

Infecção pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental em equinos no Estado de São Paulo

West Nile Fever Virus Infection in Horses in São Paulo State, Brazil

Renata Farinelli de Siqueira¹, Viviane Soares Hansen², Maria de Fátima Monteiro Martins²,
Marta Lizandra do Rêgo Leal¹ & Eduardo Fernandes Bondan²

ABSTRACT

Background: The West Nile virus (WNV) antibodies were reported in Brazil in the serum samples taken from horses and birds in the Midwest region and Paraíba state in 2008 and 2013, respectively. In 2014, the first human case was confirmed in a rural worker in the state of Piauí and, in 2018, the virus was isolated from the central nervous system of a horse with nervous symptoms in the state of Espírito Santo. The virus is a member of the Flaviviridae family of the genus Flavivirus (neurotropic), infecting several mammalian species, with humans and horses being the most susceptible. Approximately 35% of horses develop clinical signs, thus they are considered the best sentinels for this disease. The aim of this case report is to describe the first confirmed cases of West Nile Fever (WNF) in two horses in the state of São Paulo.

Cases: Two horses with neurological symptoms were treated at the Veterinary Hospital of Cruzeiro do Sul University (São Paulo, SP), in 2019. Both horses came from neighboring regions that have a large Atlantic Forest preservation area and are also routes for migratory birds, known to be competent hosts for transmitting the West Nile Fever virus, such as the swallow, the falcon and the hawk. The first one had symptoms, such as weakness and sporadic seizures; however, after recovering, it was hospitalized a few days later due to kidney failure and laminitis. The second one showed incoordination, pelvic limb weakness, and was walking in circles, evolving to seizures. Both animals were euthanized, and their central nervous system samples and total blood samples were tested for rabies, herpes virus, and WNV; the first 2 tests showed negative results. Ribonucleic acids (RNA) were extracted from erythrocytes using the polymerase chain reaction (PCR) technique in-house. The WNV-specific reverse transcription-polymerase chain reaction amplification products were obtained using the nested PCR-multiplex PCR combination.

Discussion: Since the 1940s, several WNF outbreaks have been reported around the world (Africa, Europe, Asia and Middle East). In the 2000s, the USA had the most amount of WNF cases reported; cases started being reported in Central and South America in the following years. The virus was identified for the first time in Brazil in 2014. Since then, our country is a route for migratory birds, with many states still having forests, several arboviruses are found such as WNF, which could become a public health problem. Both horses in the present study showed neurological signs and the horse that recovered had renal failure. Such signs are inconclusive, however, similar to those that occur in humans infected by the virus in its neurotropic form. The emergence of new diseases is an important aspect of public health. The literature is vast regarding the description of the pathogenesis, clinical signs, diagnosis, viral persistence and sequelae of WNF in humans, however, it is scarce regarding the viral persistence and sequelae of the disease in horses. Future studies are needed to understand the post-infection period in horses, as they are the most sensitive animals along with humans to this virus. Here, we report the first confirmed cases of WNF in the city of São Paulo to bring awareness about considering this disease while diagnosing horses with nervous system disorders.

Keywords: encephalitis, horses, flavivirus, mosquito.

Descritores: encefalite, equinos, flavivírus, mosquito.

DOI: 10.22456/1679-9216.117796

Received: 25 August 2021

Accepted: 19 November 2021

Published: 13 January 2022

¹Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil. ²Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP, Brazil. Correspondence: R.F. Siqueira [refarinelli@gmail.com]. CCR - UFSM. Av. Roraima n. 1000. HVU prédio 97. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

O WNV é um membro da família Flaviviridae do gênero *Flavivirus*, neurotrópico, que infecta várias espécies de mamíferos, sendo humanos e equinos os mais suscetíveis [2]. Aproximadamente 35% dos cavalos desenvolvem sinais clínicos, sendo considerados os melhores sentinelas para esse vírus e surtos de doença neurológica geralmente precedem casos em humanos [22].

Aves são reservatórios e amplificadoras do vírus na natureza e a competência em amplificar depende da espécie da ave em questão. Passeriformes (mais de 6.000 espécies), aves aquáticas, falconiformes e corujas desenvolvem um nível de viremia capaz de infectar os mosquitos transmissores (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Mansonia*) e por sua vez, estes, infectarão os cavalos. Já as columbiformes, piciformes e anseriformes (patos e gansos) são mais resistentes à doença e, geralmente, desenvolvem baixa viremia. Aves migratórias de longa distância são, provavelmente, as maiores responsáveis pela distribuição do vírus entre países e continentes [2].

