

**PAULO MIRA BATISTA**

**ARBOVIROSES EM PRIMATAS NÃO HUMANOS CAPTURADOS EM MATO  
GROSSO DO SUL**

**CAMPO GRANDE  
2011**

**PAULO MIRA BATISTA**

**ARBOVIROSES EM PRIMATAS NÃO HUMANOS CAPTURADOS EM MATO  
GROSSO DO SUL**

Dissertação de mestrado apresentada para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas em Parasitárias, pela Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandeta” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Renato Andreotti e Silva

**CAMPO GRANDE  
2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por orientar e colocar no meu caminho todas as pessoas que participaram direta e indiretamente das atividades desenvolvidas durante meu trabalho.

Aos meus pais pela dedicação e confiança que depositaram em mim, e pela ajuda financeira.

Ao meu orientador, Renato Andreotti, pelas idéias e orientações que foram passadas para o meu crescimento profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela ajuda e orientações prestadas.

Agradeço a Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul por disponibilizar os materiais permanentes e de consumo utilizados para realização desse trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas, setor de arbovirologia, pela realização dos testes de diagnóstico utilizados nesse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, Paulo Silva de Almeida, Gislane Coelho Brandão, Susana Martins, João Nascimento, José de Oliveira e Ezequiel P. Ramos, pela colaboração técnica durante a coleta dos vetores e dos animais.

Às Secretarias Municipais de Saúde de Bonito e Jardim pelo apoio técnico e logístico durante os trabalhos de Campo.

Aos colegas Alisson Cordeiro Marques, Rondinely Wesley do Couto, Maria Elizabeth G. Rocha e Jhoy Alves Leite pelo companheirismo e apoio técnico durante os trabalhos de campo.

Ao Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Mato Grosso do Sul pelo apoio, principalmente da colega Roberta Martins Passos Humberg.

## RESUMO

No período de fevereiro a setembro de 2010 foram realizados inquéritos soropidemiológico em primatas não humanos e captura de vetores transmissores, com o intuito de investigar a possível circulação de arboviroses nos municípios de Bonito, Campo Grande e Jardim, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram utilizados 65 primatas de vida livre e de cativeiro e potenciais vetores, utilizando capturados de Castro, atração humana e puçás. As amostras séricas foram testadas pelo método de diagnóstico de inibição da hemaglutinação para a detecção de anticorpos totais contra 19 diferentes arbovírus e a tentativa de isolamento viral (camundongo recém-nascido e linhagem celular-clone C6/36) nas amostras séricas e suspensões de artrópodes. A identificação das espécies vetoriais foram realizadas no Instituto Evandro Chagas-IEC no estado do Pará. Das 19 amostras séricas do município de Campo Grande, 1 apresentou título de 1:20 para *Flavivirus*. Das 35 amostras coletadas em Bonito, 17 apresentaram anticorpos para arbovírus, sendo 4 (11,4%) positivos para *Alphavirus*, e 5 (14,28%) positivos para *Flavivirus*. Reações monotípicas foram observados para o vírus Mayaro (n=10) e para o vírus Oropouche (n=5) e 6 (17,1%) amostras apresentaram títulos para mais de um dos vírus estudados. Foram capturados 120 culicídeos potenciais transmissores de arbovírus no município de Jardim. Todas as amostras coletadas foram negativas para o isolamento viral. Por possuir variedade de hospedeiros vertebrados e vetores transmissores, o estado do Mato Grosso do Sul apresenta condições propícias para a emergência ou reemergência de arboviroses, inclusive algumas patogênicas para os seres humanos.

Palavras-chave: primatas não humanos, vetores de doenças, arboviroses.

## ABSTRACT

In the period from February to September 2010 sero-epidemiological surveys were conducted on nonhuman primates and the transmitter vector capture, in order to investigate the possible circulation of arboviruses in the municipalities of Bonito, Campo Grande and Jardim, in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. A total of 65 primates from the wild and captivity were used and captured potential vectors using a Castro sucking tube with human landing trap and dip nets. Serum samples were tested by hemagglutination inhibition test for detection of total antibodies against 19 different arboviruses and the virus isolation attempt (newborn mice and cell line clone C6/36) in serum samples and arthropod suspensions. The vector species identification were conducted at Instituto Evandro Chagas-IEC in the state of Pará. From the 19 serum samples of Campo Grande municipality, 1 presented 1:20 title for *Flavivirus*. From 35 samples collected in Bonito, 17 presented antibodies for arboviruses, 4 (11,4%) were positive for *Alphavirus*, and 5 (14,28%) were positive for *Flavivirus*. Monotypic reactions were observed for the Mayaro virus (n = 10) and for Oropouche virus (n = 5) and 6 (17,1%) samples presented titles for more than one of the viruses studied. One hundred twenty culicidae potential arbovirus transmitters were captured in the town of Jardim. All collected samples were negative for virus isolation. By having variety of vertebrate hosts and transmission vectors, Mato Grosso do Sul present ideal conditions for the emergence or reemergence of arboviruses, including some pathogenic for human beings.

Key words: nonhuman primates, disease vectors, arboviruses.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de transmissão dos arbovírus e sua relação com os hospedeiros	10
Figura 2 - Estrutura dos vírus pertencentes a família <i>Flaviviridae</i> . Representação do núcleo capsídeo icosaédrico circundando o RNA viral, apresentando um envelope derivado da membrana de células hospedeiras, glicoproteína E, proteína de membrana	13
Figura 3 - Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina para febre amarela no Brasil	16
Figura 4 - Ciclo urbano e silvestre da febre amarela	19
Figura 5 - Municípios de realização do estudo sobre a circulação de arbovírus em primatas não humanos, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	40
Figura 6 - Imagem de satélite do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	41
Figura 7 - Imagem de satélite do Balneário Municipal no município de Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	42
Figura 8 - Imagem de satélite do Balneário do Sol no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	43
Figura 9 - Imagem de satélite do Hotel Cabanas no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	44
Figura 10 - Exemplares de primatas do gênero <i>Cebus</i> capturados durante o estudo nos municípios de Bonito e Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010	46
Figura 11 - Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos	47
Figura 12 - Dardos anestésicos de diferentes volumes utilizados em Zarabatanas para sedação dos animais	48
Figura 13 - Procedimentos com animais sedados	49
Figura 14 - Método utilizado para captura de vetores com capturados de Castro, atração humana e puçás	50

Figura 15 - Leitura de microchip após aplicação na região interescapular em um *Cebus* capturado

50

## LISTA DE ABREVIações

C – Capsídeos

CRAS – Centro de Reabilitação de Animais Silvestres

DNAc – Ácido desoxirribonucléico complementar (DNAc)

E – Proteína do envelope de *Flavivirus*

ECP- Efeito citopático

EEV – Encefalite Equina Venezuelana

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ESPIN – Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional

EUA – Estados Unidos da América

FA – Febre Amarela

FAS – Febre Amarela Silvestre

FAU – Febre Amarela Urbana

FC – Teste de fixação de complemento

FNO – Febre do Nilo Ocidental

GPS – *Global Positioning System*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IEC – Instituto Evandro Chagas

IFI – Teste de imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IH – Teste de inibição de hemaglutinação

ILHV – Vírus Ilhéus

JEC – Complexo da Encefalite Japonesa

MAY – Mayaro

M-PCR – *multiplex polymerase chain reaction*

N-PCR – *nested polymerase chain reaction*

NT – Teste de neutralização

ORO – Oropouche

pM – Proteína pré-membrana de *Flavivirus*

PNH - Primatas não humanos

RNA – Ácido ribonucléico

ROC – Rocio

RT-PCR – Reação em Cadeia de Polimerase com Transcriptase Reversa

SLE - Encefalite de Saint Louis

SLEV - Vírus da Encefalite de Saint Louis

UHE – Usina hidroelétrica

VDEN – Vírus Dengue

VEEE – Vírus da Encefalite Equina do Leste

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

VEEW – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

VFA - Vírus da Febre Amarela

VMAY - Vírus Mayaro

VNO – Vírus do Nilo Ocidental

VORO - Vírus Oropouche

VROC – Vírus Rocio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
<b>2.1 Arboviroses</b> .....	10
<u>2.1.1 Febre amarela</u> .....	15
<u>2.1.2 Encefalite de Saint Louis</u> .....	22
<u>2.1.3 Mayaro</u> .....	24
<u>2.1.4 Febre do Nilo Ocidental</u> .....	26
<u>2.1.5 Oropouche</u> .....	28
<u>2.1.6 Rocio</u> .....	29
<b>2.2 Utilização de “animais-sentinela” na vigilância das arboviroses</b> .....	30
<u>2.2.1 Vigilância de epizootias em primatas não humanos</u> .....	32
<u>2.2.2 Inquéritos sorológicos em “animais sentinelas”</u> .....	33
<b>3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA</b> .....	38
<b>4 OBJETIVO</b> .....	39
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	39
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	39
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>5.1 Tipo de pesquisa</b> .....	40
<b>5.2. Local e período da pesquisa</b> .....	40
<b>5.3 Fontes de dados</b> .....	45
<b>5.4.Procedimentos para coleta de dados</b> .....	46
<u>5.4.1 Proteção imunitária</u> .....	46
<u>5.4.2 Equipamentos de proteção individual (EPI)</u> .....	46
<u>5.4.3 Animais</u> .....	47
<u>5.4.4 Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos</u> .....	47
<u>5.4.5 Procedimentos com animais sedados</u> .....	49
<u>5.4.6 Colheita de Material Biológico</u> .....	49
<u>5.4.7 Coleta de vetores</u> .....	50
<u>5.4.8 Aplicação do microchip (“transponder”) de identificação</u> .....	51
<u>5.4.9 Término dos procedimentos, acompanhamento e soltura dos animais</u> .....	52
<u>5.4.10 Diagnóstico laboratorial</u> .....	52
<b>5.5 Aspectos éticos</b> .....	53
<b>6 RESULTADOS</b> .....	55
<b>6.1 Resultados dos testes sorológicos por Inibição de Hemaglutinação (IH)</b> .....	55
<b>6.2 Resultados dos testes de isolamento viral</b> .....	59
<b>6.3 Resultados da captura de vetores</b> .....	59
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>APÊNDICE A</b> .....	80
<b>ANEXO A</b> .....	82
<b>ANEXO B</b> .....	83
<b>ANEXO C</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, por se tratar de espécies arbóreas e geralmente diurnas, os primatas não humanos são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres e são importantes hospedeiros no ciclo de diversas zoonoses. Dessa forma são considerados animais-sentinela em localidades onde ocorre a circulação de viroses emergentes que têm surgido periodicamente em áreas urbanas ou periurbanas sob forma de epidemias, infectando comunidades susceptíveis e causando doença febril exantemática e/ou febres hemorrágicas, ou ainda doenças do sistema nervoso central e meningites. A interação entre os primatas não humanos que vivem em florestas tropicais, com os seres humanos, observada nas práticas de ecoturismo, turismo de pesca e turismo rural, aumentam o risco de transmissão.

