C, junto com as microplacas do teste HI.

3.9.9. Na manhã seguinte, removeu-se as microplacas da geladeira, deixando-as durante 30 minutos à temperatura ambiente (22° a 25°C).

3.9.10. Completou-se a diluição do antígeno, com 0,05 ml do 2° poço até o 6° poço.

3.9.11. Adicionou-se 0,05 ml de hemácias de ganso 1:24, no diluente de pH apropriado para o vírus, conforme resultado do teste de HA.

3.9.12. Após 30 a 45 minutos de incubação em temperatura

ambiente, realizou-se a leitura e o registro dos resultados.

3.9.13. Considerou-se como título HI, a maior diluição que causou completa ou quase completa inibição da hemaglutinação.

#### 4.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA

##### 4.1. Seleção da Amostra

A partir de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (PRODUÇÃO PECUÁRIA MUNICIPAL, 1987) reagrupados por Núcleos Regionais, da divisão política do Estado do Paraná (Tabela 4), determinou-se a participação de cada região no total do rebanho eqüino e, mantendo-se esse percentual selecionou-se aleatoriamente, 816 amostras de soros eqüinos, pertencentes ao Programa Estadual de Tração Animal.

##### 4.2. Tratamento Estatístico

Os dados obtidos foram analisados segundo tabelas de contingência, com aplicação do Teste do Qui-Quadrado ( $X^2$ ), com nível de 1% de significância (STEEL & TORRIE, 1960).

#### IV. RESULTADOS

As 816 amostras de soro eqüino, provenientes de diversas regiões do Estado do Paraná, avaliadas através do teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) apresentaram resultados que foram analisados do modo seguinte: 1) resultados da sorologia individual por vírus, EEE, WEE e VEE; 2) resultados da sorologia por título e por vírus ; 3) resultados dos tipos de reações ocorridas no teste e, 4) resultado geral do levantamento sorológico efetuado dos três tipos de vírus agrupados.

As regiões estudadas compreenderam Campo Mourão, Cascavel, Curitiba, Francisco Beltrão, Guarapuava, Irati, Ivaiporã, Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Pato Branco, Ponta Grossa, Toledo, União da Vitória e Umuarama (Tabela 4 e Figura 2).

TABELA 4. AMOSTRAGEM DE SOROS ANALISADOS EM RELAÇÃO À INCIDÊNCIA DE ENCEFALOMIELITE EQÜINA NO ESTADO DO PARANÁ

REGIÃO	REBANHO*	% **	AMOSTRAS	% **
CAMPO MOURÃO	28.326	6,8	48	5,9
CASCADEL	16.567	4,0	32	4,0
CURITIBA	42.965	10,4	84	10,3
F. BELTRÃO	13.761	3,3	32	4,0
GUARAPUAVA	51.480	12,4	100	12,2
IRATI	29.890	7,2	60	7,3
IVAIPORÃ	30.020	7,2	58	7,1
JACAREZINHO	26.371	6,4	56	6,9
MARINGÁ	16.358	4,0	34	4,1
PARANAVAI	25.900	6,2	50	6,1
PATO BRANCO	16.382	4,0	32	4,0
PONTA GROSSA	42.767	10,3	84	10,3
TOLEDO	9.047	2,2	20	2,4
UMUARAMA	39.121	9,4	76	9,3
UNIÃO DA VITÓRIA	25.608	6,2	50	6,1
TOTAL	414.563	100,0	816	100,0

FONTE\*: IBGE, 1987. \*\* Percentuais relativos.

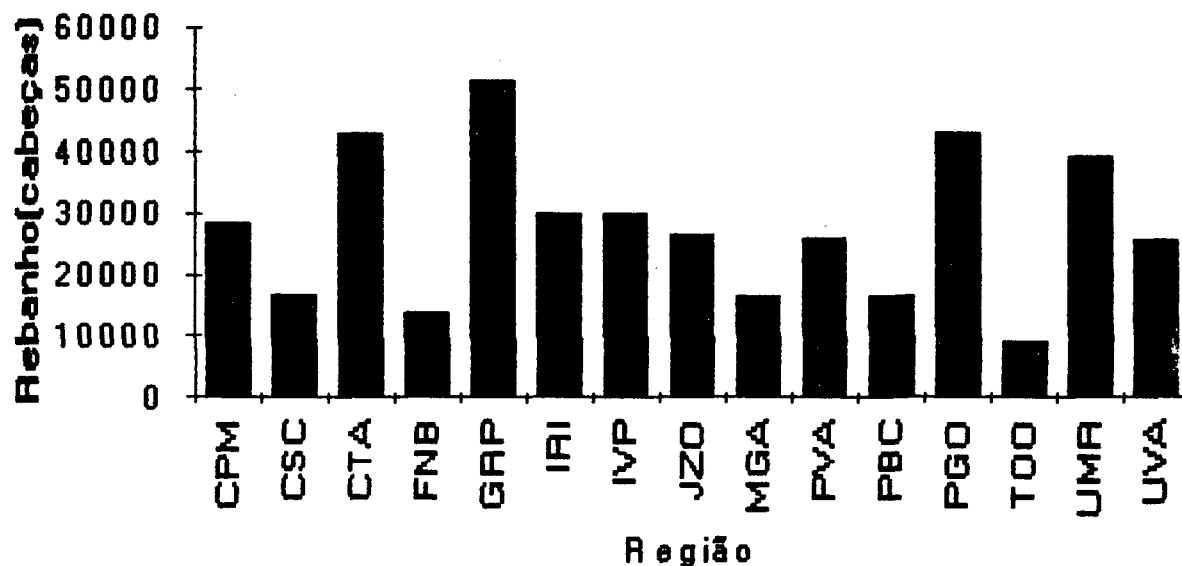


Figura 2. Distribuição da população eqüina analisada no ano de 1991, no Estado do Paraná.

#### 4.1. Teste da inibição da hemaglutinação frente ao vírus EEE, por amostra de soro.

A Tabela 5 e Figura 3 mostram os resultados da sorologia de 816 amostras analisadas. Verifica-se que 125 dessas amostras, correspondendo a 15,3% do total, possuíam anticorpos para o vírus da encefalomielite eqüina leste (EEE). Na região de Umuarama os soros testados apresentaram o maior índice de positividade, cerca de 33%. Nas regiões de Ponta Grossa, Jacarezinho, Maringá e Irati, de um total de 234 soros, 50 foram positivos para esse vírus, ou seja 21,3%.

Nos soros das regiões de Francisco Beltrão e Pato Branco não houve detecção de anticorpos para o vírus da encefalomielite eqüina leste.

TABELA 5. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VÍRUS EEE POR REGIÃO DO PARANÁ.

REGIÃO	POSITIVO	%*	NEGATIVO	%*	TOTAL
CAMPO MOURÃO	3	6,2	45	93,8	48
CASCATEL	1	3,1	31	96,9	32
CURITIBA	6	7,1	78	92,9	84
F.BELTRÃO	0	0,0	32	100,0	32
GUARAPUAVA	3	3,0	97	97,0	100
IRATI	10	16,7	50	83,3	60
IVAIPORÁ	3	5,2	55	94,8	58
JACAREZINHO	13	23,2	43	76,8	56
MARINGÁ	10	29,4	24	70,6	34
PARANAVAÍ	6	12,0	44	88,0	50
PATO BRANCO	0	0,0	32	100,0	32
PONTA GROSSA	17	20,2	67	79,8	84
TOLEDO	8	40,0	12	60,0	20
U.DA VITÓRIA	4	8,0	46	92,0	50
UMUARAMA	41	54,0	35	46,0	76
<b>TOTAL</b>	<b>125</b>		<b>691</b>		<b>816</b>

$$\chi^2=147,88$$

$$\chi^2_{.01}=29,1$$

\* Percentual relativo

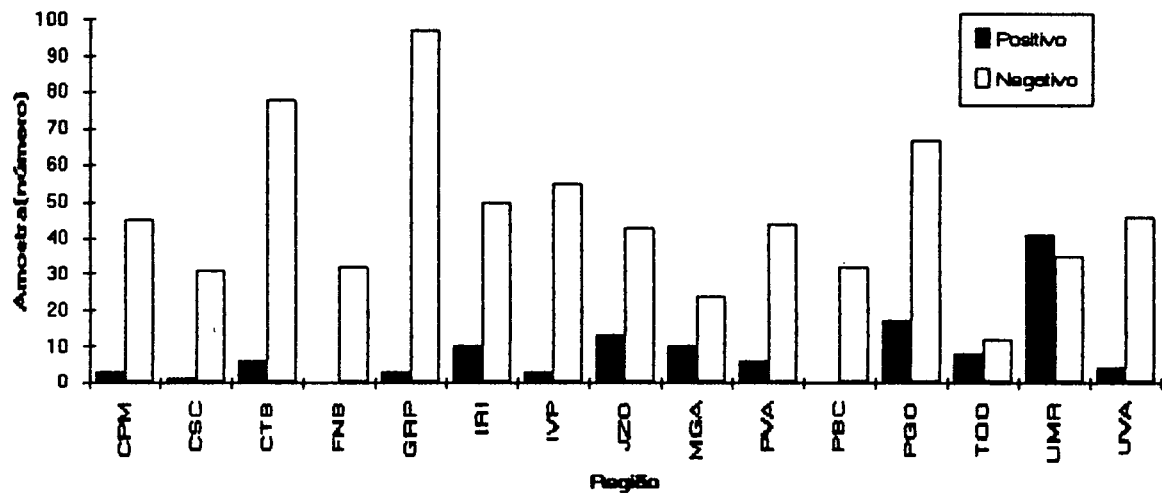


Figura 3. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI frente ao vírus EEE por Região do Paraná.



4.2. Teste de inibição da hemaglutinação frente ao vírus WEE.

Quanto aos resultados da sorologia frente ao vírus da encefalomielite eqüina oeste (WEE) observados na Tabela 6 e na Figura 4, dos 816 soros testados, 248 destes foram positivos, perfazendo percentual de 30,4% e os restantes 568 apresentaram resultados negativos. A região de Umuarama foi a mais prevalente, participando em 20% com relação ao total de soros positivos e em 66% com relação aos 76 soros trabalhados da própria região. Seguiu-se a região de Curitiba com 16% e a região de Ponta Grossa com 14%, do total de positivos.

TABELA 6. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VÍRUS WEE POR REGIÃO DO PARANÁ.