No Brasil, foi demonstrada a circulação viral pela detecção de anticorpos em soro de equinos e aves da Região Centro-Oeste (Pantanal) em 2008 [21] e, em 2013, na Paraíba [27]. Em 2014, houve a confirmação do primeiro caso humano em um trabalhador rural no estado do Piauí [29] e, em 2018, foi isolado o vírus do sistema nervoso central de um equino com sintomatologia nervosa no Espírito Santo [14].

O objetivo do relato é descrever os primeiros casos confirmados de Febre do Nilo Ocidental (FNO) em 2 equinos no estado de São Paulo.

CASOS

Em julho de 2019, foram atendidos no Complexo Veterinário da Universidade Cruzeiro do Sul (São Paulo, SP), 2 cavalos com histórico de doença neurológica, ambos provenientes de regiões vizinhas. Um, do bairro de Itaquera, zona leste da cidade de São Paulo que possui o Parque Natural Municipal Fazenda do Carmo, uma área de preservação da Mata Atlântica e corresponde a 39,38% da cobertura vegetal urbana. O outro, de São Bernardo do Campo, município que faz divisa com a zona leste da cidade de São Paulo e abriga 46,81% da vegetação nativa da Mata Atlântica do território nacional [20].

Ambos os equinos não saíam de suas respectivas propriedades e habitavam áreas próximas a

matas as quais são rotas de aves migratórias tais como: andorinha (*Hirundo rustica*), comum nos habitats de brejos, banhados, lagos e áreas antropizadas; falcão (*Falco peregrinus*), de áreas antropizadas; e o gavião (*Buteo swainsoni*) de mata mesófila semidecídua, aves que migram para a América latina, com anticorpos contra WNV e/ou RNA viral de WNV. O pardal (*Passer domesticus*) de áreas antropizadas, capaz de transmitir WNV e já registrado no Estado de São Paulo, poderia ter o papel de hospedeiro amplificador do WNV [7].

O primeiro animal era um macho castrado de 9 anos, da raça American Trotter e a queixa do proprietário era que, alguns dias antes da internação, quando atrelava o cavalo ao “sulky” ele não trotava em linha reta. Houve piora progressiva do quadro com o equino apresentando incoordenação de membros pélvicos ao passo, sendo então levado ao hospital. O segundo cavalo, macho castrado de 12 anos, utilizado para hipismo, antes de ser atendido no hospital universitário havia apresentado episódios de convulsões e internado em outro hospital veterinário, onde foram realizadas sorologias (imunoensaio enzimático ELISA) para alfa herpesvírus equino e WNV, sendo ambas negativas. Quando retornou à hípica onde residia, em São Bernardo do Campo (SP), apresentou um quadro de cólica e laminite como consequência. Foi então encaminhado ao Complexo Veterinário da Universidade Cruzeiro do Sul situado na cidade de São Paulo por seu veterinário, que relatou o ocorrido anteriormente. Na Tabela 1 são descritos os sinais clínicos neurológicos inespecíficos manifestados pelos 2 cavalos.

A suspeita clínica do Cavalo 1 foi Encefalomielite Protozoária Equina e realizou-se o tratamento com ponazuril manipulado [5 mg/kg v.o., SID], DMSO¹ [1 g/kg a 10% i.v., SID], flunixin meglumine² [1,1 mg/kg i.v., SID], sulfadiazina³ [20 mg/kg i.v., SID]. No segundo dia de administração da medicação, o cavalo apresentou reação cutânea nodular generalizada. Foi, então, incluído no tratamento dexametasona⁴ [20 mg i.m., por 3 dias]. A partir daí, houve melhora clínica e o cavalo permaneceu em estação, caminhando pelo hospital, embora ainda incoordenado. Alguns dias depois houve piora significativa, com o cavalo apresentando paralisia flácida de membros pélvicos, recumbência e episódios seguidos de convulsões com intervalos curtos e optou-se pela eutanásia.

Na data da admissão o Cavalo 2 apresentou insuficiência renal aguda (ureia 111 mg/dL e creatinina 9 mg/dL) e laminite crônica com afundamento da terceira falange, nos 4 membros. Os demais parâmetros se encontravam dentro da normalidade para a espécie. Foi instituído um tratamento com fluidoterapia, plasma, flunixin meglumine² [1,1 mg/kg i.v., SID] e analgésicos como cetamina⁵ [0,20 mg/kg i.v., SID] e cloridrato de tramadol⁵ [2 mg/kg i.v., SID]. Após o terceiro dia de internação, o cavalo apresentou descolamento dos cascos e optou-se pela eutanásia.