Considerando a participação direta ou indireta dos primatas não humanos na manutenção de ciclos epidemiológicos de diversas zoonoses, é comum a utilização desses animais em estudos soropidemiológicos de arboviroses, o que torna este um método de escolha para obtenção de informações sobre a circulação desses vírus em ambientes naturais, sendo de extrema importância estudos desta natureza. Os dados coletados permitem avaliar a magnitude do problema e servem como base para orientar os programas de controle dessas importantes zoonoses, em termos de saúde pública.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Arboviroses

As arboviroses são grupos de doenças causadas por arbovírus, transmitidos na natureza entre os hospedeiros susceptíveis, através de picadas hematofágicas dos artrópodes vetores. Os arbovírus são transmitidos entre os hospedeiros artrópodes através da via transovariana e possivelmente pela via venérea. Os vetores infectam-se quando sugam sangue de hospedeiros vertebrados em fase virêmica. O vírus multiplica-se nos tecidos dos artrópodes acumulando-se nas glândulas salivares e é transmitido aos hospedeiros através do repasto sanguíneo dos vetores (VASCONCELOS *et al.*, 2003) (Figura 1).

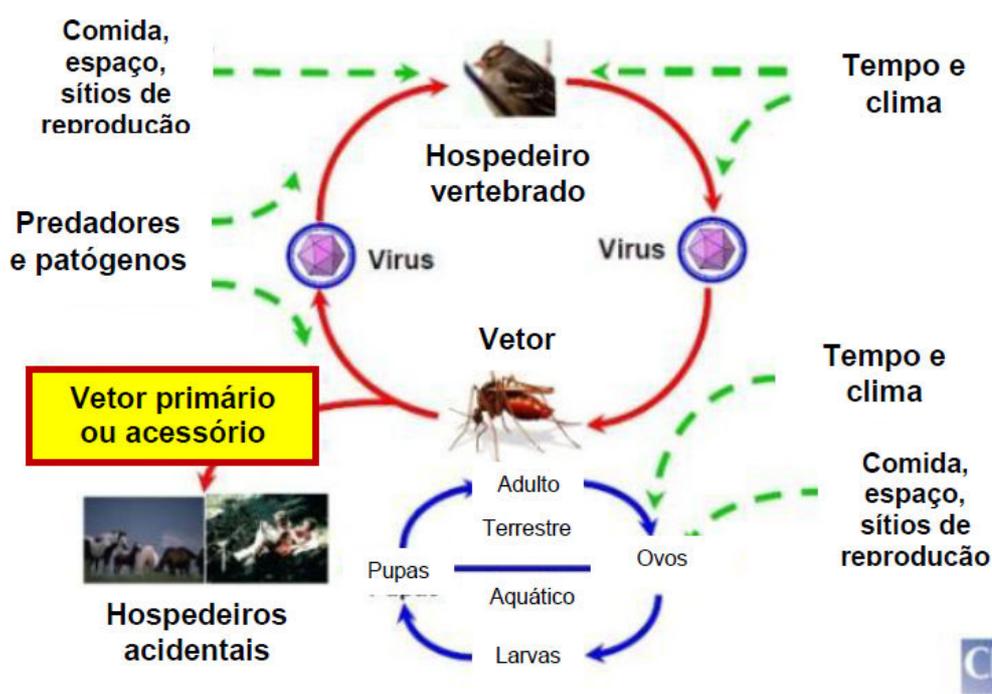


Figura 1 – Ciclo de transmissão dos arbovírus e sua relação com os hospedeiros  
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2008).

O termo arbovirus é derivado de sílabas iniciais de palavras inglesas *arthropod-borne virus* (ar+bo+vírus), que significa vírus transmitidos por artrópodes (LOVOSEI, 2005). O vetor artrópode uma vez infectado permanece assim por toda sua existência.

Em quase sua totalidade as arboviroses são zoonoses, pois são mantidas em natureza em um ciclo de vertebrados não humanos e artrópodes. Alguns

arbovírus têm surgido periodicamente em áreas urbanas, como o vírus Dengue (VDEN) e vírus Oropouche (VORO) ou em áreas periurbanas, como o vírus Mayaro (VMAY) e o da febre amarela (VFA), sob forma de epidemias infectando comunidades susceptíveis, causando doença febril exantemática e/ou febre hemorrágica. Outros arbovírus podem causar doenças do sistema nervoso central e meningites, como no caso dos vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), do Rocio (VROC), da Encefalite Eqüina do Leste (VEEE) e da Encefalite Eqüina do Oeste (VEEW) (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Com exceção do VDEN e VORO que possuem ciclos de transmissão urbanos, todos os outros arbovírus que causam doenças em humanos, são mantidos em natureza através de ciclos silvestres, no qual diversas espécies de insetos hematófagos e vertebrados silvestres atuam como vetores e hospedeiros, respectivamente. Humanos são geralmente hospedeiros acidentais e normalmente não são importantes na manutenção dos vírus na natureza. Com exceção do VDEN, todos os *Flavivirus* isolados no Brasil possuem um ciclo silvestre de manutenção (VASCONCELOS *et al.*, 1997). Alguns arbovírus são transmitidos pela mesma espécie de mosquitos e podem infectar diferentes espécies de vertebrados, inclusive humanos. Também, um único arbovírus pode infectar e ser transmitido por diversas espécies de artrópodes hematófagos (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Os VEEE, VEEW, VNO e SLEV têm ciclos envolvendo mosquitos ornitofílicos e aves, e o encontro de aves com anticorpos desses arbovírus confirmam a importância das mesmas como hospedeiras amplificadoras (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

A incidência das arboviroses é predominante em regiões tropicais, que oferecem condições climáticas ideais para a propagação contínua dos arbovirus. A ocorrência das arboviroses se dá de forma esporádica, endêmica ou epidêmica, ao contrário de regiões de clima temperado, onde há uma interrupção da cadeia de transmissão durante os meses de inverno. As pessoas que mantêm contato mais estreito com o ambiente silvestre, onde situam-se os nichos ecológicos dos arbovírus, são atingidas com maior frequência (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

O desmatamento, a urbanização desorganizada e outras mudanças ecológicas promovem o aumento da população de vetores transmissores, principalmente artrópodes da espécie *Aedes aegypti* e do gênero *Culex*, o que favorece a emergência de arboviroses. Além disso, devido à modernização dos meios de transportes os artrópodes transmissores podem deslocar-se e disseminar-

se em vários países, gerando um potencial para a ocorrência de epidemias. A introdução de seres humanos e animais infectados em fase de viremia oriundos de sítios ecoepidemiológicos onde existem zoonoses arbovídicas, nas cidades onde há presença de vetores potenciais, pode também favorecer a emergência de arboviroses (FIGUEIREDO, 2007).

Os arbovírus classificam-se de acordo com suas propriedades antigênicas, com base no cruzamento sorológico entre dois ou mais vírus. Assim cada família é constituída de dois ou mais vírus que possuem relação antigênica. Mais recentemente os arbovírus passaram a ser classificados segundo suas características físico químicas em cinco famílias: Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae e Togaviridae (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Os arbovírus possuem genoma constituído por ácido ribonucleico (RNA), podendo ser segmentado ou não (BARRETT; TEUWEN, 2009). No Brasil, mais de 200 espécies diferentes de arbovírus têm sido isoladas e cerca de 40 delas causam doença em humanos (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Os *Flavivirus* da família Flaviviridae são arboviroses emergentes no Brasil, e são classificados em três ramos principais por meio do seqüenciamento genético: ramo da Dengue, com subdivisões 1, 2, 3 e 4, ramo do complexo da Encefalite Japonesa (JEC), que inclui o SLEV, VROC e o vírus do Nilo Ocidental (VNO) e o ramo da febre amarela (FA) (BALEOTTI *et al.*, 2003). Como são relacionados antigenicamente os *flavivirus* podem apresentar reações sorológicas cruzadas nas provas sorológicas necessitando-se de testes mais específicos para diagnóstico (PETERSEN; ROEHRIG, 2001).

Os *Flavivirus* possuem genoma de RNA de fita simples que codificam as proteínas estruturais localizadas no terminal 5' do genoma viral: capsídeos (C), responsáveis pela montagem da partícula viral, a proteína pré-membrana (pM), responsáveis pela infectividade do vírus, e a proteína do envelope (E), responsável pela interação com receptores celulares, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes e pela produção de anticorpos inibidores de hemaglutinina, e proteínas não estruturais localizadas na região 3' do genoma (BARRETT; TEUWEN, 2009) (Figura 2). A proteína E possui 3 domínios, sendo que o domínio III gera uma resposta celular de padrão Th1, com posterior indução de anticorpos fortemente neutralizantes e que apresentam reações cruzadas com outros *Flavivirus* (ALKA *et al.*, 2007).

A infecção primária causada pelos arbovírus ativa o sistema imunológico que produz imunoglobulinas da classe M (IgM), detectáveis a partir do quarto dia após o início dos sintomas, atingindo o pico máximo em torno do sétimo ao oitavo dia e declinam lentamente, até não serem mais detectáveis depois de dois a três meses. As imunoglobulinas da classe G (IgG) aumentam o título gradualmente a partir do quarto dia após início dos sintomas, mantendo-se por vários anos e conferindo imunidade por toda a vida (BARRETT; TEUWEN, 2009).