REGIÃO	POSITIVO	%*	NEGATIVO	%*	TOTAL
CAMPO MOURÃO	21	43,7	27	56,3	48
CASCADEL	1	3,1	31	96,9	32
CURITIBA	41	48,8	43	51,2	84
F. BELTRÃO	13	40,6	19	59,4	32
GUARAPUAVA	7	7,0	93	93,0	100
IRATI	15	25,0	45	75,0	60
IVAIPORÁ	13	22,4	45	77,6	58
JACAREZINEO	24	42,8	32	57,2	56
MARINGÁ	8	23,5	26	76,5	34
PARANAVAÍ	8	16,0	42	84,0	50
PATO BRANCO	0	0,0	32	100,0	32
PONTA GROSSA	36	42,8	48	57,2	84
TOLEDO	2	10,0	18	90,0	20
U. DA VITÓRIA	9	18,0	41	82,0	50
UMUARAMA	50	65,8	26	34,2	76
<b>TOTAL</b>	<b>248</b>		<b>568</b>		<b>816</b>

$\chi^2=141,27$

\* Percentual relativo

$\chi^2_{0.01}=29,1$

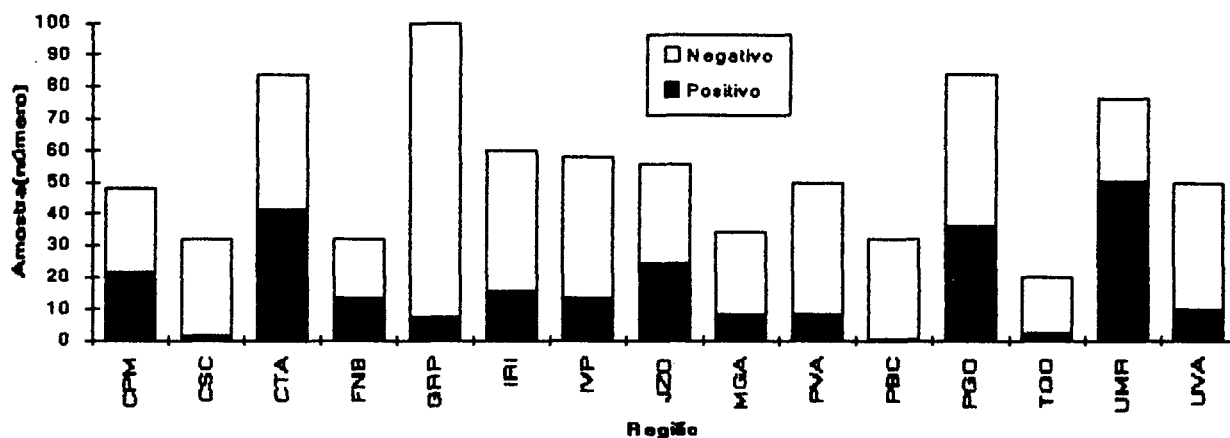


Figura 4. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI frente ao vírus WEE por Região do Paraná.

#### 4.3. Teste de inibição da hemaglutinação frente ao vírus VEE.

Observando a Tabela 7 e Figura 5 verificam-se os resultados dos 816 soros testados, frente ao vírus da encefalomielite equina venezuelana (VEE), em que 157 soros apresentaram anticorpos inibidores da hemaglutinação (19,2%).

Na região de Umuarama, dos 76 soros analisados, 34 destes reagiram positivamente, destacando essa região como a mais incidente ao vírus (22%).

As regiões de Guarapuava, Irati e Ponta Grossa representaram 9,5% cada, do total de soros reagentes ao vírus VEE, acompanhadas das regiões de Campo Mourão (8,9%), Curitiba (7,6%), Ivaiporã (6,3%), Jacarezinho (6,3%) e Paranavaí (6,3%).

Na região de Pato Branco dos 32 soros analisados, não detectou-se nenhuma resposta de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

TABELA 7. RESULTADO DA SOROLOGIA PELO TESTE HI FRENTE AO VÍRUS VEE POR REGIÃO DO PARANÁ.

REGIÃO	POSITIVO	%*	NEGATIVO	%*	T*
CAMPO MOURÃO	14	29,2	34	70,8	48
CASCADEL	2	6,2	30	93,8	32
CURITIBA	12	14,3	72	85,7	84
F. BELTRÃO	1	3,1	31	96,9	32
GUARAPUAVA	15	15,0	85	85,0	100
IRATI	15	25,0	45	75,0	60
IVAIPORÁ	10	16,7	48	83,3	58
JACAREZINHO	10	17,2	46	82,8	56
MARINGÁ	8	23,5	26	76,5	34
PARANAVAÍ	10	20,0	40	80,0	50
PATO BRANCO	0	0,0	32	100,0	32
PONTA GROSSA	15	17,8	69	82,2	84
TOLEDO	4	20,0	16	80,0	20
U. DA VITÓRIA	7	14,0	43	86,0	50
UMUARAMA	34	44,7	42	55,3	76
<b>TOTAL</b>	<b>157</b>		<b>659</b>		<b>816</b>

$$\chi^2=56,6$$

$$\chi^2_{.01}=29,1$$

\* Percentual relativo

T\* Total

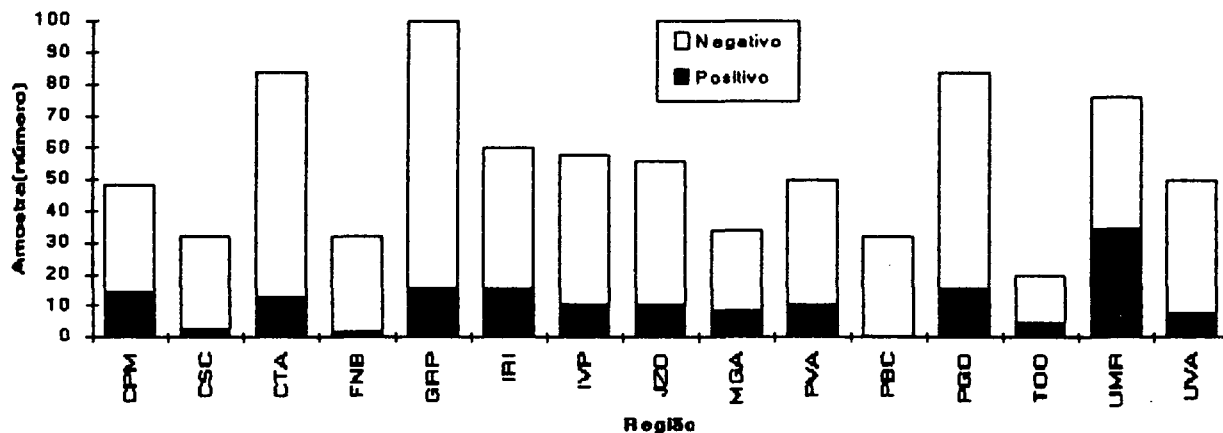


Figura 5. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI do vírus VEE por Região do Paraná.

#### 4.4. Teste de inibição da hemaglutinação por título para o vírus EEE.

Os resultados da Tabela 8 e da Figura 6 referem-se aos títulos obtidos no teste da inibição da hemaglutinação para o vírus da encefalomielite eqüina leste (EEE). Os títulos variaram de 20 a 640, porém, os mais prevalentes foram o de 80 e 160.

As regiões de Jacarezinho e Umuarama foram as que apresentaram soros reagentes a nível de todos os títulos, ou seja de 20 a 640.

Na região de Umuarama, a mais incidente, a quantidade de soros que apresentou título 1:20 foi igual àquela com título 1:160, (10) e na região de Jacarezinho a resposta de anticorpos nos soros reagentes foi mais uniforme, com pequena concentração (5) para o título 1:40.

TABELA 8. RESULTADO DO TESTE DE HI TÍTULO PARA O VÍRUS EEE POR

REGIÃO	TÍTULO							TOTAL
	0	20	40	80	160	320	640	
CPM	45	1	0	1	1	0	0	48
CSC	31	1	0	0	0	0	0	32
CTA	78	0	2	3	1	0	0	84
FNB	32	0	0	0	0	0	0	32
GRP	97	2	1	0	0	0	0	100
IRI	50	1	2	2	3	2	0	60
IVP	55	1	1	1	0	0	0	58
JZO	43	2	5	3	1	1	1	56
MGA	24	3	4	3	0	0	0	34
PVA	44	0	2	2	2	0	0	50
PBC	32	0	0	0	0	0	0	32
PGO	67	1	3	4	9	0	0	84
TOO	12	3	1	3	1	0	0	20
UVA	46	1	1	2	0	0	0	50
UMR	35	10	3	3	9	6	10	76
TOTAL	691	26	25	27	27	9	11	816

$$\chi^2=210,22 \quad \chi^2_{.01}=112,3$$

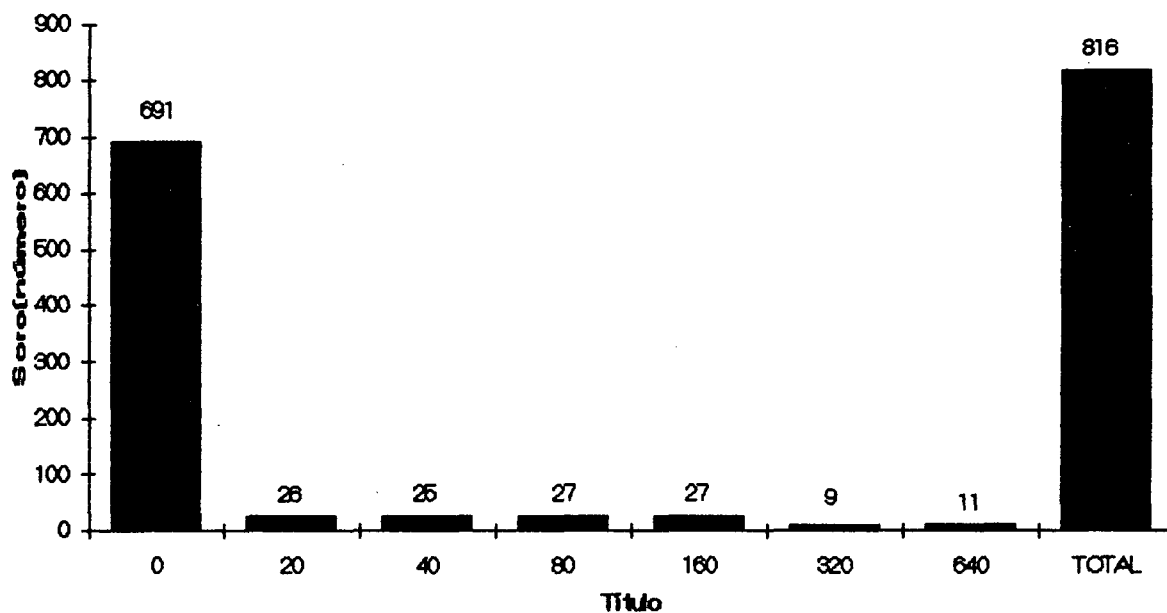


Figura 6. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus EEE.