Amostras do sistema nervoso central de ambos os cavalos foram enviadas ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo para a realização de exame de raiva e amostras de sangue total e líquido foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, MG) para exames de alfa herpesvírus equino e WNV, com resultado negativo para o primeiro e positivo para o segundo.

Para a realização do exame, a extração do RNA a partir das hemácias e amplificação viral seguiu uma técnica descrita previamente [5]. Amostras de sangue total foram centrifugadas a 1.260 g por 20 min e as frações do plasma e papa de leucócitos foram separadas e armazenadas a 4°C. As células vermelhas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) por centrifugação a 1.260 g por 10 min, 3 vezes, e armazenadas a 4°C. RNAs de cada unidade separada (plasma, lavado de hemáceas e “papa” de leucócitos) foram extraídos utilizando o QIAmp Viral RNA Mini kit⁷ seguindo as especificações do fabricante.

A investigação diagnóstica de arbovírus foi realizada por RT-PCR. *Primers* degenerados específicos do WNV: *primers* diretos (+) AACCKCCAGAAGGAGTSAAR e *primers* reversos (-) AGCYTCRAACTCCAGRAAGC foram usados na segunda reação de *nested* PCR visando o gene NS5 após uma amplificação RT-PCR de flavivírus específico do gênero [23]. Um fragmento sintético parcial do gene NS58 foi usado como controle positivo e como controle negativo das reações, utilizou-se RNA extraído de hemácias lavadas em equinos, plasma e papa leucocitária previamente testados negativos para arbovírus, alfa herpesvírus equino 1 e 4 e doença de Borna. Realizou-se *nested* PCR para alfa herpesvírus equino 1 e RT-PCR para doença de Borna.

As amostras de RNA positivas para WNV em RT-PCR de hemácias lavadas foram então submetidas a um protocolo de síntese de cDNA [8]. Um esquema iniciador de PCR multiplex foi então projetado para gerar sequências completas de genomas por meio de sequenciamento de nanopore portátil, usando o esquema Primal (<http://primal.zibraproject.org>) e as condições de termociclagem envolveram 40 ciclos conforme relatadas anteriormente [25]. O novo genoma foi sequenciado utilizando o aplicativo Genoma Detective (<https://www.genomedetective.com/app>) e depositado no GenBank com os números de acesso MW420987 e MH643887.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi devidamente comunicado e, por sua vez, enviou as amostras positivas ao Instituto Evandro Chagas, que confirmou o diagnóstico.

DISCUSSÃO

Embora a maioria dos cavalos infectados pelo WNV não manifestem a doença, quando desenvolvem sinais clínicos, estes são neurológicos (Tabela 1). Urinam e defecam normalmente e a maioria não fica inapetente, mesmo quando permanecem em decúbito [3, 11].

O primeiro cavalo do presente relato apresentou paresia de ambos os membros pélvicos, que rapidamente evoluiu para paralisia flácida e também apresentou uma reação cutânea nodular, aguda e generalizada. Reação cutânea também é relatada em humanos com FNO [2]. A melhora clínica dos sinais neurológicos após a administração de corticoide também é relatada em humanos tratados para a forma neurotrópica da FNO que apresentam meningoencefalite [18], porém, em humanos é relatado o “efeito Lázaro” provocado por esses fármacos, caracterizado pela melhora clínica seguida de imunossupressão e óbito [13]. Os sinais neurológicos do cavalo do presente relato pioraram após a suspensão do uso do corticoide, evoluindo para paralisia e convulsões.

O segundo cavalo foi admitido no hospital com laminite e histórico de doença neurológica inconclusiva previamente à internação. Cavalos imunocompetentes podem demonstrar sinais subclínicos da forma neuroinvasiva ou se recuperam da doença [6], fato que ocorreu com o cavalo do presente relato. Porém, ele também apresentou insuficiência renal aguda, aparentemente sem relação com a laminite ou com a compactação de cólon maior que originou a laminite, visto que o

Tabela 1. Sinais clínicos neurológicos inespecíficos observados em dois cavalos com diagnósticos confirmados de Febre do Nilo Ocidental, no estado de São Paulo em 2019.