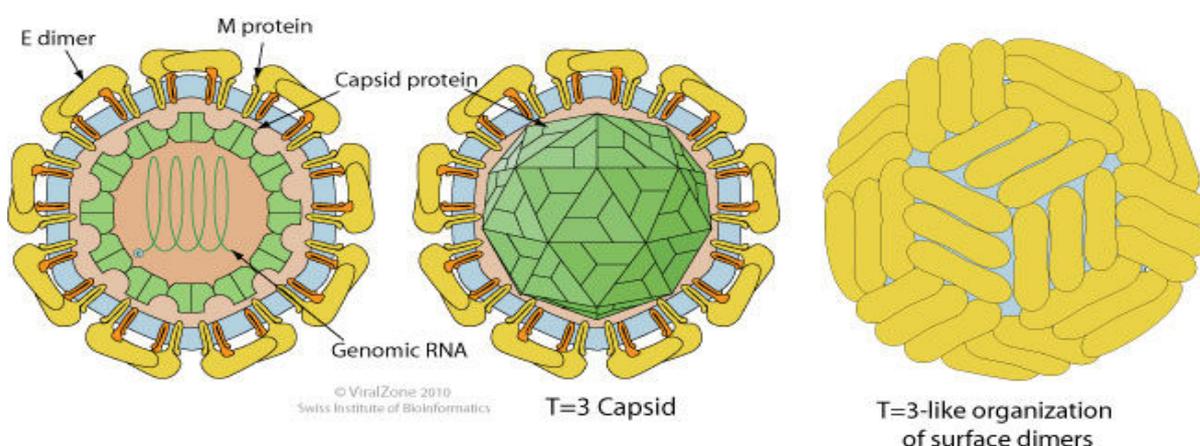


Figura 2 - Estrutura dos vírus pertencentes a família *Flaviviridae*. Representação do núcleo capsídeo icosaédrico circundando o RNA viral, apresentando um envelope derivado da membrana de células hospedeiras, glicoproteína E, proteína de membrana M

Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2003).

Os *Flavivirus* podem se replicar em várias células de tecidos diferentes, como em neurônios, células gliais, células do baço, fígado, coração, linfonodos e pulmões (SILVA, 2010).

O diagnóstico das arboviroses é realizado utilizando-se métodos virológicos de isolamento viral, como inoculação em cultivo celular em células (VERO) ou em células de mosquitos *Aedes albopictus* (clone C6/36). O método apresenta boa sensibilidade, observando-se evidência da replicação viral em torno do 5º ao 7º dias de cultura após a inoculação da amostra. O isolamento viral também pode ser feito através da inoculação em camundongos recém-nascidos. Após inoculação intracerebral, os animais são observados durante 2 a 3 semanas e a evidência de sinais de doenças são observadas entre 6 a 12 dias da inoculação. Logo após retira-se o material para novas passagens ou para a identificação viral. Após isolamento da amostra identifica-se o vírus por testes sorológicos, tais como, testes de

imunofluorescência indireta (IFI) usando-se anticorpos monoclonais, teste de fixação de complemento (FC) com utilização de soros hiperimunes contra os grupos de vírus mais comuns na área sob estudo, teste de neutralização (NT) ou através de teste de inibição de hemaglutinação (IH) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

Outros métodos de diagnóstico de arbovírus são os métodos sorológicos, que permitem a detecção de anticorpos. O MAC-ELISA que captura anticorpos específicos da classe IgM em ensaio enzimático é um método utilizado para o diagnóstico de infecções recentes e ativas e para diagnósticos de casos onde existem reações cruzadas para *Flavivirus* em outros testes. A duração dos anticorpos IgM em pacientes infectados com *Flavivirus* é de 3 meses, em média (TRAVASSOS DA ROSA, 1994). O uso de proteínas de domínios III recombinantes tem sido proposto como fonte de antígenos mais específicos, que permitiriam padronizar ELISAs *in-house* com especificidade e sensibilidade comparáveis às de *kits* disponíveis no mercado (SHUKLA *et al.*, 2009). A técnica ELISA, para detecção de arbovírus, pode ser utilizada em animais menos susceptíveis a eles, como o *Cebus apella*, como instrumento de busca ativa na vigilância da FA, permitindo a implementação de ações preventivas antes mesmo da ocorrência de epizootias (LIMA *et al.*, 2010).

Outro teste sorológico utilizado é o teste de Inibição da Hemaglutinação (IH). Esse teste é sensível, mas menos específico, podendo ser utilizado para qualquer vírus que cause hemaglutinação, isto é, se houver presença de anticorpos nos soros-teste os mesmos vão se ligar à hemaglutinina viral e impedir que o vírus cause hemaglutinação. O teste também pode ser usado para determinar a quantidade de anticorpos do vírus presentes no soro-teste (título de anticorpos) pela incubação em diluições crescentes do soro com quantidade fixas do vírus padrão, mantidas no laboratório. O teste de IH é ideal para inquéritos sorológicos, uma vez que os anticorpos IH persistem por um longo período de tempo. Através desse método é comum ocorrer reações cruzadas com outros *Flavivirus*, dificultando a interpretação dos resultados principalmente nas respostas secundárias (TRAVASSOS DA ROSA, 1994).

Em locais com circulação de vários *Flavivirus* a análise dos resultados sorológicos deve ser cautelosa, em decorrência das reações cruzadas entre arbovírus pertencentes ao mesmo grupo antigênico. Quando ocorre uma infecção secundária por um *Flavivirus* após uma infecção primária por outro *Flavivirus*

relacionado, anticorpos contra o primeiro vírus infectante são produzidos rapidamente e em alta escala, como consequência da memória imunológica prévia, sendo possível estabelecer que o animal ou paciente foi infectado pelo vírus com o qual ele apresenta títulos mais elevados (SILVA, 2010).

A detecção de antígenos virais pode ser realizada através da imunohistoquímica, após diagnóstico histopatológico e pela Reação em Cadeia de Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR). Esta última é uma técnica de biologia molecular altamente sensível e específica, que permite a detecção do ácido desoxirribonucléico complementar (DNAC) com subsequente amplificação de pequenas quantidades do genoma viral, a partir de soro de pacientes na fase aguda da doença. O produto amplificado pode ser visualizado mediante uma eletroforese em gel de agarose (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). Um novo método foi desenvolvido para identificação de espécies específicas dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* que circulam no Brasil, por RT-PCR seguido por *multiplex polymerase chain reaction* (M-PCR) ou *nested polymerase chain reaction* (N-PCR) (BRONZONI *et al.*, 2004).

### 2.1.1 Febre amarela

Febre amarela (FA) é uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública, sendo transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos da família *Culicidae*, em especial dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. A doença é causada por um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo). A letalidade global da FA varia de 5% a 10%, mas entre os casos graves que evoluem com síndromes ictero-hemorrágicas e hepato-renal pode variar entre 40% a 60% (VASCONCELOS, 2003). Tem potencial para causar epidemias, porém é prevenível por vacina (ARAÚJO *et al.*, 2002). Outros vírus responsáveis por doenças em humanos pertencem ao mesmo gênero e família, entre eles o VDEN, o VNO, o VROC e o SLEV (VASCONCELOS, 2003).

O VFA possui um sorotipo reconhecido com pequenas alterações genéticas entre as cepas da América e da África. Na África são encontrados dois genótipos, o vírus Asibi (isolado em Guana) e o vírus francês (isolado no Senegal). Na América

do Sul é encontrado apenas um genótipo originado da África (BARRETT; TEUWEN, 2009).

No Brasil, a vacina contra a FA vem sendo utilizada desde 1937, o que reduziu drasticamente a ocorrência de casos, tornando-os mais concentrados nas regiões Norte, Centro-Oeste e estado do Maranhão, que compõem a área endêmica ou enzootica (Figura 3) (BRASIL, 2005).



Figura 3 – Mapa das áreas com e sem recomendação de vacina para febre amarela no Brasil

Fonte: Ministério da Saúde (2009a, p. 9)

A cepa vacinal tem origem do vírus selvagem Asibi que difere do vírus vacinal por 48 nucleotídeos codificados de 20 substituições de aminoácidos. No Brasil a subcepa 17 DD é usada na produção de vacinas, com 81 passagens a mais que outras subcepas utilizadas no resto do mundo, como a 17D-204.

A vacina é eficaz contra todos os genótipos do vírus da febre amarela tipo selvagem. Produz uma rápida viremia de 03 a 07 dias após vacinação. A imunidade mediada pela vacina 17DD ocorre em até 10 dias após vacinação em 95% das pessoas vacinadas. Ela produz tanto uma resposta humoral rápida e específica com produção de anticorpos, quanto uma resposta imune celular, com ativação de

monócitos e linfócitos, promovendo uma proteção de pelo menos 10 anos em 98% dos vacinados (BARRETT; TEWEN, 2009).

Ainda segundo Barret e Teuwen (2009) os efeitos adversos associados à vacina da FA são geralmente leves e incluem dores de cabeça, mialgia e febre baixa, que ocorrem entre 5 a 10 dias após a imunização. A vacina pode causar raros efeitos adversos graves, como doença neurotrópica, reações de hipertermia, cefaléia, encefalite e doença viscerotrópica causados pela replicação ativa e disseminação do vírus vacinal em múltiplos órgãos ocasionando uma resposta inflamatória generalizada. As reações adversas não causam prejuízos à resposta imune do hospedeiro.

No período de outubro de 2008 a agosto de 2009 foram distribuídas no Brasil 22.452.800 doses da vacina da FA. No mesmo período, foram notificados 112 eventos adversos graves pós-vacinação no País, sendo que 56 foram classificados como confirmados. Dos casos confirmados, nove foram classificados como doença viscerotrópica aguda e todos evoluíram para óbito e 47 como doença neurotrópica aguda, sem registro de óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

A vacinação é indicada para pessoas que tenham um risco demonstrável de adquirir a doença e as que viajam para áreas onde há risco de infecção. É contra indicada em crianças menores que 6 meses, em pessoas com doenças tíficas, histórico de eventos adversos, hipersensibilidade ao ovo e gelatina e pessoas imunossuprimidas. Sua administração deve ser precavida em pessoas com idade entre 6 a 12 meses e maiores que 60 anos, além de lactantes (BARNETT, 2007).

Anualmente ocorrem aproximadamente 200.000 casos de FA no mundo, sendo 90% deles na África. O ressurgimento da FA tem ocorrido desde 1980 na África sub-Sahariana e na América do Sul. A transmissão na África mantém-se pela alta densidade populacional de mosquitos vetores que estão próximos a grande população não imunizada e onde a cobertura vacinal não é adequada. Os maiores surtos de FA na América do Sul desde 1950 ocorreram no Peru, Bolívia, Brasil, Colômbia e Equador entre 1985 a 1995.

O recrudescimento da doença no Brasil durante o ano de 1990 e início de 2000 ocorreu pela baixa cobertura vacinal nas áreas de foco e migração de indivíduos susceptíveis às regiões florestais onde a doença é transmitida. Durante 1970 a 2002, oito casos foram notificados em viajantes não imunizados dos Estados Unidos e Europa e a doença foi adquirida no Brasil (3 casos), Senegal (2 casos),

Venezuela, Costa do Marfim e Gâmbia. A taxa de mortalidade foi de 89%. Em 1987, um viajante não imunizado da Espanha que visitou 4 países do oeste Africano também adquiriu a doença. A estimativa de risco da FA associado às viagens é dificultada pela flutuação da doença por ano e variação sazonal, cobertura vacinal da população local (o que torna mais difícil estimar os riscos da não imunização) e os dados de vigilância incompletos (BARNETT, 2007).