#### 4.5. Teste de inibição da hemaglutinação por título para o vírus WEE.

Na Tabela 9 e Figura 7 observa-se que a maioria dos soros positivos alcançou os títulos de 20 e 40 em quase todas as regiões, com exceção da região de Pato Branco e , ao analisar-se frente ao vírus da encefalomielite eqüina oeste (WEE).

As regiões que apresentaram soros com títulos acima de 160 foram Campo Mourão, Curitiba, Irati, Jacarezinho, Paranavaí, Ponta Grossa, União da Vitória e Umuarama, totalizando 34 soros dos 248 positivos.

A região de Umuarama apresentou 50% de soros (nove) com título de 320.

TABELA 9. RESULTADO DO TESTE DE HI POR TÍTULO PARA O VÍRUS WEE

REGIÃO	TÍTULO							TOTAL
	0	20	40	80	160	320	640	
CPM	27	8	7	4	1	1	0	48
CSC	31	1	0	0	0	0	0	32
CTA	43	6	19	10	3	2	1	84
FNB	19	10	2	1	0	0	0	32
GRP	93	4	3	0	0	0	0	100
IRI	45	3	4	5	3	2	0	60
IVP	45	12	1	0	0	0	0	58
JZO	32	5	8	6	3	2	0	56
MGA	26	2	4	2	0	0	0	34
PVA	42	2	0	3	2	1	0	50
PBC	32	0	0	0	0	0	0	32
PGO	48	5	9	11	8	2	1	84
TOO	18	1	1	0	0	0	0	20
UVA	41	2	3	1	2	1	0	50
UMR	26	7	5	15	12	9	2	76
<b>TOTAL</b>	<b>568</b>	<b>68</b>	<b>66</b>	<b>58</b>	<b>34</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>816</b>

$$\chi^2=269,22$$

$$\chi^2_{.01}=112,3$$

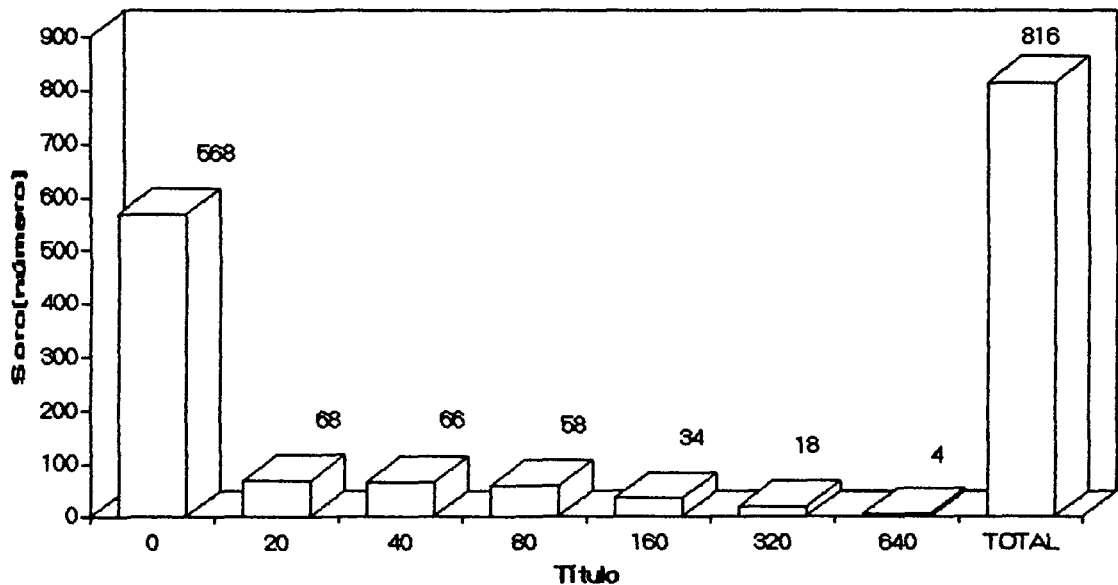


Figura 7. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus WEE.

4.6. Teste de inibição da hemaglutinação por título para o vírus VEE.

Os dados contidos na Tabela 10 e na Figura 8 representam os títulos dos 156 soros positivos para o vírus da encefalomielite equina venezuelana (VEE). O título 1:20 foi encontrado na maioria dos soros reagentes, isto é em 75 deles.

As principais regiões em que observou-se essas reações sorológicas ao vírus VEE foram Umuarama (33 soros), Guarapuava (15 soros) e Curitiba (15 soros). Apenas nesta última região encontrou-se soros com títulos de 1:640.

TABELA 10. RESULTADO DO TESTE DE HI POR TÍTULO PARA O VÍRUS VEE

REGIÃO	TÍTULO							TOTAL
	0	20	40	80	160	320	640	
CPM	34	5	4	3	2	0	0	48
CSC	30	2	0	0	0	0	0	32
CTA	72	6	3	2	1	0	0	84
FNB	31	0	1	0	0	0	0	32
GRP	85	12	2	1	0	0	0	100
IRI	45	2	7	3	2	1	0	60
IVP	48	9	1	0	0	0	0	58
JZO	46	7	2	1	0	0	0	56
MGA	32	0	0	0	0	0	0	34
PVA	40	4	2	2	2	0	0	50
PBC	32	0	0	0	0	0	0	32
PGO	69	1	0	4	3	3	4	84
TOO	16	2	2	0	0	0	0	20
UVA	43	3	1	1	2	0	0	50
UMR	43	17	7	4	5	0	0	76
TOTAL	660	75	34	21	18	4	4	816

$$\chi^2=133,40$$

$$\chi^2_{.01}=112,3$$

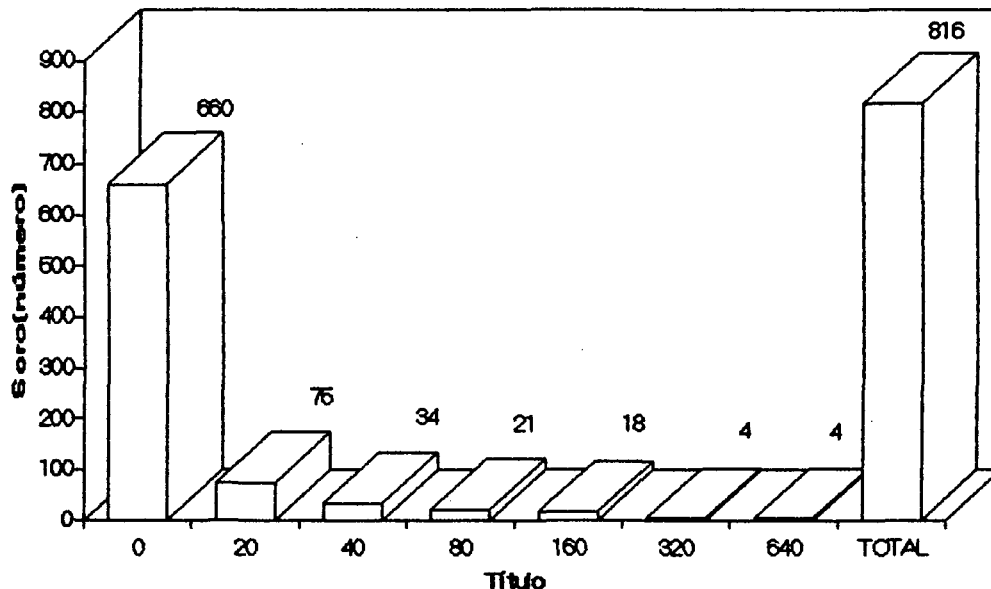


Figura 8. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para o vírus VEE.

#### 4.7. Teste de inibição da hemaglutinação, por tipos de reações para os *Alphavirus* EEE, VEE e WEE.

Quanto aos tipos de reações ocorridas no teste da inibição da hemaglutinação, para determinar os anticorpos contra os *Alphavirus* EEE, VEE e WEE, a Tabela 11 e a Figura 9 computam essas informações, onde se observa que as reações positivas, de 300 soros, dividiram-se em 146 reações específicas e 154 reações cruzadas ou seja, os soros apresentaram resposta a dois e/ou a três vírus, considerando que a diluição inicial do soro foi de 1:20.

Na região de Curitiba verificou-se um maior prevalência para as reações específicas, enquanto a região de Umuarama apresentou uma maior concentração de reações do tipo cruzada.



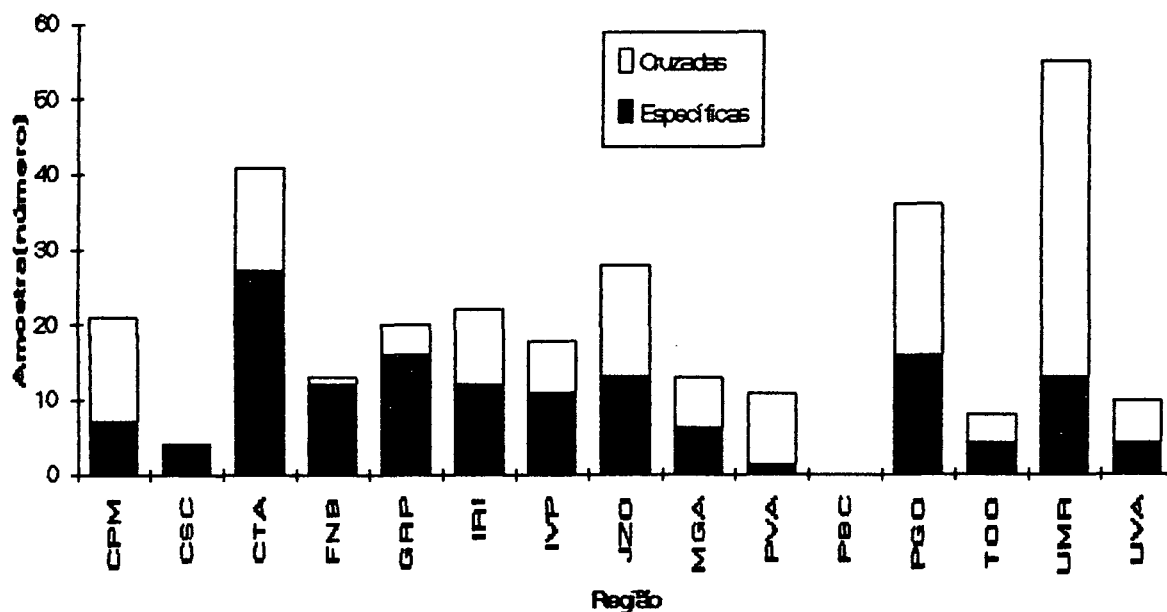


Figura 9. Distribuição das reações ocorridas no teste HI por Região do Paraná.