Sinal clínico	Cavalo 1	Cavalo 2
Andar em círculos	Sim	Não
Ataxia	Sim	Não
Tremores musculares	Sim	Sim
Paresia de membros pélvicos	Sim	Não
Decúbito	Sim	Não
Paralisia flácida	Sim	Não
Convulsões	Sim	Sim
Recuperação	Não	Sim

animal estava hidratado e a cólica havia se resolvido há alguns dias. Estudos em humanos [2] relatam que pacientes podem desenvolver insuficiência renal como consequência da infecção pelo vírus da FNO até 30 dias e, após a recuperação, apresentam insuficiência renal aguda e insuficiência renal crônica em até 3 anos. Lesões renais são mais prevalentes em pacientes que tiveram a forma neuroinvasiva que em pacientes que tiveram a forma febril.

O vírus da FNO foi isolado e identificado pela primeira vez em uma mulher de Uganda (África) em 1937. Até a década de 90, algumas epidemias foram relatadas em outros países da África (África do Sul, Senegal e Quênia), Ásia (Índia), Oriente Médio (Israel e Irã) e Europa (França, Espanha, Rússia, República Tcheca, Romênia, Portugal e Áustria), tanto em humanos quanto em cavalos [4,6,11]. A partir dos anos 90, o número de surtos e a severidade da doença vêm aumentando. Em 1996, houve um surto no Marrocos que infectou 94 cavalos e matou 42 animais. Em Israel, 400 pessoas foram infectadas, sendo 325 hospitalizadas e 33 mortas. Nesse mesmo momento, 75 cavalos foram diagnosticados com a encefalite, 15 morreram e, desta vez, houve também grande número de mortes em aves [6].

Em 1998, a doença foi introduzida nos Estados Unidos, provavelmente, por um passageiro em viremia vindo de Israel [19]. Surpreendentemente, houve uma rápida adaptação do ciclo do vírus envolvendo aves e mosquitos americanos, o que causou uma epizootia e levou à morte aves, humanos e cavalos, tornando-se, assim, um problema de saúde pública [9,28]. Em

2002, o surto se espalhou por 44 estados americanos e chegou ao Canadá e Caribe e foram diagnosticados; 4.000 casos de encefalite humana com 284 óbitos; aproximadamente 15.000 casos confirmados laboratorialmente de encefalite equina e 16.500 mortes de pássaros [6]. De acordo com a “American Association of Equine Practitioners” (AAEP), mais de 25.000 casos de encefalite equina foram atribuídos à Febre do Nilo Ocidental desde 1999 [12]. Em 2003, houve relato da doença em Cuba, acometendo humanos e equinos [24]. Evidência sorológica de Febre do Nilo Ocidental na América do Sul foi documentada, em cavalos, pela primeira vez em 2005 na Colômbia [15], em 2006, na Guatemala [17] e na Argentina [16].

O vírus da FNO foi isolado no Brasil em um humano em 2014 [29] no estado do Piauí e em cavalos em 2018 [27] no estado do Espírito Santo e agora relatamos no estado de São Paulo, demonstrando assim, a circulação do vírus no país.

A emergência de novas doenças é um aspecto importante para a saúde pública. A literatura é vasta quanto à descrição da patogenia, sinais clínicos, diagnóstico, persistência viral e sequelas da WNF em humanos, porém, escassa quanto a persistência viral e sequelas da doença em cavalos. Futuros estudos são necessários para a compreensão do período pós infecção em equinos, visto que são os animais mais sensíveis junto com os humanos a essa virose.

Relatamos aqui os primeiros casos confirmados de WNF na cidade de São Paulo e alertamos para a importância da inclusão dessa doença no diagnóstico diferencial em cavalos com afecções

do sistema nervoso e da notificação de suspeita aos órgãos competentes.

MANUFACTURERS

¹Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

²J.A. Saúde Animal. Patrocínio Paulista, SP, Brazil.

³Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁴Chemitec - Produtos Veterinários. São Paulo, SP, Brazil.

⁵União Química Farmacêutica Nacional S.A. São Paulo, SP, Brazil.

⁶Qiagen Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

⁷Integrated DNA Technologies. Coralville, IA, USA.

Acknowledgments. To Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, M.G.) for taking the exams.