Os grupos mais afetados pela doença são pessoas não vacinadas e que se expõem às picadas dos transmissores em áreas de florestas onde está ocorrendo a circulação do vírus. Nessas regiões a doença é documentada principalmente em lenhadores, seringueiros, vaqueiros, garimpeiros, caçadores, indígenas, populações ribeirinhas e em turistas, sendo que essa preferência deve-se à maior exposição e não à maior susceptibilidade do hospedeiro em relação ao vírus (VASCONCELOS, 2003).

No período de 1981 até maio de 2009, foram registrados 41 casos de FA em humanos tendo municípios de Mato Grosso do Sul como local de residência. No período de 1981 a 1982 os municípios com maior incidência foram Anastácio, Pedro Gomes, Campo Grande, Aquidauana, Bela Vista, Sidrolândia, Caracol, Antônio João, Jardim e Coxim. Já no período de 1991 a 1996 os municípios mais acometidos pela doença foram Corguinho, São Gabriel do Oeste, Jaraguari, Campo Grande, Terenos, Ribas do Rio Pardo, Sidrolândia, Camapuã, Ponta Porá e Bonito (GUERRA, 2009).

A Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo e a do Paraná notificaram em 2008, quatro casos confirmados laboratorialmente de FA em humanos tendo como local de infecção municípios de Mato Grosso do Sul, tais como, Água Clara, Bonito e Ribas do Rio Pardo. Neste período outros municípios do estado foram considerados como fonte de infecção de outros casos de FA, tais como, Maracaju e Aral Moreira (SÃO PAULO, 2008).

Em 2008, no Rio Grande do Sul, foi implantada a Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de FA, sendo que no período de dezembro de 2008 a abril de 2009, foram confirmados 21 casos e destes 9 evoluíram para o óbito (letalidade de 43%). Os municípios do Estado do Rio Grande do Sul com indicação de intensificação de vacinação contra FA em situações de emergência de saúde pública foram definidos a partir de critérios de classificação de áreas afetadas ou ampliadas baseados na evidência da circulação do vírus: ocorrência de

epizootias confirmadas para a FA, casos humanos confirmados ou isolamento de vírus em vetores silvestres (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

A ESPIN de FA, que se iniciou em fevereiro de 2009 no Estado de São Paulo, registrou, até a data de 26 de maio de 2009, um total de 92 notificações de casos suspeitos de FA. Destas, 26 casos foram confirmados e 9 evoluíram para óbito (letalidade 34,6%). Todos os casos estão relacionados a atividades de lazer e/ou trabalho em área rural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

A FA apresenta dois ciclos epidemiologicamente distintos, a febre amarela silvestre (FAS) e a febre amarela urbana (FAU) (Figura 4) (BRASIL, 2006).

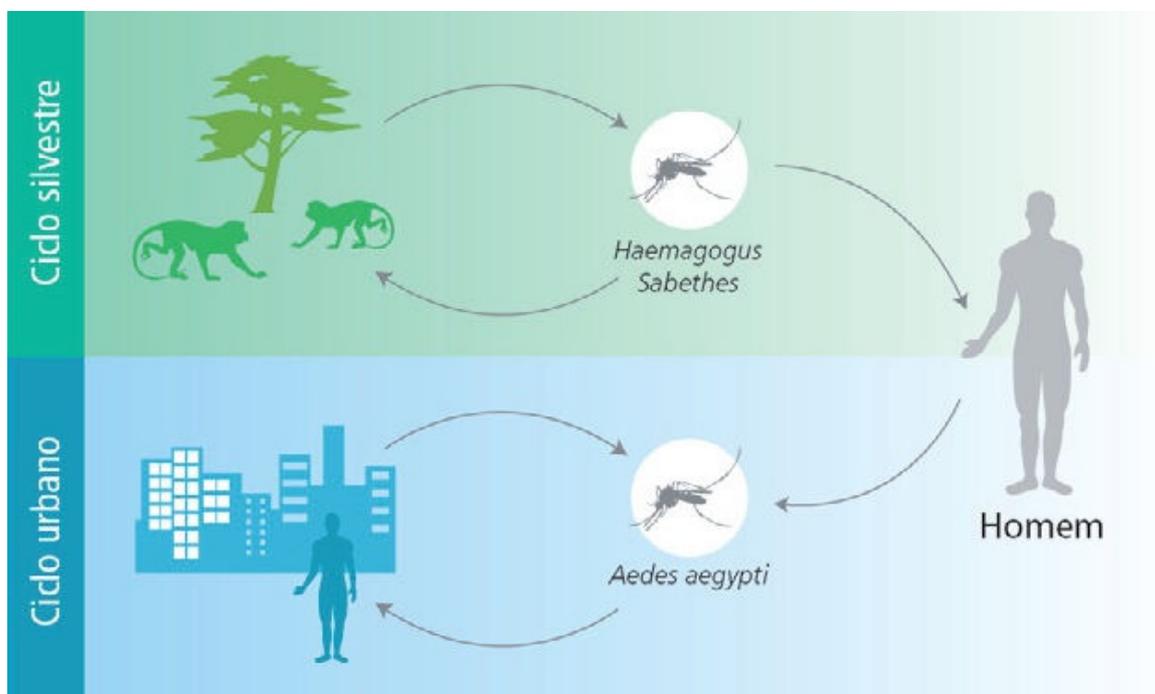


Figura 4 – Ciclo urbano e silvestre da febre amarela  
Fonte: Brasil (2009, p. 48).

No ciclo urbano, a doença é uma antroponose, o vírus é transmitido ao homem pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, sendo que o próprio homem infectado e em fase virêmica atua como amplificador e disseminador do vírus, não havendo reservatório animal de importância epidemiológica (VASCONCELOS, 2003). Portanto, a ocorrência da FAU está relacionada à distribuição e dispersão do *Aedes aegypti* (BRASIL, 1999). Em 2008, com base em dados epidemiológicos, foi registrado um surto da forma urbana da doença no Paraguai (TAUIL, 2010).

Segundo Tauil (2010) há dois desafios para o controle da FA no Brasil. O primeiro é reduzir a incidência de casos do ciclo silvestre da doença, vacinando todos os residentes e visitantes de áreas endêmicas. O segundo é prevenir a reurbanização da doença, combatendo os mosquitos *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus*, implementar a vigilância vacinal nos portos, aeroportos e fronteiras e isolar pacientes suspeitos durante o período de viremia.

A expansão de infestações do *Aedes albopictus* em áreas periurbanas de Mato Grosso do Sul resulta em risco de infecções humanas pelo vírus da FA. O vetor serve como ligação entre a FAS e FAU (GOMES *et al.*, 1999; LAVOSEI, 2003). Os *Aedes albopictus* introduzidos no Brasil demonstraram capacidade de transmitir o VNO, VFA e vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) sob condições laboratoriais (GOMES *et al.*, 1999).

A competência e potencial vetorial do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* para uma cepa viral da FA circulante foi confirmada através de experimento com vetores brasileiros coletados nas cidades de Santos (estado de São Paulo) e Passos de Minas (estado de Minas Gerais). De acordo com os resultados dos experimentos verificou-se que de todos os exemplares de *Aedes aegypti* capturados 35% infectaram-se com o vírus da FA e 25% apresentaram o vírus nas glândulas salivares. De todos os exemplares de *Aedes albopictus* capturados 29% apresentaram positividade para o vírus e 12% apresentaram RNA viral nos tecidos das glândulas salivares, levando a crer que com o aumento da densidade populacional desses vetores, principalmente no perímetro periurbano, há risco de disseminação da doença nessas populações susceptíveis (JOHNSON *et al.*, 2002).

A forma silvestre é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas. Em geral, apresenta-se sob a forma de surtos com intervalos de 5 a 7 anos alternados por períodos com menor número de casos. Na população humana, o aparecimento de casos é precedido de epizootias. A doença tem caráter sazonal, ocorrendo com maior frequência entre os meses de janeiro a abril, quando fatores ambientais propiciam o aumento da densidade vetorial. A FAS é uma zoonose impossível de ser erradicada permanecendo ativa nas florestas tropicais da África e da América do Sul (BRASIL, 2005).

Os mosquitos do gênero *Haemagogus* (*Haemagogus janthinomys*, *Hemagogus albomaculatus* e o *Haemagogus leucocelaenus*) e os do gênero *Sabethes* são os vetores de maior importância na transmissão da FA no Brasil.

Possuem hábitos diurnos e vivem nas copas das árvores descendo às vezes ao solo para se alimentar na presença do homem ou quando a quantidade de hospedeiros arbóreos é pequena (HERVÉ *et al.*, 1986).

Na FAS os primatas não humanos são considerados os principais hospedeiros amplificadores do vírus amarelado e o homem um hospedeiro acidental quando este entra em contato com ambientes silvestres de áreas endêmicas (BRASIL, 2005).

Ao infectarem-se os macacos morrem ou curam-se, ficando imunes por toda a vida. Nas Américas, alguns macacos mostram grande susceptibilidade ao vírus amarelado como os do gênero *Alouatta* (guariba ou bugios) outros apresentam grande resistência, como os macacos do gênero *Cebus* (Prego). Os *Alouattas* infectados com o vírus da FA desenvolvem infecção fulminante, com comportamento similar aos casos humanos fatais. Já os do gênero *Cebus* mostram-se mais refratários ao vírus da FA (VASCONCELOS *et al.*, 1997).

Sabe-se que a associação de vertebrados e vetores potenciais em um *habitat* favorável em densidades ótimas constitui um fator fundamental para a persistência do vírus amarelado no ambiente (SVOBODA, 2007).

O deslocamento de um macaco para fora do limite do território ocupado por seu bando (até um quilômetro para os macacos pequenos ou distâncias muito mais consideráveis para espécies maiores) é certamente um dos elementos do deslocamento do vírus (HERVÉ *et al.*, 1986). Algumas espécies de primatas, como o *Alouatta*, habitam fragmentos de florestas com menos de um hectare, e como sua dieta é baseada em consumo de folhas acabam gastando pouca energia, deslocando-se apenas de 300 a 800 metros por dia, raramente excedendo 1000 metros (MARQUES; FREITAS, 2010).