TABELA 11. TIPOS DE REAÇÕES POSITIVAS NO TESTE HI POR REGIÃO

REGIÃO	REAÇÃO		TOTAL DE AMOSTRAS
	ESPECÍFICAS	CRUZADAS	
CPM	7	14	48
CSC	4	0	32
CTB	27	14	84
FNB	12	1	32
GRP	16	4	100
IRI	12	10	60
IVP	11	7	58
JZO	13	15	56
MGA	6	7	34
PVA	1	10	50
PBC	0	0	32
PGO	16	20	84
TOO	4	4	20
UVA	4	6	50
UMR	13	42	76
<b>TOTAL</b>	<b>146</b>	<b>154</b>	<b>816</b>

$$\chi^2_{.01} = 29,1$$

$$\chi^2 = 124,83$$

Na Tabela 12 tem-se os resultados das reações específicas no teste de inibição da hemaglutinação por tipo de vírus.

A maior incidência foi na reação específica para o vírus da encefalomielite eqüina oeste (103) e a região de Curitiba caracterizou-se por apresentar o maior percentual (26%) de participação.

TABELA 12. RESULTADO DO TESTE HI POR REAÇÃO ESPECÍFICA.

REGIÃO	EEE	VEE	WEE	TOTAL
CPM	0	0	7	7
CSC	1	2	1	4
CTB	0	0	27	27
FNB	0	0	12	12
GRP	2	10	4	16
IRI	1	6	5	11
IVP	1	4	6	11
JZO	2	1	10	13
MGA	4	1	1	6
PVA	0	0	1	1
PCB	0	0	0	0
PGO	0	0	16	16
TOO	4	0	0	4
UMU	1	2	10	13
UVA	0	1	3	4
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	<b>103</b>	<b>144</b>

Na Tabela 13 observa-se os resultados das reações cruzadas no teste de inibição da hemaglutinação entre os vírus.

As reações cruzadas com os vírus VEE/WEE/EEE foram 75, enquanto que para os vírus VEE/WEE foram 44, totalizando 77% deste tipo de reação. Índices menores foram encontrados para EEE/WEE (16,8%) e EEE/VEE (5,8%).

TABELA 13. RESULTADO DO TESTE HI POR REAÇÃO CRUZADA.

REGIÃO	EEE/WEE	EEE/VEE	VEE/WEE	VEE/WEE/EEE	TOTAL
CPM	0	0	11	3	14
CSC	0	0	0	0	0
CTB	2	0	8	4	14
FNB	0	0	1	0	1
GRP	1	0	3	0	4
IRI	1	0	1	8	10
IVP	1	0	5	1	7
JZO	6	1	4	4	15
MGA	0	0	1	6	7
PVA	0	4	3	3	10
PBC	0	0	0	0	0
PGO	5	0	3	12	20
TOO	0	2	0	2	4
UMU	10	2	2	28	42
UVA	0	0	2	4	6
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>9</b>	<b>44</b>	<b>75</b>	<b>154</b>

## V. DISCUSSÃO

O primeiro relato de casos clínicos de encefalomielite eqüina, em cavalos, no Paraná foi de DUPONT (citado por WIGG, 1977) em 1913, porém este fazia referência da existência da doença desde 1895, devido as significativas perdas (morte) de animais pelos carroceiros dessa época.

Após esse período, VERNET (1925), citado por WIGG (1977), conseguiu reproduzir a doença em coelhos e cobaias, de material proveniente do surto em eqüideo, ocorrido em Venceslau Braz.

De acordo com essas informações, observa-se que o registro da ocorrência de encefalomielite eqüina no Brasil (Paraná) foi anterior ao dos Estados Unidos (MEYER et al., 1931; TEN BROECK & MERRIL, 1933) e da Venezuela (KUBES & RIOS, 1938).

Outros estudos da doença, em cavalos, foram desenvolvidos nos demais Estados brasileiros a partir de 1937, iniciados por CARNEIRO em São Paulo e, posteriormente por CUNHA (1943) em Pernambuco, SANTOS et al.(1946) no Rio de Janeiro, ALICE (1951) na Bahia, BRUNO LOBO et al.(1961) no Rio de Janeiro e NILSON & SUGAY (1962) em São Paulo.

Com o conhecimento do ciclo de transmissão do agente, outras espécies como o mosquito, aves, roedores, macaco e homem, entre outros, passaram a ser estudadas no Brasil como nos trabalhos citados por CUNHA (1942), CAUSEY et al.(1954), CAUSEY e THEILER (1958), TRAVASSOS et al.(1961), KOTAKA et al.(1977), WIGG (1977), SOUZA-LOPES & SANCCHETA (1978), SASAKISILVEIRA et al.(1989), VASCONCELOS et al.(1991), IVERSSON et al.(1993).

Com a retomada das observações dos casos clínicos de doenças em eqüinos, com sinais nervosos compatíveis com encefalite, realizou-se a presente pesquisa.

Para uma análise global dos resultados obtidos com relação à incidência dos vírus EEE, VEE e WEE ( Tab.14 e Fig.10) observa-se ter havido predominância na resposta de anticorpos ao vírus da encefalomielite eqüina oeste (30,4%), nos soros analisados das regiões de Umuarama (50/76), Curitiba (41/84), Ponta Grossa (36/84), Jacarezinho (24/56), Campo Mourão (21/48), Francisco Beltrão (13/32), Ivaiporã (13/58). Valores inferiores aos observados foram encontrados por TRAVASSOS *et al.*(1961), DICKERMAN E SCHERER (1971), BIGLER *et al.*(1976), WIGG (1977), MONATH *et al.*(1985), que estimaram uma incidência entre 0% e 22,2%.

As regiões que apresentaram maior prevalência para o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (19,2%), nos soros testados foram Guarapuava (15/100) e Paranavaí (10/50). Valores inferiores aos encontrados foram observados por DOWN *et al.*(1956), TRAVASSOS *et al.*(1961), MONATH *et al.*(1985), que estimaram uma incidência entre 5,5% e 8,6%, enquanto que, o CEPANZO (1973) e MONATH *et al.*(1985), encontraram valores superiores, de 89% e 29%, respectivamente.

Para o vírus da encefalomielite eqüina leste (15,3%), a maior incidência de soros reagentes foi nas regiões de Maringá (10/34) e Toledo (8/20). Valores superiores aos observados foram relatados por CAUSEY *et al.*(1962), BIGLER *et al.*(1976), MCLEAN *et al.*(1985), MONATH *et al.*(1985), variando entre 39% e 67,7%, e

valores inferiores aos observados foram encontrados por DOWN et al.(1956), TRAVASSOS et al.(1961), MONATH et al.(1985), que estimaram entre 4,5% e 13,9%.

Na região de Pato Branco não se obteve resposta de anticorpos, nos 32 soros analisados frente aos vírus das encefalomyelites eqüinas leste, oeste e venezuelana. Resultado semelhante foi observado por DICKERMAN e SCHERER (1971), para o vírus da encefalomyelite eqüina venezuelana, sendo justificado pelo tipo de clima árido das regiões norte e noroeste do México.

Observou-se diferença significativa a nível de 1% entre os resultados obtidos por região, dos soros analisados e por tipo de vírus testado.

TABELA 14. RESULTADO DA SOROLOGIA POR NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS, POR TIPO DE REAÇÃO E POR REGIÃO DO PARANÁ, 1991.

REGIÃO	TIPO DE VÍRUS			TOTAL AMOSTRA
	EEE	VEE	WEE	
CAMPO MOURÃO	3	14	21	48
CASCATEL	1	2	1	32
CURITIBA	6	12	41	84
FRANCISCO BELTRÃO	0	1	13	32
GUARAPUAVA	3	15	7	100
IRATI	10	15	15	60
IVAIPORÁ	3	10	13	58
JACAREZINHO	13	10	24	56
MARINGÁ	10	8	8	34
PARANAVAI	6	10	8	50
PATO BRANCO	0	0	0	32
PONTA GROSSA	17	15	36	84
TOLEDO	8	4	2	20
UNIÃO DA VITÓRIA	4	7	9	50
UMUARAMA	41	34	50	76
TOTAL	125	157	248	816
%	15,3	19,2	30,4	100,0

$$\chi^2=258,66$$

$$\chi^2_{.01}=29,1$$

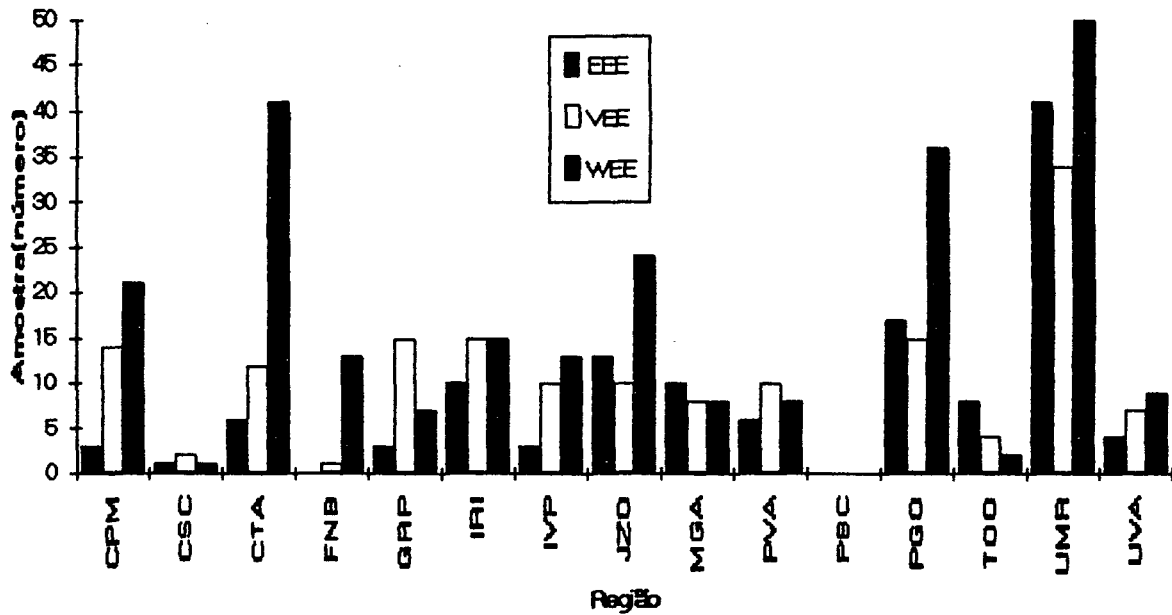


Figura 10. Distribuição do resultado da sorologia pelo teste HI por número de amostras positivas, por tipo de vírus e por região.