Declaration of interest. The authors declare no conflicts of interest. The authors were responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Barzon L., Pacenti M. & Palù G. 2013. West Nile virus and kidney disease. *Expert Reviews*. 11(5): 479-485.
- 2 Bahuon C., Marcillaud-Pitel C., Bournez L., Leblond A., Beck C., Hars J., Leparç-Goffart I., L'Ambert G., Paty M.C., Cavalerie L., Daix C., Tritz P., Durand B., Zientara S. & Lecollinet S. 2016. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Revue Scientifique et Technique*. 35(3): 811-824.
- 3 Browne C., Glendenning E., Medlock J. & Roberts H. 2019. West Nile Fever in Europe in 2018: an emerging problem or just an anomaly? *Veterinary Record*. 185: 365-368.
- 4 Campbell G., Marfin A.A., Lanciotti R.S. & Gubleret D.J. 2022. West Nile virus. *Lancet Infectious Diseases*. 2: 519-529.
- 5 Costa E.A., Giovanetti M., Catenacci L.S., Fonseca V., Aburjaile F., Levy F., Xavier J., Iani F.M.C., Vieira M.A.C.S., Henriques D.F., Almeida D.B., Guedes M.I.M.C., Santos B.S.A.S., Silva A.S.G, Maranhão R.P.A., Siqueira R.F., Oliveira T., Cavalcante K.R.L.J., Moura N.F.O., Romano A.P.M., Albuquerque C.F.C., Feitosa L.C.S., Bayeux J.J.M., Teixeira R.B.C., Lobato O.L., Silva S.C., Filippis A.M.B., Cunha R.V., Lourenço J. & Alcantara L.C.J. 2021. West Nile Virus in Brazil. *Pathogens*. 10(7): 896-916.
- 6 Dhama K. & Pawaiya R. 2004. West Nile infection in horses. *Veterinary Research*. 35: 467-483.
- 7 Dibo M.R., Menezes R.M.T., Ghirardelli C.P., Mendonça A.L. & Chiaravolloti Neto F. 2011. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(4): 496-503.
- 8 Faria N.R., Quick J., Claro I.M., Thézé J., Jesus J.G., Giovanetti M., Kraemer M.U.G., Hill S.C., Black A., Costa A.C., Franco L.C., Silva S.P., Wu C.H., Raghwanji J., Cauchemez S., du Plessis L., Verotti M.P., Oliveira W.K., Carmo E.H., Coelho G.E., Santelli A.C.F.S., Vinhal L.C., Henriques C.M., Simpson J.T., Loose M., Andersen K.G., Grubaugh N.D., Somasekar S., Chiu C.Y., Muñoz-Medina J.E., Gonzalez-Bonilla C.R., Arias C.F., Lewis-Ximenez L.L., Baylis S.A., Chieppe A.O., Aguiar S.F., Fernandes C.F., Lemos P.S., Nascimento B.L.S., Monteiro H.A.O., Siqueira I.C., Queiroz M.G., Souza T.R., Bezerra J.F., Lemos M.R., Pereira G.F., Loudal D., Moura L.C., Dhalia R., França R.F., Magalhães T., Marques Jr. E.T., Jaenisch T., Wallau G.L., Lima M.C., Nascimento V., Cerqueira E.M., Lima M.M., Mascarenhas D.L., Moura Neto J.P., Levin A.S., Tozetto-Mendoza T.R., Fonseca S.N., Mendes-Correa M.C., Milagres F.P., Segurado A., Holmes E.C., Rambaut A., Bedford T., Nunes M.R.T., Sabino E.C., Alcantara L.C.J., Loman N.J. & Pybus O.G. 2017. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 5(2): 46-406.
- 9 Figueiredo L.T.M. 2019. West Nile virus infection in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 52: e:20190226.
- 10 Garcia M., Hasbun R. & Murray K.O. 2015. Persistence of West Nile virus. *Microbes and Infection*. 17(2): 163-168.
- 11 Heus P., Kolodziejek J., Camp J.V., Dimmel K., Bagó Z., Hubalek Z., van den Hoven R., Cavalleri J.M.V. & Nowontny N. 2020. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transbound Emerging Diseases*. 67: 1189-1197.
- 12 Kerr S. 2016. West Nile virus. *Washington State University Extension* bulletin. FS201E: 1-6.[<https://research.libraries.wsu.edu/xmlui/bitstream/handle/2376/6027/FS201E.pdf?sequence=1&isAllowed=y>]
- 13 Leis A.A. & Sinclair D.J. 2019. Lazarus effect of high dose corticosteroids in a patient with West Nile virus encephalitis: a coincidence or a clue? *Frontiers in Medicine*. 6: 81-88.