De acordo com Hervé *et al.* (1986) o vírus persiste nos mosquitos por um longo período, e essa persistência é superior àquelas em macacos. Por este motivo o mosquito é chamado de hospedeiro reservatório. Assim, esses mosquitos têm importante papel disseminador do vírus, superior àquele desempenhado pelos macacos. Mosquitos *Haemagogus leucocelaenus* podem se deslocar seis quilômetros e os *Haemagogus Janthinomys*, onze quilômetros em *habitat* aberto, dispersando passivamente ovos ou larvas e disseminando o VFA em diversas localidades, como observado em mosquitos do gênero *Aedes* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Segundo Marques e Freitas (2010) os *Alouattas* não podem ser considerados reservatórios responsáveis pela manutenção do VFA em seu *habitat* e sim como amplificadores durante o curto período de tempo. Eles são bastante sensíveis à doença morrendo entre 3 a 7 dias após a infecção e se não morrem neste período, desenvolvem imunidade permanente.

### 2.1.2 Encefalite Saint Louis

Encefalite Saint Louis (SLE) é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo SLEV, que pertence ao gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae e é amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina. Nos seres humanos o vírus causa doença aguda importante, com manifestações clínicas que incluem síndrome febril e meningoencefalites. A letalidade da doença varia consideravelmente de 5% a 10% (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Na região amazônica a prevalência de anticorpos na população humana é em torno de 1 a 5%. Nos Estados Unidos das Américas (EUA) é o arbovírus mais prevalente que tem potencial em causar epidemia (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Mas o número de infecções humanas documentados é pequeno, demonstrando que a SLE é mais prevalente do que relatada, ou que está reemergindo (MONDINI *et al.*, 2007).

Os reservatórios do SLEV são aves silvestres, primatas, tatus, marsupiais e preguiças, cujos papéis ainda são desconhecidos. O vírus não é patogênico para cavalos (DÉGALLIER *et al.*, 1986). Lovosei (2003) considera que os mosquitos e as aves silvestres são os principais componentes do ciclo enzoótico-epizoótico da SLE, como em outras arboviroses, tornando-se difícil sua profilaxia. De acordo com o mesmo autor os vetores nos EUA são os *Culex tarsalis*, *Culex pipens* e *Culex quinquefasciatus*, além do *Culex declarator* e *Culex coronator*. Vasconcelos *et al.* (1991) considera que nas florestas tropicais o ciclo enzoótico-epizoótico é mantido por mamíferos, aves silvestres e mosquitos do gênero *Culex*, principalmente o *Culex declarator*, *Culex coronator*.

Longas distâncias percorridas por aves migratórias ajudam a dispersar o vírus nas Américas, como observado em 68 cepas do vírus isolados no Brasil, os quais foram agrupados filogeneticamente com cepas da América do Norte. Com a ampla distribuição do vírus nas Américas podem ocorrer mutações virais causadas por simultâneas infecções com distintas cepas do vírus, como foi observado na

Guatemala, nos quais encontrou-se uma combinação de sequências de nucleotídeos Argentinos e Norte Americanos (FIGUEIREDO, 2007).

O SLEV foi introduzido nos EUA por aves migratórias virêmicas durante a primavera e verão, estabelecendo focos temporários de infecção que causam epidemias e epizootias (CALISHER *et al.*, 1974). Focos permanentes do SLEV ocorrem nos meses de verão, entre hospedeiros vertebrados e mosquitos, e é interrompido durante o inverno pela diminuição da reprodução e atividade vetorial. O reinício do ciclo de transmissão entre os vertebrados e vetores também se deve à transmissão transovariana do SLEV nos mosquitos fêmeas infectados para sua progênie, e a manutenção do ciclo depende da sobreposição ecológica no tempo e no espaço de hospedeiros e vetores (MCLEAN; SCOTT, 1979).

O SLEV foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1960 de um *pool* de *Sabethes belisarioi* capturados na estrada Belém e Brasília (VASCONCELOS *et al.*, 1997). O vírus também foi isolado de duas pessoas, uma em 1971 e outra em 1978. Um dos pacientes evoluiu para óbito e outro evoluiu de forma benigna, não apresentando sinais de encefalite (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Ainda não há vacinas para população humana contra esta arbovirose (LOVOSEI, 2003).

Em 2004 o SLEV foi isolado no sudeste do Brasil em um paciente com febre e dores de cabeça, que a princípio era considerado um caso de dengue. Uma análise dessa cepa mostrou que era filogeneticamente distinta de todas as cepas caracterizadas anteriormente no Brasil e que era agrupada com uma cepa Argentina (ROCCO *et al.*, 2005).

O SLEV foi identificado como agente etiológico em um surto de encefalites por *Flavivirus* ocorrido na província de Córdoba na Argentina. O vírus foi isolado de pacientes que apresentaram encefalites, meningites, febre e dores de cabeça severas (SPINSANT *et al.*, 2002).

Durante uma epidemia de dengue no primeiro semestre de 2006 em São José do Rio Preto - SP, seis casos de SLE foram confirmados através de biologia molecular e isolamento viral. Todos os seis pacientes com SLE tiveram diagnóstico anterior de dengue, dos quais três apresentaram quadros de meningoencefalite viral e três apresentaram sinais de doenças hemorrágicas. Portanto esse fato leva a crer que profissionais de saúde usualmente não consideram SLE como diagnóstico diferencial. A falta de pesquisa diagnóstica e a similaridade entre os sintomas da SLE e da dengue fazem com que os casos não sejam diagnosticados. Foi o primeiro

relato que associa sinais de hemorragias com infecção pelo SLEV, mas isso deve ser cuidadosamente avaliado, já que em nenhum trabalho anterior verificou-se a associação de manifestações hemorrágicas a infecções sequenciais de dengue e SLEV (MONDINE *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Mayaro

Mayaro (MAY) é uma doença infecciosa causada pelo VMAY, vírus membro da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. Recentemente foram reconhecidas duas linhagens do VMAY através de estudos moleculares: genótipo D e L (AZEVEDO *et al.*, 2009). O vírus causou surtos de doença febril aguda na região amazônica e no planalto central do Brasil, bem como em outros países da América do Sul, caracterizada por febre, cefaléia, mialgia, exantema, dores nas grandes articulações e artrite. A convalescência por Mayaro pode durar semanas. O curso da doença dura de 3 a 5 dias (PINHEIRO *et al.*, 1981).

O ciclo principal de manutenção do VMAY é semelhante ao ciclo da FAS, no qual macacos e mosquitos do gênero *Haemagogus* são considerados reservatórios e responsáveis pela manutenção do vírus na natureza (VASCONCELOS, 2003). O VMAY pode causar epidemias simultâneas com o VFA, como ocorreu em Santa Cruz de La Sierra, na Bolívia (STUYFT *et al.*, 1999). Apesar de o VMAY ser ativo principalmente em florestas, os vetores podem voar por longas distâncias infectando macacos nos arredores de grandes cidades, e com a pressão demográfica exercida que resulta em crescimento urbano próximo a florestas, compromete a saúde dos indivíduos que habitam essas localidades (THOISY *et al.*, 2003).

O VMAY também pode ser introduzido nas cidades por aves virêmicas ou por viajantes humanos, já que pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti*, facilitando assim a ocorrência de epidemias e adaptando-se a novo ciclo incluindo o homem como reservatório (TESH *et al.*, 1999).

Pássaros migratórios são considerados hospedeiros secundários desempenhando papel importante na disseminação do vírus, como foi observado em 1967 em Luisiana nos EUA, onde se isolou pela primeira vez o VMAY em um pássaro migratório proveniente da América do Sul através de técnicas sorológicas e de identificação viral. Em 1968 foram coletadas 300 amostras de sangue de aves e

humanos no mesmo local, mas em nenhum dos soros encontrou-se anticorpos do VMAY (CALISHER *et al.*, 1974).

A introdução e/ou reintrodução anual do vírus durante a primavera em regiões de clima temperado pode não ocorrer por vários motivos, como, necessidade de focos permanentes da doença na América Central ou Norte da América do Sul para que pássaros migratórios tornem-se infectados durante o processo de migração, além de o período de viremia em pássaros ser mais curto do que o período que levam para completar a migração para regiões de clima temperado. O tamanho, disponibilidade e suscetibilidade de hospedeiros e das populações de vetores influenciam muito o tamanho da população viral e a taxa de transmissão e conseqüentemente influenciam na detecção do vírus nessas localidades (MCLEAN; SCOTT, 1979). Na infecção por *Alphavirus* a viremia é intensa e curta, como foi observada em primatas, mas a diversidade de hospedeiros existentes nas regiões tropicais pode compensar o curto período virêmico (THOISY *et al.*, 2003). Uma viremia considerável foi confirmada por infecção experimental com o VMAY em primatas do gênero *Callithrix* (HOCH *et al.*, 1981).

Em 1955 durante a investigação de uma epidemia de etiologia desconhecida, em uma comunidade de trabalhadores da floresta no rio Guama, próximo a Belém, no Pará, que apresentavam sintomas comuns de febre contínua e dores de cabeça, resultou no isolamento de seis cepas do VMAY provenientes de seis pacientes (CAUSEY; MAROJA, 1957).

Outra epidemia causada pelo VMAY foi detectada em Belterra, no estado do Pará em 1978, onde pacientes apresentaram febre, artralgia e exantema, e as articulações das extremidades foram as mais afetadas (PINHEIRO *et al.*, 1981). Ocorrência de pequenos surtos foi detectada em Benevides no Pará e em Peixes no Tocantins em 1991. Nessas localidades ocorreram 16 isolamentos do vírus em lotes de mosquitos *Haemagogus janthinomys* (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Os primeiros casos humanos de febre pelo VMAY foram descritos na Venezuela, entre membros da mesma família após visitarem uma região de floresta aonde estudos entomológicos e epidemiológicos sobre Encefalite Equina Venezuelana (EEV) e outros arbovírus foram conduzidos nos anos de 1997 a 1998. Os pacientes apresentaram em comum mal estar, febre até 40°C, dor retro ocular generalizada, dor de cabeça, mialgias, poliartralgia, poliartrite nas mãos e punhos, tornozelos e erupções maculopapulares. O VMAY foi isolado em três dos quatro

membros da família, indicando que o mesmo foi adquirido na área rural onde o vírus circulava entre mosquitos *Haemagogus* e macacos (TORRES *et al.*, 2004).

No ano de 2000, três casos de infecção por MAY foram detectados em pacientes de São Paulo quando pescavam no município de Camapuã no estado de Mato Grosso do Sul. Os pacientes apresentaram sintomas de febre alta e artralgia. Todas as amostras séricas dos pacientes apresentaram soroconversão para o VMAY e somente uma das amostras obteve o isolamento viral através da técnica de inoculação em camundongos e pela técnica de RT-PCR (COIMBRA *et al.*, 2007).