Na Tabela 15 e Figura 11 verifica-se os resultados do teste da Inibição da Hemaglutinação (HI) para os *Alphavirus*, EEE, VEE e WEE analisados separadamente, no tocante aos títulos obtidos. Dos soros reagentes 32% tiveram títulos menor ou igual a 1:20, 23% de 1:40, 20% de 1:80, 15% de 1:160, 6% de 1:320 e 4% de 1:640.

O nível de anticorpos de 1:640, encontrados nos soros reagentes, foi maior frente ao vírus da Encefalomielite eqüina leste, com 11 soros, seguido dos vírus da Encefalomielite Eqüina Oeste e Venezuelana, com 4 soros de cada um.

No nível de anticorpos de 1:320 a maior reação nos soros foi para o vírus da Encefalomielite Eqüina Oeste, 18 dos 31 soros positivos.

Houve diferença significativa, a nível de 1% entre os resultados obtidos por título e por vírus analisados.

TABELA 15. RESULTADO DO TESTE HI, POR TÍTULO PARA OS ALPHAVIRUS EEE, VEE, WEE. PARANÁ. 1991.

TÍTULO	VÍRUS			TOTAL
	EEE	VEE	WEE	
0	691	660	568	1919
20	26	75	68	169
40	25	34	66	125
80	27	21	58	106
160	27	18	34	79
320	9	4	18	31
640	11	4	4	19
TOTAL	816	816	816	2448

$$\chi^2=102,2$$

$$\chi^2_{.01}=26,2$$

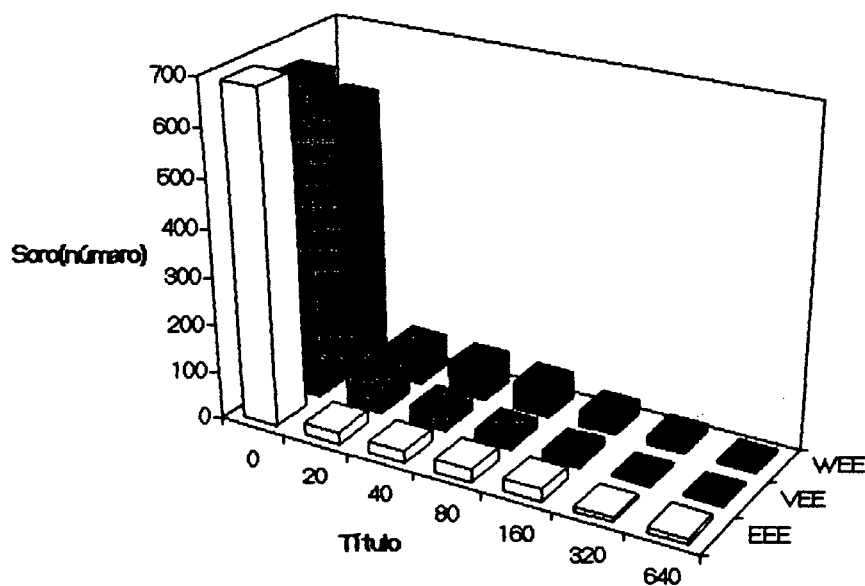


Figura 11. Distribuição dos títulos obtidos pelo teste HI para os Alphavirus EEE, VEE, WEE.



Na Tabela 16 tem-se os resultados das reações do teste da inibição da hemaglutinação por individualidade e agrupamento de vírus.

A maior incidência foi na reação específica para o vírus da encefalomielite eqüina oeste (103) e a região de Curitiba caracterizou-se por apresentar o maior percentual (26%) de participação.

Ocorreram 75 reações cruzadas entre os vírus VEE/WEE/EEE enquanto que para os vírus VEE/WEE foram 44, totalizando 77% deste tipo de reação. Índices menores foram encontrados para EEE/WEE (16,8%) e EEE/VEE (5,8%).

Houve diferença significativa, a nível de 1% entre os resultados obtidos por região e por tipo de reação.

TABELA 16. RESULTADO DA SOROLOGIA NO TESTE DE HI, POR TIPO DE REAÇÃO E POR REGIÃO DO ESTADO DO PARANÁ, 1991.

REGIÃO	EEE	VEE	WEE	EEE/WEE	EEE/VEE	VEE/WEE	V/W/EEE	TOTAL
CPM			7			11	3	48
CSC	1	2	1					32
CTB			27	2		8	4	84
FNB			12			1		32
GRP		10	4	1		3		100
IRI	1	6	5	1		1	8	60
IVP	1	4	6	1		5	1	58
JZO	2	1	10	6	1	4	4	56
MAG	4	1	1			1	6	32
PVA			1		4	3	3	50
PBC								32
PGO			16	5		3	12	84
TOO	4				2		2	20
UVA		1	3			2	4	50
UMR	1	2	10	10	2	2	28	76
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	<b>103</b>	<b>26</b>	<b>9</b>	<b>44</b>	<b>75</b>	<b>816</b>

$$\chi^2=370,14$$

$$\chi^2_{.01}=112,3$$

Na Tabela 17 e Figuras 12 e 13 tem-se o resultado geral da sorologia (HI), na determinação dos anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os *Alphavirus* EEE, VEE e WEE das encefalomiélites eqüinas, nas diversas regiões do Estado do Paraná.

A região de Umuarama apresentou 55 amostras positivas, seguindo-se as regiões de Curitiba (41), Ponta Grossa (36), Jacarezinho (28), Irati (22), Campo Mourão (21), Guarapuava (20), Ivaiporã (18), Francisco Beltrão (13), Maringá (13), Paranavaí (11), União da Vitória (10), Toledo (8), Cascavel (4), Pato Branco (0). Houve diferença significativa, a nível de 1% entre os resultados obtidos por região e por soros analisados.

TABELA 17. RESULTADO DA SOROLOGIA (HI) NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA OS VÍRUS DAS ENCEFALOMIELITES EQÜINAS LESTE, OESTE E VENEZUELANA. PARANÁ, 1991.

REGIÃO	SORO POSITIVO	SORO NEGATIVO	TOTAL	POSITIVO
CMP	21	27	48	43,75
CSC	4	28	32	12,50
CTA	41	43	84	48,80
FNB	13	19	32	40,62
GRP	20	80	100	20,00
IRI	22	38	60	36,66
IVP	18	40	58	31,03
JZO	28	28	56	50,00
MGA	13	21	34	38,23
PVA	11	39	50	22,00
PBC	0	32	32	0
PGO	36	48	84	42,85
TOO	8	12	20	40,00
UVA	10	40	50	20,00
UMR	55	21	76	72,36
TOTAL	300	516	816	36,76

$$\chi^2=103,81$$

$$\chi^2_{.01}=29,1$$

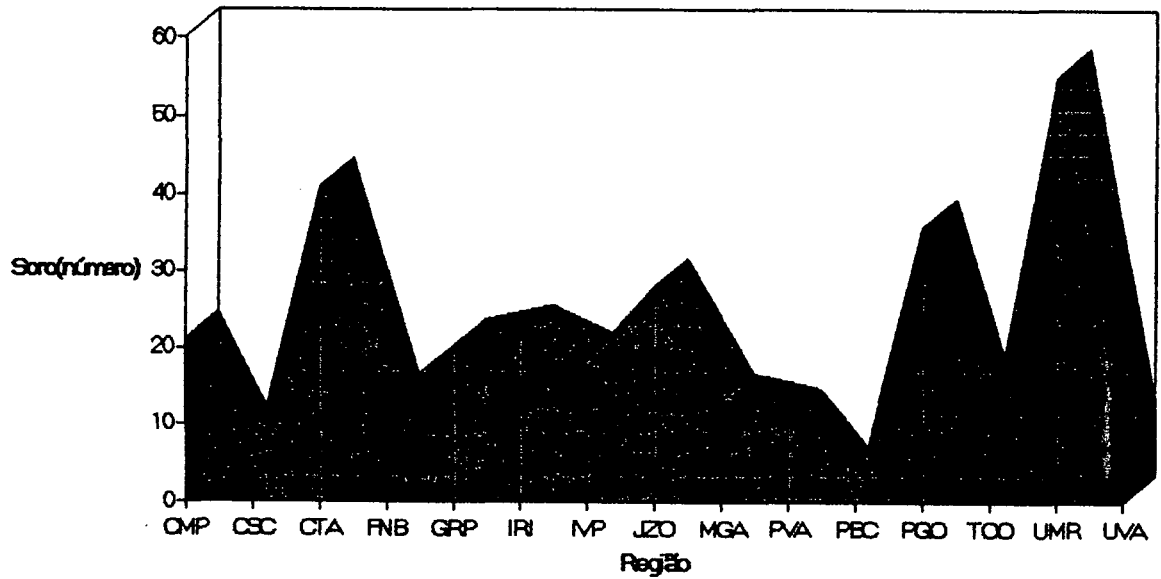


Figura 12. Distribuição dos soros reagentes pelo teste de HI, aos vírus EEE, VEE, WEE. Paraná, 1991.