- 14 Martins L.C., Silva E.V.P., Casseb L.M.N., Silva S. P., Cruz A.C.R., Pantoja J.A.S., Medeiros D.B.A., Martins Filho A.J., Cruz E.R.M., Araújo M.T.F., Cardoso J.F., Cunha M.A.C.R., Almada G.L., Romano A.P.M., Santos MG.D.P., Rodrigues G.A.P., Chiang J.O., Quaresma J.A.S., Carvalho V.L. & Vasconcellos P.F.C. 2019. First isolation of West Nile virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 114: e:180332.
- 15 Mattar S., Edwards E., Languado J., González M., Alvarez J. & Komar N. 2005. West Nile antibodies in Colombian horses. *Emerging Infectious Diseases*. 11(9): 1497-1498.
- 16 Morales M.A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J., Vissanti A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S. & Enría D. 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 12(10): 651-653.
- 17 Morales-Betoulle M.E., Blitvich B.J., Davis E.A., Klein R. & Córdón-Rosales C. 2006. West Nile virus in Guatemala. *Emerging Infectious Diseases*. 12(6): 1038.
- 18 Narayanaswami P., Edwards L., Hyde C., Page C. & Hastings N.E. 2004. West Nile meningitis/encephalitis: experience with corticosteroid therapy. *Neurology*. 62: A404.
- 19 Nash D., Mostashari F., Finne A., Miller J., O'Leary D., Murray K., Huang A., Rosemberg A., Greenberg A., Sherman M., Wong S., Campbell G.L., Roehing J.T., Gubler D.J., Shieh W.J., Zaki S., Smith P. & Layton M. 2001. The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *New England Journal of Medicine*. 344: 1807-1814.
- 20 Oliveira V.P. 2020. Mapeamento Digital da Cobertura Vegetal do Município de São Paulo. Relatório Final. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente / Coordenação de Planejamento Ambiental. São Paulo. [https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/meio_ambiente/RelCobVeg2020_vFINAL_compressed(1).pdf]
- 21 Pauvolid-Corrêa A., Morales M.A., Levis S., Figueiredo L.T.M., Couto-Lima D., Campos Z., Nogueira M.F., Silva E.E., Nogueira R.M.R. & Schatzmayr H.G. 2011. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 106: 467-474.
- 22 Petersen L. R. & Marfin A.A. 2005. Shifting epidemiology of Flaviviridae. *Journal of Travel Medicine*. 12: S3-S11.
- 23 Pfeffer M., Proebster B., Kinney R.M. & Kaaden O.R. 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase 495 chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 57(2): 709-718.
- 24 Pupo M., Guzmán M. G., Fernández R., Llop A., Dickinson F.O., Pérez D., Cruz R., González T., Estévez G., Gonzáles H., Santos P., Kourí G., Andonova M., Lindsay R., Artsob H. & Drebot M. 2006. West Nile virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerging Infectious Diseases*. 12(6): 1022-1024.
- 25 Quick J., Gubaugh N.D., Pullman S.T., Claro I.M., Smith A.D., Gangavarapu K., Oliveira G., Robles-Sikisaka R., Rogers T.F., Beutler N.A., Burton D.R., Lewis-Ximenez L.L., Jesus J.G., Giovanetti M., Hill S.C., Black A., Bedford T., Carroll M.W., Nunes M., Alcântara Junior L.C., Sabino E.C., Baylis S.A., Faria N.R., Loose M., Simpson J.T., Pybus O.G., Andersen K.G. & Loman N.J. 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature*. 12(1): 1261-1276.
- 26 Silva A.S.G., Matos A.C.D., Cunha M.A.C.R., Rehfeld I.S., Galinari G.C.F., Marcelino S.A.C., Saraiva L.H.G., Martins N.R.S., Maranhão R.P.A., Lobato Z.I.P., Pierezan F., Guedes M.I.M.C. & Costa E.A. 2019. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transbound Emerging Diseases*. 66: 445-453.
- 27 Silva J.R., Medeiros L.C., Reis V.P., Chávez J.H., Munhoz T.D., Borges G.P., Soares O.A.B., Campos C.H.C., Machado R.Z., Baldini C.D., Silva M.L.C.R., Faria J.L.M., Silva E.E. & Figueiredo L.T.M. 2013. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(7): 921-923.
- 28 Trock S.C., Meade B.J., Glaser A.L., Ostlund E.N., Lanciotti R.S., Cropp B.C., Kulasekera V., Kramer L.D. & Komar N. 2001. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 745-747
- 29 Vieira M.A.C.S., Romano A.P.M., Borba A.S., Silva E.V.P., Chiang J.O., Eulálio K.D., Azevedo R.S.S., Rodrigues S.G., Almeida-Neto W.S. & Vasconcellos P.F.C. 2015. West Nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 93(2): 377-379.