Um surto de Mayaro foi relatado em 2008 em habitantes que residem em um assentamento no município de Santa Bárbara, no Pará, e em estudantes de agronomia de Belém que visitaram a região do assentamento. O vírus foi isolado de vetores *Haemagogus janthinomys*, *Aedes* e *Sabethes* da localidade. Das 105 pessoas examinadas, 36 (34%) apresentaram anticorpos contra o vírus e 33 eram sintomáticos; destas 52% eram estudantes, 31% eram agricultores locais e 17% participaram de outras atividades (AZEVEDO *et al.*, 2009).

#### 2.1.4 Febre do Nilo Ocidental

A febre do Nilo ocidental (FNO) é causada pelo VNO que é um membro da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus*. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1937, a partir de amostras sanguíneas de uma mulher na região de Uganda, às margens do rio Nilo. Casos esporádicos de FNO foram relatados na África, Oriente Médio e Ásia. Surtos da doença em humanos ocorreram na Algéria em 1994, Romênia em 1996-1997, na República Tcheca em 1997, no Congo em 1998, e na Rússia em 1999 (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

A justaposição espacial e temporal da infecção de aves e humanos em surtos ocorridos na Europa e América do Norte leva a crer que as aves selvagens virêmicas, principalmente as migratórias, são os principais reservatórios do VNO. (RAPPOLE; DERRICKSON; HUBÁLEK, 2000). Portanto as aves são consideradas as principais hospedeiras amplificadoras do vírus em consequência da alta viremia por período prolongado, sendo incriminada como reservatório natural da doença nas Américas (PETERSON; SIGUENZA; MEYER, 2003).

Cento e sessenta e duas espécies de pássaros, especialmente o *Corvus brachyrhynchos* (corvo americano), *Passer domesticus* (pardal) e *Turdus merula*

(melros-pretos) são os mais competentes hospedeiros para do VNO, apresentando alta viremia em estudos experimentais nos Estados Unidos (KOMAR *et al.*, 2003). Esta provavelmente é a forma como o vírus se espalhou rapidamente em todo o território Estadunidense, no Canadá e no México, onde grandes surtos da doença coincidiram com a morte de milhares de aves principalmente do corvo americano.

Embora as aves sejam consideradas as principais disseminadoras o VNO, o homem, cavalos, cães e outros animais domésticos são hospedeiros acidentais e apresentam baixa viremia, não estando envolvidos diretamente no ciclo viral no meio ambiente. Cerca de 70 espécies de aves migram da América do Norte e Golfo do México em direção a América do Sul podendo disseminar o vírus para essas regiões (RAPPOLE; DERRICKSON; HUBÁLEK, 2000).

As infecções das aves ocorrem pela picada de mosquitos ornitofílicos (PETERSON; SIGUENZA; MEYER, 2003). As espécies *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* e *Culex quinquefasciatus* são os vetores com maior competência envolvidos na transmissão do VNO nos EUA. Já o *Aedes* apresenta baixa capacidade de transmitir o vírus, portanto não desempenha um papel significativo na transmissão do vírus naquele país. Os vetores também apresentam uma viremia elevada (TURREL *et al.*, 2005). No Brasil o gênero *Culex quinquefasciatus* tem maior importância pelas suas características semelhantes ao *Culex pipiens*, e juntamente com o *Aedes scapularis* e *Aedes albopictus* podem ser responsáveis pela transmissão da FNO no Brasil (NATAL; UENO, 2004).

A partir de agosto de 1999, uma extensa epidemia de doença febril de encefalite causada pelo VNO, originária da África, ocorreu nos EUA, disseminando-se pelo país a partir de Nova York. De 1999 a 2003 foram registrados 13.743 casos da doença com 556 óbitos atingindo 44 estados, indicativo da grande capacidade de dispersão do vírus (VASCONCELOS *et al.*, 2005). No período de 1999-2008 a vigilância nacional dos EUA relatou 28.961 casos da doença em 1.869 municípios de 47 estados (LINDSEY *et al.*, 2010).

Na América do Norte o VNO tem causado epidemias de encefalites e enormes epizootias em cavalos. Em 2001 o vírus foi detectado nas Ilhas Cayman, em 2002 no México, em 2003 em El Salvador e em 2004 em Cuba. Em 2005 atingiu a América do Sul quando anticorpos virais foram detectados em cavalos na Colômbia e em 2006 foi isolado do cérebro de dois cavalos com encefalite na Argentina (MORALES *et al.*, 2006).

Amostras sanguíneas de mamíferos coletadas nos EUA, dentre eles gambás, raposas, guaxinins e linces, apresentaram anticorpos para *Flavivirus*, confirmando-se infecção por VNO, posteriormente, através de técnicas de IH, indicando que essas espécies podem ser consideradas “sentinelas” para monitoramento de flaviviruses (BENTLER *et al.*, 2007).

Na Argentina o VNO foi detectado em humanos, pela primeira vez, em novembro de 2006, quando quatro casos da doença foram confirmados pela técnica de isolamento em culturas celulares e teste de Neutralização. Os pacientes com a doença podem apresentar febre, cefaléia e dores musculares, e evoluir para casos mais graves de cefaléia, febre alta, desorientação, coma e convulsões. Meningites e encefalites são complicações ocasionais da enfermidade (ARGENTINA, 2010).

A migração de aves silvestres infectadas com o VNO, as condições climáticas favoráveis locais que facilita a amplificação do vírus nos hospedeiros vertebrados susceptíveis, a migração de muitos pássaros reservatórios do hemisfério Norte para o Brasil, e uma abundante população de *Culex*, além de achados de VNO na Argentina, favorecem a emergência do VNO no Brasil. No entanto, com a utilização de inquéritos sorológicos de 5.000 aves selvagens provenientes de diferentes regiões brasileiras não foi possível detectar o vírus (SANTOS *et al.*, 2007).

#### 2.1.5 Oropouche

Oropouche (ORO) é causada pelo VORO, que é um *Bunyavirus* da família Bunyaviridae, do gênero *Orthobunyavirus*, pertencente ao sorogrupo Simbus. É um dos mais importantes arbovírus do Brasil, pois causa importantes epidemias explosivas e, em curto período de tempo, milhares de pacientes são acometidos simultaneamente. A doença tem início abrupto com sintomas de febre, cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobias (VASCONCELOS *et al.*, 1992).

O VORO é transmitido entre humanos em zonas urbanas pela picada do mosquito *Culicoides paraensis*, sendo este o provável vetor do surto de Oropouche no Pará. O provável vetor silvestre do vírus é o *Aedes serratus*. Macacos e preguiças podem servir como reservatório no ciclo silvestre. A ligação do ciclo de

transmissão silvestre com o ciclo urbano se dá quando o homem se infecta em áreas enzoóticas e, em fase virêmica, adentra nas cidades (ROBERTS *et al.*, 1981).

O primeiro isolamento do VORO no Brasil ocorreu em 1960, de um *pool* de *Aedes serratus* a partir do sangue de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) e o primeiro surto de febre pelo VORO no Brasil foi em Belém em 1961. Na ocasião, de 159 pessoas examinadas o vírus foi isolado de 14 pacientes febris e de uma pessoa sadia. Os pacientes apresentavam sintomas de dor de cabeça, febre, dores nos músculos, nas articulações e dorso, fotofobia, diplopia, náuseas e tonteados (PINHEIRO *et al.*, 1962).

Em 1988 uma epidemia causada pelo VORO foi registrada nos estados do Maranhão e Goiás, em cidades vizinhas. Os pacientes apresentavam em comum febre, cefaléia, calafrios, mialgias e artralgias que duraram em média de 3 a 5 dias. Das setenta e cinco pessoas examinadas no estado do Maranhão obtiveram isolamento do vírus em vinte e cinco pacientes. Em Goiás o vírus foi isolado em dez pacientes pela técnica de inoculação em camundongos recém-nascidos (VASCONCELOS *et al.*, 1989).

Considerando a presença do *Culicoides paraensis* em regiões de todo o país, há risco considerado de aparecimento de epidemias causadas pelo VORO nas localidades onde esse vetor é encontrado (FIGUEIREDO, 2007).

#### 2.1.6 Rocio

Rocio (ROC) é causado pelo VROC, que é um arbovírus da família Flaviviridae, que causa encefalites nos seres humanos. O vírus mantém-se na natureza pela transmissão biológica entre hospedeiros susceptíveis e artrópodes hematófagos em dois ciclos, sendo um silvestre, com participação acidental do homem, e outro em ambientes alterados com participação de mosquitos silvestres, animais domésticos e/ou homem (LOVOSEI, 2003).

O VROC também se mantém em um ciclo em que as aves selvagens são os reservatórios e os mosquitos *Aedes scapularis* e *Psorophora ferox* são os vetores. Anticorpos neutralizantes para o VROC foram detectados em pessoas que vivem em regiões do Nordeste e Sudeste do Brasil, e em aves na região Sul do Brasil, representando uma ameaça permanente de encefalites graves (FIGUEIREDO, 2007).

A doença causa início abrupto de febre elevada, mialgia, cefaléia, prostração e vômitos, com posterior quadro neurológico. Tem elevada letalidade, podendo chegar a 20% dos casos e é mais grave em crianças e idosos (VASCONCELOS, 2003).

As arboviroses têm o potencial de tornarem-se importantes problemas de saúde pública no Brasil nos próximos anos, merecendo vigilância como parte de programas de controle eficazes para seres humanos e animais domésticos. Esta vigilância deve ser capaz de detectar os primeiros casos dessas arboviroses emergentes, e laboratórios de diagnósticos rápido de casos suspeitos, seguidas de medidas de controle é fundamental para isso. Sem um sistema de vigilância esses patógenos podem passar despercebidos até causar grandes surtos. Exames laboratoriais para confirmação diagnóstica são de grande importância, já que esses vírus não podem ser facilmente diferenciados de outras doenças virais como a dengue (FIGUEIREDO, 2007).

## **2.2 Utilização de animais-sentinela na vigilância das arboviroses**

Os estudos das arboviroses envolvem a virologia, a sorologia, a entomologia, a ecologia e a zoologia, e a interação desses segmentos pode levar a descobertas que visam desencadear ações de vigilância e controle que impeçam a disseminação destes agentes entre populações sensíveis (DÉGALLIER *et al.*, 1986). Por outro lado a existência de uma grande diversidade de artrópodes e vertebrados, as condições ecológicas em que eles interagem e a dificuldade em obter amostras destes hospedeiros, resultam em compreensões limitadas sobre os padrões de infecções por arbovírus (THOISY *et al.*, 2003).

Muitos estudos sorológicos em animais de vida livre são limitados aos inquéritos transversais em vários animais de uma única vez para detectar níveis de distribuição de soropositividade e de títulos de anticorpos. Uma resposta positiva da presença de anticorpos indica que o hospedeiro foi exposto ou respondeu ao antígeno (THOISY *et al.*, 2003).