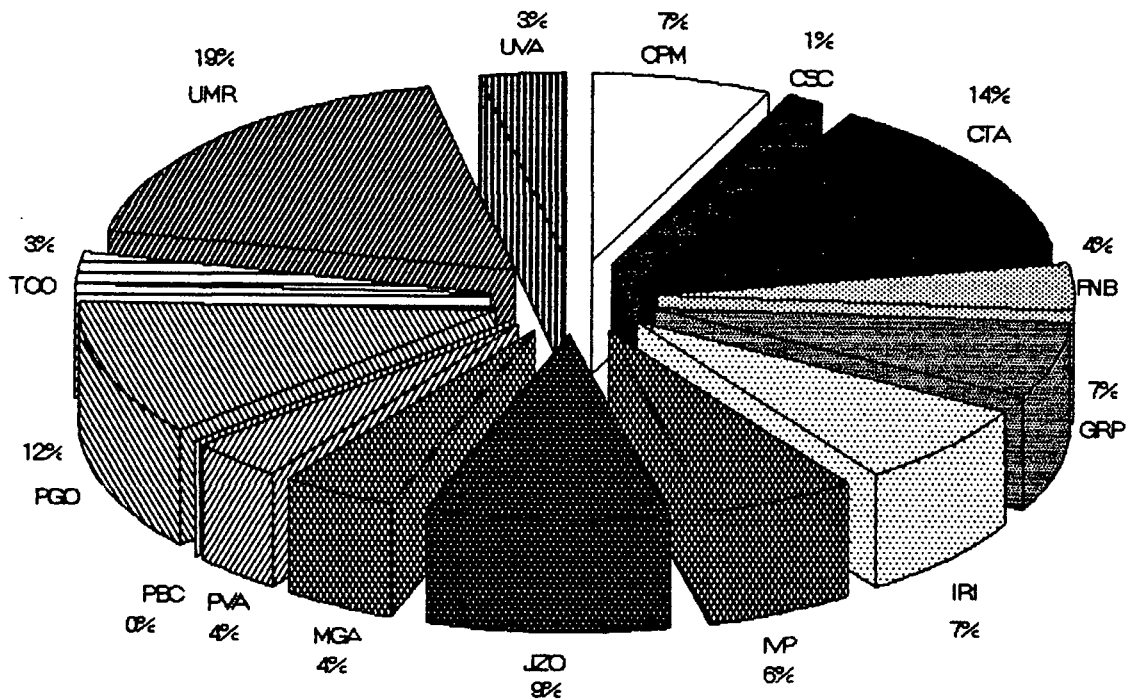


Figura 13. Distribuição das regiões positivas aos *Alphavirus* EEE, VEE, WEE.

De 816 amostras de soros testados, 300 foram reagiram positivamente e 516 negativamente, resultando em uma prevalência de 36,76% da doença, no Estado do Paraná (Figura 14).

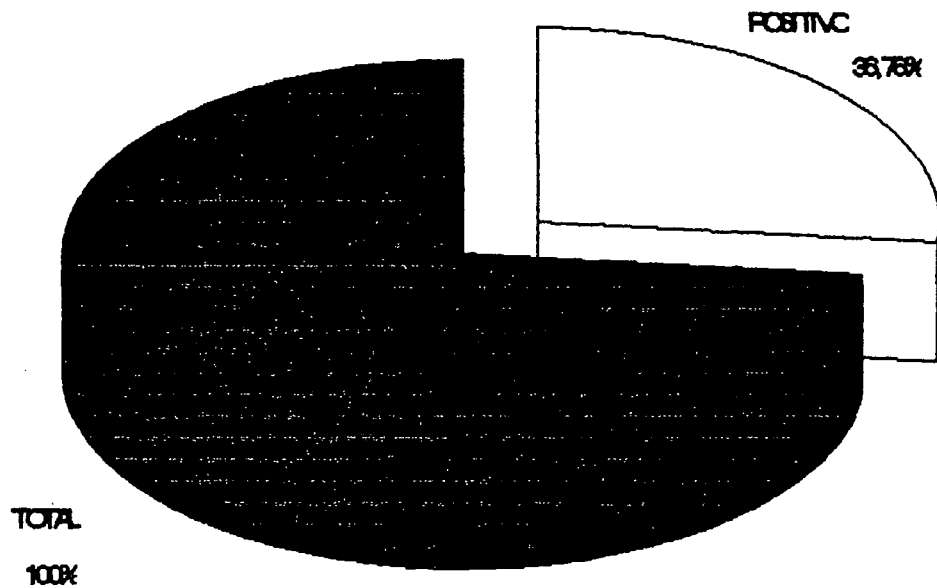


Figura 14. Incidência de encefalomyelites eqüinas leste, oeste e venezuelana no Paraná. 1991.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados do inquérito sorológico, obtidos em soros de eqüinos nas diversas regiões do Estado do Paraná, permitem as seguintes conclusões:

- A incidência das encefalomiélites eqüinas causadas pelos *Alphavirus* EEE, VEE e WEE nas regiões estudadas do Estado do Paraná foi de 36,76%, o que evidenciou a circulação desses vírus naqueles locais;
- Tendo em vista que a constatação do estado infeccioso desses animais por encefalomiélite eqüina foi realizada através do teste de inibição de hemaglutinação, pode-se concluir que houve infecção dos animais pelos *Alphavirus*, EEE, VEE e WEE em algum tempo no passado;
- Apesar das reações cruzadas ocorridas nos testes, o que impede a caracterização do tipo de vírus envolvido na infecção, as reações específicas, com títulos maiores ou iguais a 80, caracterizam respostas somente para determinado antígeno (EEE, VEE ou WEE), sugerindo suas existências;
- A resposta de anticorpos para *Alphavirus* WEE foi a mais prevalente, representando 70,5% dos 146 soros que reagiram especificamente;

- Em quase todas as regiões do Estado do Paraná, observou-se a presença de vírus, destacando-se a região de Umuarama com cerca de 72% de resultados positivos em relação a sua amostragem;
- Na região de Pato Branco não foi evidenciada a circulação dos vírus das encefalomyelites eqüinas, o que poderia ser resultante da insuficiência de amostras de soros, demandando estudos mais amplos na região;
- Com base nesses achados conclui-se que é apreciável dar maior ênfase aos estudos dessas zoonoses no Estado do Paraná, bem como da realização de estudos regionalizados, para verificar a atividade viral através de isolamento dos agentes virais, de vetores e de hospedeiros vertebrados.

## VII. RESUMO

Foi realizado um inquérito sorológico, em 816 soros de eqüinos de diversas regiões do Estado do Paraná, em 1991, para detectar anticorpos inibidores de hemaglutinação para os vírus das encefalomielite eqüinas leste, oeste e venezuelana.

Os resultados obtidos foram de uma prevalência de 30,4% para o vírus da encefalomielite eqüina oeste (WEE), 19,2% para o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE) e 15,3% para o vírus da encefalomielite eqüina leste (EEE).

Dos 816 soros analisados pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), 300 reagiram positivamente, resultando em uma incidência de 36,76% de encefalomielite eqüina no Estado do Paraná.

A região de Umuarama apresentou 19% do total de soros positivos, seguida das regiões de Curitiba (14%), Ponta Grossa (12%), Jacarezinho (9%), Irati (7%), Campo Mourão (7%), Guarapuava (7%), Ivaiporã (6%), Francisco Beltrão (4%), Maringá (4%), Paranavaí (4%), União da Vitória (3%), Toledo (3%), Cascavel (1%) e Pato Branco (0%).

## VIII. SUMMARY

A serological survey on antibodies of three *Alphavirus* (EEE, VEE, WEE) was carried out among the equine herd from the State of Paraná, Brazil. A total of 816 equine blood samples have been collected from different regions of the State. The sampling took place during the year of 1991 and the assays carried out at the Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

The haemagglutination-inhibition antibodies showed to be prevalent for the Western Equine Encephalomyelitis (WEE) virus (30.4%) followed by the Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE) virus (19.2%) and by the Eastern Equine Encephalomyelitis (EEE) virus (15.3%).

According to the results obtained, 300 out of the 816 blood samples analyzed, were positive for the haemagglutination-inhibition test. This result amounted to a total of 36.76% of incidence of equine encephalomyelitis in the equine herd of the State of Paraná.

The distribution of the positive cases of equine encephalomyelitis diagnosed by the haemagglutination-inhibition test in the different regions of the State of Paraná was found to be as follows: Umuarama, 19%; Curitiba, 14%; Ponta Grossa, 12%; Jacarezinho, 9%; Irati, 7%; Campo Mourão, 7%; Guarapuava, 7%; Ivaiporã, 6%; Francisco Beltrão, 4%; Maringá, 4%; Paranavaí, 4%; União da Vitória, 3%; Toledo, 3%; Cascavel, 1%; and Pato Branco, 0%.



## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Encefalitis Equina Del Este. In: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comuns al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington: Organizacion Mundial de la Salud. 1986. p. 313-318.
02. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Encefalitis Equina Del Oeste. In: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comuns al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington: Organizacion Mundial de la Salud. 1986. p. 319-324.
03. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Encefalitis Equina Venezolana. In: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comuns al hombre y a los animales*. 2 ed. Washington: Organizacion Mundial de la Salud. 1986. p. 324-335.
04. ALICE, F.J. Encefalomielite eqüina na Bahia: estudo de três amostras isoladas. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.11, p. 125-144, 1951.
05. BELLARD, M.E. DE; LEVINE, S.; BONILHA, E. Venezuelan equine encephalitis. *Rev. Invest. Clin.* v. 30, n. 1, p. 31-58, 1989.
06. BIGLER, W.J.; LASSING, E.B.; BUFF, E.E.; PRATHER, E.C.; BECK, E.C.; HOFF, G.L. Endemic Eastern Equine Encephalomyelitis in Florida: A twenty-year analysis, 1955-1974. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 25, n. 6, p. 884-890, 1976.
07. BYRNE, R.H.; FRENCH, G.R.; YANCEY, F.S. Clinical and immunologic interrelationship among Venezuelan, Eastern and Western equine encephalomyelitis viruses in burros. *Am.J.Vet.Res.*, Schaumburg, v. 25, p. 24-31, 1964.
08. CHAMBERLAIN, R.N.; RUBIN, H.; KISSLING, R.E.; GIDSON, M.E. Recovery of virus of Eastern Equine Encephalomyelitis from a mosquito *Culiseta melanura* (Coquillet). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, Baltimore, v. 77, p. 396-397, 1951.
09. CALISHER, C.H.; MANESS, K.S.C. Laboratory studies of Venezuelan equine encephalitis virus in equines, Texas, 1971. *J.Clin.Microbiol.*, Washington, v. 2, p. 198-205, 1975.

10. CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; KARABATSOS, N.; TRENT, D.W. Arbovirus subtyping applications to epidemiologic studies, availability of reagents and testing services. *Am.J.Epidemiol.*, Baltimore, v. 114, n. 5, p. 619-631, 1981.
11. CALISHER, C.H.; EMERSON, J.K.; MUTH, D.J. Serodiagnosis of western equine encephalitis virus infections: relationships of antibody titer and test to observed onset of clinical illness. *J.Am.Vet.Med.Ass.*, Washington, v. 183, p. 438-440, 1983.
12. CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; MITCHELL, C.J.; SABATTINI, M.S.; CROPP, C.B.; KERSCHNER, J.; HUNT, A.R.; LAZUICK, J.S. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. III. Identification and characterization of viruses isolated, including new subtypes of western and venezuelan equine encephalitis viruses and four new bunyaviruses (Las Maloyas, Resistencia, Barranqueras, and Antequera). *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 34, n. 5, p. 956-965, 1985.
13. CALISHER, C.H.; MAHMUD, M.I.A.; EL-KAFRAWI, A.O.; EMERSON, J.K.; MUTH, D.J. Rapid and specific serodiagnosis of western equine encephalitis virus infection in horses. *Am.J.Vet.Res.*, Schaumburg, v. 47, n. 6, p. 1296-1299, 1986.
14. CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; LAZUICK, J.S.; MONATH, T.P.; WOLFF, K.L. Reevaluation of the western equine encephalitis antigenic complex of alphaviruses (family Togaviridae) as determined by neutralization tests. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 38, n. 6, p. 447-452, 1988.
15. CARNEIRO, V. Novos focos de encefalomielite infecciosa do cavalo em São Paulo, identificados pelas provas de soro-neutralização. *Arq.Inst.Biol.*, São Paulo, v. 17, p. 183-198, 1946.
16. CASALS, J. Immunological relationships among central nervous system viruses. *J.Exper.Med.*, New York, v. 79, p. 341-359, 1944.
17. CASALS, J. Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-challenge tests. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 12, n. 4, p. 587-596, 1963.
18. CHERRY, J.D. Encephalitis. In: BEHRMAN, R.E.; VAUGHAN, V.C. *Nelson textbook of pediatrics*. 13. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987. p. 557.

19. CRANS, W.J. Failure of chickens to act as sentinels during an epizootic of eastern equine encephalitis in southern New Jersey. *J.Med.Ent.*, Calvert, v. 23, n. 6, p. 626-629, 1986.
20. CRANS, W.J.; SCHULZE, T.L. Evidence incriminating *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae) as an epizootic vector of eastern equine encephalitis. I. Isolation of EEE virus from *C.perturbans* during an epizootic among horses in New Jersey. *Bull.Soc.Vect.Ecol.*, Santa Ana, v. 11, n. 1, p. 178-184, 1986.
21. CAUSEY, O.R.; CAUSEY, C.E.; MAROJA, O.M.; MACEDO, D.G. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hithert underscribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 10, p. 227-249, 1954.
22. CAUSEY, O.R.; THEILER, M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon Valley in Brazil. *Am.J.Trop..Med.Hyg.*, Shreveport, v. 7, p. 36-41, 1958.
23. CAUSEY, O.R.; SHOPE, R.E.; SUTMOLLER, P.; LAEMMERT, H. Epizootic eastern equine encephalitis in the Bragança region of Pará, Brazil. *Rev.Serv.Esp.Saúde Púb.*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 39-45, 1962.
24. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. CEPANZO. *Comunicaciones Epidemiologicas*. Buenos Aires, Argentina. 1982. n. 1.
25. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. CEPANZO. Encefalitis equina venezolana en Colombia, 1967. Buenos Aires, Argentina. 1973. p. 7-53. *Serie de Monografias Cientificas y tecnicas*.
26. CUNHA, R. Encefalomielite equina. Imunidade cruzada entre os virus "Oeste", "Este" e um virus isolado na Baía. *Boletim do Ministério da Agricultura*, Rio de Janeiro, p. 1-13, 1942.
27. CUNHA, R. Verificação de anticorpos para o vírus Este da encefalomielite equina em soros de cavalos do nordeste brasileiro. *Rev.Bras.Biol.*, São Paulo, v. 3, p. 425-430, 1943.
28. DICKERMAN, R.W.; SCHERER, W.F. Serologic survey for antibodies to VE virus in western and northcentral Mexico. *Bol.Ofic.San.Pan.*, Washington, v. 70, n. 6, p. 550-556, 1971.

29. DOWNS, W.G.; ANDERSON, C.R.; THEILER, M. Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of Trinidad, B.W.I. *AM.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 5, n. 4, p. 626-641, 1956.
30. FEEMSTER, R.F.; WHEELER, R.E.; DANIELS, J.B.; ROSE, H.D.; SCHAEFFER, M.; KISSLING, R.E.; HAYES, R.O.; ALEXANDER, E.R.; MURRAY, W.A. Field and laboratory studies on equine encephalitis. *N.Eng.J.Med.*, London, v. 259, p. 107-113, 1958.
31. GIBBS, E.P.J.; WILSON, J.H.; ALL, B.P. Studies on passive immunity and the vaccination of foals against eastern equine encephalitis in Florida. In: POWELL, D.G. *Equine Infectious Diseases V: Proceedings of the Fifth International Conference*. Lexington: University Press of Kentucky, 1988. p. 201-205.
32. HAMMON, W.McD.; SATHER, G.E. Immunity of hamsters to West Nile and Murray Valley viruses following immunization with St. Louis and Japanese B. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, Baltimore, v. 91, p. 521-524, 1956.
33. HETRICK, F.M.; YANCEY, F.S.; HANSEN, A.; BYRE, R.J. Hemagglutination-inhibition and serum neutralization response of horses to Eastern Equine Encephalomyelitis virus. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, Baltimore, v. 103, p. 549-551, 1960.
34. HOWARD, J.J.; MORRIS, C.D.; EMORD, D.E.; CRAYSON, M.A. Epizootiology of eastern equine encephalitis virus in upstate New York, USA. VII. Virus surveillance 1978-85, description of 1983 outbreak, and series conclusions. *J.Med.Ent.*, Calvert, v. 5, n. 6, p. 501-514, 1988.
35. HSIUNG, G.D. *Diagnostic virology*. 3. ed. London: Yale Univ. Press, 1982. 150 p.
36. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IX Recenseamento Geral do Brasil. *Censo agropecuário*, v. 2, Rio de Janeiro, p. 66-76, 1980.
37. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Pecuária Municipal. Sinapse*, Rio de Janeiro, p. 13, 1988.

38. IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINTO, G.H.; MACEDO, O. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da Região do Vale da Ribeira. IV. Inquérito em escolares residentes no município de Iguape, S.P. (Brasil). *Rev.Saúde Públ.*, São Paulo, v. 7, p. 423-435, 1983.
  
39. JOKLIK, W.K. *Virology*. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1988. 108 p.
  
40. JONKERS, A.H.; SPENCE, L.; DOWNS, W.G.; AITKEN, T.H.G.; WORTH, C.B. Arbovirus studies in Bush Bush Forest, Trinidad, W.I., September 1959-December 1964. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 7, n. 2, p. 285-298, 1968.
  
41. KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z.M.P.; QUEIROZ, L.H.; CUNHA, E.M.S.; CAVALCANTE, E.P.; LANZELOTTI, C.P.A. Diagnóstico diferencial das encefalites em eqüídeos: observações sobre raiva. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA (V : 1990 : São Lourenço). *Anais...* São Lourenço, 1990. p.107.
  
42. KOTAKA, P.I.; CAMARGO, N.J.; PAZELLO, J.F.; SILVEIRA, V.N.A. Vigilância da encefalite no litoral paranaense. *An.Med.Univ.Fed.Pr.*, Curitiba, v. 20, p. 41-45, 1977.
  
43. KUBES, V.; RIOS, F.A. The causative agent of infectious encephalomyelitis in Venezuela. *Science*, Washington, v. 90, p. 20-21, 1939.
  
44. MAIN, A.J.; ANDERSON, K.S.; MAXFIELD, H.K.; ROSENAU, B.; OLIVER, C. Duration of alphavirus neutralizing antibody in naturally infected birds. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 38, n. 1, p. 208-217, 1988.
  
45. MANESS, K.S.C.; CALISHER, C.H. Eastern equine encephalitis in the United States, 1971: past and prologue. *Curr.Microbiol.*, New York, v. 5, p. 311-316, 1981.
  
46. MCLEAN, R.G.; FRIER, G.; PARHAM, G.L.; FRANCY, D.B.; MONATH, T.P.; CAMPOS, E.G.; THERRIEN, A.; KERSCHNER, J.; CALISHER, C.H. Investigations of the vertebrate hosts of eastern equine encephalitis during an epizootic in Michigan, 1980. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 34, p. 1190-1202, 1980.

47. MEHSEN, J.J. Classification of viruses and general considerations. In: FRANKEL, S.; RETTMANS, S.; SONNENWIRTH, A.C. *Grandwol's clinical laboratory methods and diagnosis*. 7. ed. Saint-Louis: The C.V. Mosby, 1970. p. 1624-1632.
48. MEYER, K.F.; HARING, C.; HOWITT, B. The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, 1930. *Science*, Washington, v. 74, p. 227-228, 1931.
49. MITCHELL, C.J.; NIEBYLSKI, M.L.; SMITH, G.C.; KARABATSOS, N.; MARTIN, D.; MUTEBI, J.P.; CRAIG, G.B.; MAHLER, M.J. Isolation of eastern equine encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. *Science*, Washington, v. 257, n. 5069, p. 526-527, 1992.
50. MONATH, T.P. Arthropod-borne viral encephalitides. In: WYNGAARDEN, M.D.; SMITH, L.H. *Cecil textbook of medicine*. 18. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988. p. 1821-1825.
51. MONATH, T.P.; TRENT, D.W. Togaviral diseases of domestic animals. *Comparative diagnosis of viral diseases*. 1. ed. New York: Academic Press Inc., 1981. p. 332-440.
52. MONATH, T.P.; SABATTINI, M.S.; PAULI, R.; DAFFNER, J.F.; MITCHELL, C.J.; BOWEN, G.S.; CROPP, C.B. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic surveys and sentinel equine program. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 34, n. 5, p. 966-975, 1985.
53. NASCI, R.S.; BERRY, R.L.; RESTIFO, R.A.; PARSONS, M.A.; SMITH, G.C.; MARTIN, D.A. Eastern equine encephalitis in Ohio during 1991. *J.Med.Entomol.*, Calvert, v. 30, n. 1, p. 217-222, 1993.
54. NILSON, M.R.; SUGAY, W. Ocorrência da encefalomyelite equina em Itaporanga, Estado de São Paulo. I. Isolamento e identificação do vírus. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 29, p. 63-68, 1962.
55. PRZELOMSKI, M.M.; O'ROURKE, E.; GRADY, G.F.; BERARDI, V.P.; MARKLEY, H.G. Eastern equine encephalitis in Massachusetts: a report of 16 cases, 1970-1984. *Neurology*, Cleveland, v. 38, n. 5, p. 736-739, 1988.