Os primatas não humanos, por se tratarem de uma espécie arbórea e diurna, são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres. Eles se infectam quando alimentam-se nas copas das árvores no mesmo horário de alimentação dos vetores (THOISY *et al.*, 2003).

Os antropóides primatas, incluindo o homem, possuem características fisiológicas e genéticas semelhantes, assim, possuem susceptibilidade a vários patógenos comuns que podem cruzar os limites das espécies, através de várias vias de transmissão, principalmente vetorial. A interação dos primatas selvagens que vivem em florestas tropicais com o ser humano tem aumentado por causa do ecoturismo e pela invasão de florestas, aumentando o risco de transmissão (WOLFE *et al.*, 1998).

Os primatas são importantes reservatórios no ciclo de diversas zoonoses, e como fazem parte de *habitat* com uma grande diversidade biológica, servem como sentinelas naturais na vigilância de várias arboviroses emergentes, mesmo ameaçados de extinção por estas doenças (WOLFE *et al.*, 1998). Podem também ser sentinelas para investigação de epizootias de interesse em saúde pública, como no caso da FA, identificando precocemente a circulação do vírus em determinadas localidades. Os isolamentos obtidos a partir de animais sentinelas podem fornecer apenas indicações sobre os tipos de vertebrados selvagens que poderiam intervir no ciclo natural da doença. Desta forma a opção por utilizar animais capturados do mesmo ecossistema, como “animais sentinelas naturais”, para pesquisa de arboviroses torna-se o caminho mais seguro e factível (SVOBODA, 2007).

A partir de 1999 o Ministério da Saúde implantou uma forma passiva e ativa de vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como ferramenta auxiliar da vigilância epidemiológica da FA e outras arboviroses, que antes era apenas constituída pela vigilância entomológica, vigilância de casos humanos (contemplando a vigilância sindrômica) e na atenção para mortandade de PNH sem causa definida. Posteriormente criou-se a Portaria N° 5, de 21/02/2006, que inclui morte de PNH e outras epizootias de notificação imediata, dando uma maior atenção em relação à mortandade de macacos sem causa definida (BRASIL, 2005). Os resultados obtidos por este tipo de pesquisa, a continuidade das atividades e a descoberta de enfermidades que atinjam esses animais e possam ser transmitidas ao homem permite a prevenção desses episódios nas populações humanas (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A ocorrência de epizootias de FAS e a presença do *Aedes aegypti* em diversas regiões apontam para um iminente risco de reintrodução da FA em áreas peri-urbana, devido ao crescimento demográfico nas zonas enzoóticas, baixas coberturas vacinais, além da reintrodução e dispersão do *Aedes aegypti* em

localidades onde havia sido erradicado, daí a importância de ser mantida a vigilância das arboviroses (TORRES *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Vigilância de epizootias em primatas não humanos

Quatro epizootias envolvendo macacos sentinelas causadas pelo SLEV na região de Belém foram detectadas, e provavelmente o transmissor foi o *Culex declarator*, do qual o SLEV também foi isolado. O SLEV também foi isolado a partir de sangue e aves silvestres, ratificando a importância desses hospedeiros no ciclo da doença (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

No período de dezembro de 2000 a maio de 2001, na região Noroeste do estado do Paraná, ocorreram relatos de mortes de PNH da espécie *Alouatta caraya* que só foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde em outubro de 2001. A demora na notificação impossibilitou estabelecer a *causa mortis* dos animais (TORRES *et al.*, 2003).

Dados do Ministério da Saúde apontam a ocorrência de casos de epizootias por FA no ano de 2000 nos municípios de Jaraguari, Nioaque, São Gabriel do Oeste, no Mato Grosso do Sul, indicando uma provável relação com os casos de FA humana no mesmo período (GUERRA, 2009).

Em outra ocasião, do período de dezembro de 2003 a junho de 2004, no município de La Paz e no departamento de Magdalena na Bolívia, foram encontrados cinco primatas do gênero *Alouatta seniculus* mortos em parques ecológicos. Para confirmar a causa da morte dos primatas foram coletadas amostras de tecido hepático que foram enviados ao laboratório de referência daquele país. Das cinco amostras de tecido hepático processadas quatro amplificaram o VFA pela técnica de RT-PCR, demonstrando a evidência da atividade enzoótica da FA na região onde sessenta e quatro pessoas foram infectadas pelo vírus (35% de mortalidade) (MÉNDES *et al.*, 2007).

Epizootias em primatas por FA foram relatadas em várias regiões do estado do Mato Grosso do Sul em 2008. Na ocasião isolou-se o vírus da FA a partir das amostras de vísceras e de material sanguíneo de um primata do gênero *Alouatta*, que foi à óbito no município de Anastácio. O vírus foi isolado através das técnicas de inoculação em camundongos recém-nascidos e pela técnica RT-PCR, no Instituto Evandro Chagas (IEC) no estado do Pará (BATISTA, 2008).

No período de 2008 a 2009, foram notificados 958 eventos envolvendo a morte de primatas no Rio Grande do Sul, totalizando 2.016 animais mortos, sendo que destes, 204 foram positivos para o VFA (RIO GRANDE DO SUL, 2011).

De setembro de 2008 até 26 de maio de 2009, foram notificados 84 eventos envolvendo a morte de primatas não humanos acometendo pelo menos 141 animais distribuídos em 34 diferentes municípios do Estado de São Paulo. Destes, três foram confirmados laboratorialmente infectados por FA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

Em maio de 2011 houve um relato de morte de aproximadamente vinte primatas não humanos no Paraguai próximo ao Rio Paraná na fronteira com Posadas, na Argentina. Na ocasião nenhuma análise foi realizada para verificar uma possível circulação do VFA ou outras arboviroses, já que a epizootia foi notificada 20 dias depois do ocorrido (LEAL, 2011).

### 2.2.2 Inquéritos sorológicos em animais-sentinelas

Durante um surto de MAY e FA em Belterra no Pará, em 1978, alta prevalência de anticorpos do VMAY foi encontrada nos *Callithrix argentata* durante a investigação nos hospedeiros vertebrados. Das 119 amostras testadas pelo teste de IH, 32 (19%) foram positivas para o VMAY e 5 (4%) foram positivas para o VFA, indicando que essa espécie de primata foi a principal hospedeira amplificadora do VMAY e do VFA durante o surto (HOCH *et al.*, 1981).

Estudos sorológicos em 28 mamíferos da floresta na Guiana Francesa revelaram uma soroprevalência de 0 a 52% para o VMAY (THOISY *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado no Paraná em 1997 para identificar o agente causador de encefalites em equinos, foram coletados 1.883 culicídeos de 25 cinco espécies diferentes e amostras de vinte e dois equinos. As amostras de culicídeos inoculadas em camundongos visando ao isolamento viral foram negativas. Das 22 amostras dos equinos nenhuma apresentou anticorpos para o SLEV (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000). O não isolamento viral nas amostras de culicídeos e de sangue dos equinos pode ser decorrente da influência de fatores biológicos, ecológicos e físicos, tais como, pequena quantidade de mosquitos coletados, densidade vetorial baixa devido às condições ambientais e do estado imune e nutricional do hospedeiro (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Para determinar se a infecção pelo VMAY estava difundida na Guiana Francesa, inquéritos sorológicos realizados em primatas e em humanos foram realizados. Durante o estudo soros de 106 *Alouatta seniculus* e 44 *Saguinus midias* foram testados pela técnica de IH. Foram encontradas as maiores prevalências de anticorpos para o VMAY em *Alouatta seniculus* (70/66%) e em *Saguinus midias* (8/18,2%) (TALARMIN *et al.*, 1998). A maior prevalência do VMAY em *Alouattas* pode ser explicada pelas características de vida distintas dessas espécies, onde permanecem no topo das árvores por mais tempo do que os *Saguinus*, tendo maior contato com vetores no topo das árvores, com isso uma maior exposição contínua ao vírus. Dos soros humanos testados 6,3% foram positivas para VMAY e a prevalência foi maior em pessoas em contato com a floresta, indicando que o vírus circula naquele país (TALARMIN *et al.*, 1998).

Entre 2000 e 2001, um estudo com amostras de 570 soros de *Alouatta caraya* provenientes da região do reservatório de Engenheiro Sérgio Motta Usina Hidrelétrica (UHE), também conhecida como Porto Primavera, na cidade de Presidente Epitácio, região Sudoeste do Estado de São Paulo, foi realizado com objetivo de estimar a prevalência de anticorpos IgG contra o VFA. Na ocasião nenhum anticorpo contra o VFA foi detectado nas amostras dos macacos, levando a crer que o vírus não circulava na região no período da captura. Nenhum caso de epizootia ou doença em humanos foram detectados na mesma época (LIMA *et al.*, 2010).

Após o isolamento do VFA a partir do fígado de um primata morto da espécie *Alouatta caraya* do município de Santo Antônio das Missões, no Rio Grande do Sul em 2001, foi desencadeada uma investigação entomológica no local da ocorrência da epizootia. Na ocasião o VFA foi isolado em camundongos recém-nascidos a partir de vinte e três mosquitos da espécie *Haemagogus leucocelaenus*, incriminando-os como importantes vetores na epidemiologia da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Em 2002, no estado do Rio Grande do Sul foi implantada pela Secretaria de Estado de Saúde a vigilância da FAS em primatas e em vetores com objetivo de identificar e definir mais precisamente áreas silvestres de risco para ocorrência do vírus amarelo. Esse tipo de monitoramento é realizado através de captura e manejo de PNH com o uso de dardos anestésicos e com coleta de material sanguíneo para isolamento viral e detecção de anticorpos. As capturas mostraram-se bastante

eficientes permitindo ter uma amostra da situação dos animais com relação a circulação do vírus sem a necessidade de sacrifício de nenhum primata, adequando a vigilância à legislação ambiental. Até aquele momento, apenas em um animal (macho de *Alouatta caraya*, pertencente a um bando com pelo menos mais três indivíduos) foi detectado presença de anticorpos para VFA (TORRES *et al.*, 2003).

Em 2001, com objetivo de buscar evidências da circulação do VFA e de outras arboviroses nas províncias de Chaco e Corrientes no Nordeste da Argentina, uma pesquisa em material biológico de sete primatas não humanos, capturados através de rifle com dardos anestésicos, resultou em quatro macacos positivos para o SLEV através da técnica de IH. Nenhuma das sete amostras positivou para o VFA. Das quatro amostras positivas, duas apresentaram isolamento viral pela técnica de cultivo celular, confirmando a infecção pelo SLEV em macacos no Nordeste da Argentina, e reforçando a possível intervenção desses primatas no ciclo natural do vírus. Além dos macacos, o SLEV foi isolado de pacientes, roedores e mosquitos (BOTTINELLI *et al.*, 2002).