56. QUERALES, J.; PLAZ, J.; FERNÁNDEZ, H.; ACIVE, F. Estudios seroepidemiológico de encefalitis por virus venezolano en la zona de Barlovento. *Rev.Invst.Nac.Hig.*, v. 18, n. 1/2, p. 43-49, 1985.
57. REISEN, W.K.; HARDY, J.L.; REEVES, W.C.; PRESSER, S.B.; MILBY, M.M.; MEYER, R.P. Persistence of mosquito-borne viruses in Kern County, California, 1983-1988. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 43, n. 4, p. 419-437, 1990.
58. PAGAC, B.B.; TURELL, M.J.; OLSEN, G.H. Eastern equine encephalomyelitis virus on *Culiseta melanura* activity at the Patuxent Wildlife Research Center, 1985-1990. *J.Am.Mosq.Control Assoc.*, Albany, v. 8, n. 3, p. 328-330, 1992.
59. PARKS, J.J.; PRICE, W.H. Studies on immunologic overlap among certain arthropod-borne viruses. I. Cross-protection relationships among group A viruses. *Am.J.Hyg.*, Baltimore, v. 67, p. 167-206, 1958.
60. PETERS, J.C.; DALRYMPLE, J.M. Alphaviruses. In: *Virology*. 2. ed. New York: Raven Press, 1990. p. 713-761.
61. POND, W.L.; RUSS, S.B.; ROGERS, N.G.; SMADEL, J.E. Murray Valley encephalitis virus: its serological relationship to the Japanese-West Nile-St.Louis encephalitis group of viruses. *J.Immunol.*, Bethesda, v. 75, p. 78-84, 1955.
62. RICO-HESSE, R.; ROEHRIG, J.T.; TRENT, D.W.; DICKERMAN, R.W. Genetic variation of venezuelan equine encephalitis virus strains of the ID variety in Colombia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 38, n. 1, p. 195-204, 1988.
63. RICO-HESSE, R.; ROEHRIG, J.T.; DICKERMAN, R.W. Monoclonal antibodies define antigenic variation in the ID variety of venezuelan equine encephalitis virus. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 38, n. 1, p. 187-194, 1988.
64. ROEHRIG, J.T.; HUNT, A.R.; KINNEY, R.M.; MATHEWS, J.H. In vitro mechanisms of monoclonal antibody neutralization of alphavirus. *Virology*, San Diego, v. 165, n. 1, p. 66-73, 1988.

65. ROEHRIG, J.H.; MATHEWS, J.H. The neutralization site on the E<sub>2</sub> glycoprotein of venezuelan equine encephalomyelitis (TC-83) virus is composed of multiple conformationally stable epitopes. *Virology*, San Diego, v. 142, n. 2, p. 347-356, 1985.
66. RYDER, S.; BRACHO, D. Antibodies against venezuelan equine encephalitis in the human population of the Nara district of the state of Zulia, Venezuela. *Invest.Clin.*, Maracaibo, v. 31, n. 2, p. 83-89, 1990.
67. SAN MARTIN, C.; DUEÑAS, A. Hemagglutination-inhibition and neutralization test for the venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 8, n. 3, p. 346-348, 1959.
68. SASAKISILVEIRA, M.G.M.; FERREIRA, I.B.; MARTI, A.T.; SZPEITER, N.; TIRIBA, A.C. Inquérito soroepidemiológico para arbovirus na Região de Paranaguá, Estado do Paraná, 1989. *Viroológica*, Rio de Janeiro, n. 2, p. 5, 1990.
69. SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. *Programa de Desenvolvimento da Tração Animal*, Curitiba. 1984. 15 p.
70. SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. *Perfil Agropecuário do Paraná*, Curitiba. 1992. 30 p.
71. SCHERER, W.F.; SAINZ, C.C.; MUCHA MACIAS, J.; RUBIO-BRITO, R.; MIURA, T.; DICKERMAN, R.W.; WARNER, D.W.; DYER, M. Serologic survey for neutralizing antibodies to eastern equine and western equine encephalitis viruses in man, wild birds and swine in southern Mexico during 1961. *Am.Soc.Trop.Med.Hyg.*, Shreveport, v. 15, n. 2, p. 211-218, 1966.
72. SHOPE, R.E.; SATHER, G.E. Arboviruses. In: LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. *Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5. ed. Washington: American Public Health Association, 1979. p. 767-814.
73. SMITH, G.C.; MOORE, C.G.; DAVIS, T.; SAVAGE, H.M.; THAPA, A.B.; SHRESTHA, S.L.; KARABATSOS, N. Arbovirus surveillance in northern Colorado, 1987 and 1991. *J.Med.Entomol.*, Calvert, v. 30, n. 1, p. 257-261, 1993.



74. SOLER NODARSE, M.; MENA PORTALES, J.; DEL BARRIO, G.  
Identificacion de una cepa de encefalomiелitis equina del este aislada de una paloma Columba livia domestica.  
*Rev.Cub.Med.Trop.*, Havana, v. 37, n. 1, p. 12-18, 1985.
75. SPIEGEL, M.R. O Teste de qui quadrado. In: Estatística.  
11. ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1979. p. 331-396.
76. SPONSELLER, M.L.; BBINN, L.N.; WOODING, W.L. Field strains of western equine encephalitis virus in ponies: virologic, clinical, and pathologic observations. *Am.J.Vet.Res.*, Schaumburg, v. 27, p. 1591-1598, 1966.
77. SOUTHAM, C.M.; GREENE, E.L. Clinical application of the hemagglutination-inhibition test for west nile virus antibodies. *J.Infect.Dis.*, Chicago, v. 102, p. 174-178, 1958.
78. SOUZA-LOPES, O.; SACCHETTA, L.A. Isolation of mucambo virus, a member of the venezuelan equine encephalitis virus complex in the state of São Paulo, Brasil.  
*Rev.Inst.Med.Trop.*, São Paulo, v. 20, p. 82-86, 1978.
79. STAMM, D.D. Studies on the ecology of equine encephalomyelitis. *Am.J.Publ.Hlt.*, Washington, v. 48, n.3, p. 328-335, 1958.
80. STANICK, D.R.; WIEBE, M.E.; SCHERER, W.F. Markers of venezuelan encephalitis virus which distinguish enzootic strains of subtype I-D from those of I-E. *Am.J.Epidemiol.*, Baltimore, v. 122, n. 2, p. 234-244, 1985.
81. TEN BROEK, C.; MERRIL, M.H. Serological diferences between eastern and western equine encephalomyelitis virus.  
*Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, Baltimore, v. 31, p. 217-220, 1933.
82. TIKASINGH, E.S.; ARDOIN, P.; GERARD, C.O.R.; DAVIES, J.B. Epidemiological investigations following two human cases of South American strain in Santa Cruz. *Trop.Geog.Med.*, Dordrecht, v. 25, n. 1973, p. 355-361, 1974.
83. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *Manual de procedimentos técnicos para coleta de amostra e diagnóstico laboratorial da encefalomiелites eqüinas*. Belém: Ministério da Saude, Fundação Nacional de Saude, Instituto Evandro Chagas, 1992, 57 p.

84. TRAVASSOS DA ROSA, J.; BRUNO-LOBO, M.; BRUNO-LOBO, G. Estudos sobre os arbovirus. V. Inquérito sorológico e avaliação da imunidade pós vacinal em eqüinos no Rio de Janeiro. *An.Microbiol.IX. pt A*: 213-228, 1961.
85. TULLY, T.N.J.R.; SHANE, S.M.; POSTON, R.P.; ENGLAND, J.J.; VICE, C.C.; CHO, D.Y.; PANIGRAHY, B. Eastern equine encephalitis in a flock of emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Avian Dis.*, Pennsylvania, v. 36, n. 3, p. 808-812, 1992.
86. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovirus na Amazônia Brasileira. *Rev.Inst.Med.Trop.*, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 465-476, 1991.
87. WALDER, R.; SUAREZ, O.M.; CALISHER, C.H. Arbovirus studies in southwestern Venezuela during 1973-1981. II. Isolation and further studies of venezuelan and eastern equine encephalitis, Una, Itaqüi, and Moju viruses. *Am.J.Trop.Hyg.*, Shreveport, v. 33, n. 3, p. 483-491, 1984.
88. WALTON, T.E.; JOCHIM, M.M.; BARBER, T.L.; THOMPSON, L.H. Cross-protective immunity between equine encephalomyelitis viruses in equids. *Am.J.Vet.Res.*, Schaumburg, v. 50, n. 9, p. 1442-1446, 1989.
89. WIGG, M.D. *Isolamento de uma amostra de vírus WEE em Haemagogus janthinomys*. Rio de Janeiro, 1977. Tese (Mestrado)- Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
90. WILSON, J.H.; RUBIN, H.L.; LANE, T.J.; GIBBS, E.P.J. A survey of eastern equine encephalomyelitis in Florida horses: prevalence, economic impact, and management practices, 1982-1983. *Prev.Vet.Med.*, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 261-271, 1986.
91. WONG-CHIA, D.C.; SCHERER, W.F. Aislamento del virus de la encefalitis venezolana de um murcielago frugivoro (*Artibeus turpis*) em Mexico. *Bol.Ofic.Sanit.Panam.*, Washington, v. 4, p. 339-343, 1971.
92. YAMAMOTO, K.; HASHIMOTO, K; CHIBA, J.; SIMIZU, B. Properties of monoclonal antibodies against glycoproteins of western equine encephalitis virus. *J.Virol.*, Washington, v. 55, n. 3, p. 840-842, 1985.