Entre 2002 e 2007, no Rio Grande do Sul, foram capturados 181 macacos de duas espécies de *Alouatta* (*Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*) provenientes de várias regiões do Rio Grande do Sul. Nas amostras de soro dos primatas foram detectados anticorpos para o VORO (n=1) e SLEV (n=16) pelo teste de IH e neutralização (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Durante o período de junho de 2004 a dezembro de 2005, amostras de sangue de 130 primatas, capturados através de armadilhas na região de Porto Rico no Nordeste do estado do Paraná, e de 23 equinos, foram submetidas a testes de IH contra um painel de antígenos de 19 arbovirus. Vinte e uma amostras dos primatas apresentam títulos para SLEV (SVOBODA, 2007). Segundo o autor, esse é o primeiro relato de soroprevalência de anticorpos específicos do vírus da SLEV em macacos selvagens no estado do Paraná, incriminando-os na manutenção natural do ciclo da SLE na região do Conesul, onde houve surtos de encefalites no Norte da Argentina.

Em outros estudos realizados no ano de 2005 o VORO foi isolado a partir de amostras de um primata do gênero *Callithrix* em Minas Gerais, e anticorpos do vírus foram observados em aves silvestres capturadas na região Sul do Brasil (NUNES *et al.*, 2005).

No período de janeiro a março de 2008 no departamento de San Pedro na região central do Paraguai, um inquérito em 35 primatas foi realizado com objetivo de buscar evidências da circulação do VFA. O vírus não foi isolado em nenhuma amostra biológica pelo teste de cultivo celular e por NT. Provavelmente o não isolamento do VFA nas localidades estudadas se deu pelo baixo número de primatas capturados no momento do estudo (ROIG *et al.*, 2009).

Um inquérito sorológico em 1401 equinos para investigação do SLEV e do VNO, realizados na amazônia brasileira e no município de Maracajú, no Mato Grosso do Sul, por meio de teste de IH e por NT, detectou-se anticorpos e neutralizantes específicos para SLEV. Das amostras testas 628 (44,8%) foram detectados anticorpos contra *Flavivirus*. De 248 (17,7%) amostras que apresentaram positividade para *Flavivirus*, 137 (55,2%) foram reagentes contra SLEV. As outras 380 (27,1%) apresentaram reações cruzadas entre *Flavivirus*. Também foram encontrados anticorpos neutralizantes específicos para vírus Ilhéus (ILHV) em cavalos provenientes de várias fazendas do município de Maracaju, confirmando uma ampla distribuição de SLEV e outros arbovírus no país (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Outro estudo sorológico em equinos com objetivo de detectar infecções pelos *Flavivirus* SLEV, VROC e VNO, através do ELISA, apresentou evidências de que o VNO foi introduzido no Brasil e encontra-se a infectar cavalos nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo. Observou-se também o diagnóstico da infecção por SLEV em equinos de todos os locais estudados, inclusive em Mato Grosso do Sul (SILVA, 2010).

Em uma investigação preliminar, pela presença de arbovírus em amostragem de culicídeos capturados na sub-região da Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul no ano de 2010, foram identificadas 22 espécies de culicídeos, sendo que 10 das quais já foram reportadas como vetores de importantes arbovírus, tais como do gênero *Culex* e *Sabethes*. Na ocasião nenhum vírus foi isolado das amostras coletadas e os resultados de detecção de RNA viral também foram negativos. Os resultados desse estudo sugerem que a sub-região da Nhecolândia é importante área de vigilância para arbovírus no Centro-Oeste do Brasil, pelas condições ambientais e climáticas favoráveis à circulação de arboviroses (CORRÊA *et al.*, 2010).

### **3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA**

Desconhecimento sobre a circulação de arboviroses em primatas não humanos de interesse em saúde pública em Mato Grosso do Sul.

## **4 OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo geral**

Detectar infecções por arbovírus em primatas não humanos de vida livre e de cativeiro nos municípios de Bonito, Campo Grande e Jardim, estado do Mato Grosso do Sul.

### **4.2 Objetivos específicos**

Para a concepção do objetivo geral seguem os objetivos específicos:

- a) Identificar os níveis de distribuição de soropositividade e de títulos de anticorpos contra arbovírus em primatas não humanos;
- b) identificar os vetores transmissores envolvidos na transmissão das arboviroses nas localidades de Jardim e Bonito;
- c) identificar as espécies de arbovírus que circulam em localidades do município de Bonito, Jardim e Campo Grande, através da tentativa de isolamento viral a partir de material biológico oriundo dos primatas não humanos e vetores;

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Tipo de pesquisa**

O modelo da pesquisa é descritivo do tipo inquérito, seccional, com coleta de dados primários.

### **5.2 Local e período da pesquisa**

A pesquisa desenvolveu-se em regiões de matas dos municípios de Bonito e Jardim, selecionados por critério de risco de transmissão entre pessoas susceptíveis que praticam atividades de ecoturismo e turismo rural e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), selecionado por ser localizado no perímetro urbano do município de Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul e por receber indiscriminadamente animais de todo o Estado (Figura 5). A pesquisa ocorreu no período de fevereiro a outubro de 2010. Nesses municípios observa-se a predominância do ecossistema cerrado que é caracterizado por árvores baixas, inclinadas e tortuosas de tronco fino. O cerrado apresenta estações climáticas bem definidas; uma estação chuvosa no verão, que ocorre de outubro a abril, e uma estação seca no inverno, que se estende de junho a agosto.

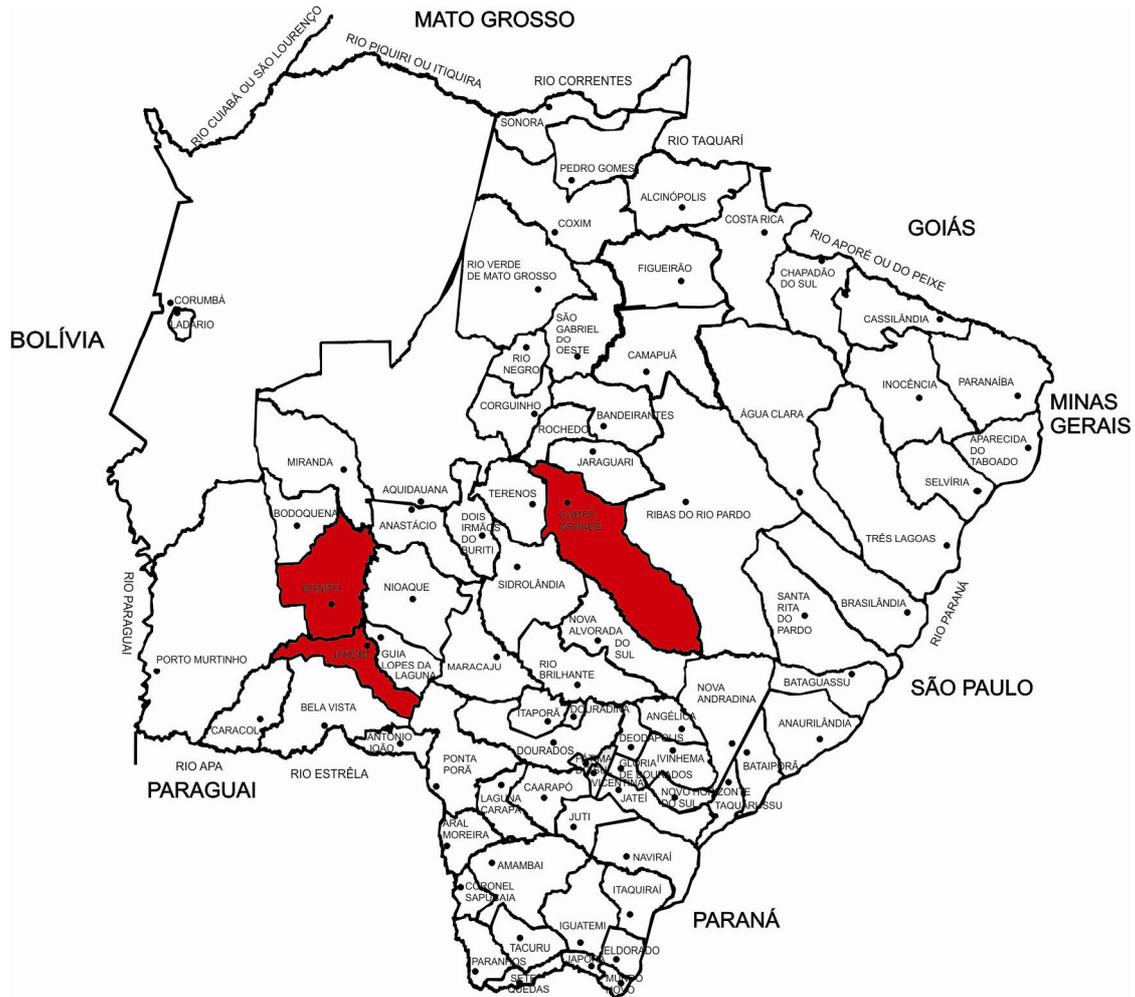


Figura 5 – Municípios de realização do estudo sobre a circulação de arbovírus em primatas não humanos, Mato Grosso do Sul, Brasil 2010

O município de Campo Grande, capital do Estado de Mato Grosso do Sul, está situado na região central do Estado, com altitude aproximada de 532 metros do nível do mar ( $20^{\circ}26'34''S$  e  $54^{\circ}38'47''W$ ). Possui uma área estimada em 8.096,05 km<sup>2</sup> e sua população é cerca de 765 mil habitantes. O CRAS localiza-se no Parque Estadual do Prosa na zona urbana da cidade (Figura 6). O parque possui uma área aproximada de 135 hectares no Planalto da Serra de Maracaju e conta com recintos para aves, mamíferos e répteis.



Figura 6 – Imagem de satélite do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010

Fonte: Google earth (2011)

O município de Jardim está localizado no sudoeste do Estado (“21°28’49” e 56°08’17”). Possui uma extensão territorial de 2.207,6 km<sup>2</sup>, com clima subtropical úmido, com temperaturas que variam de 15° a 39°C. O Balneário Municipal, localidade onde se realizou a pesquisa no município, está localizado a 30 km do perímetro urbano, a beira do Rio da Prata e oferece toda estrutura para atividades de lazer e turismo, onde as pessoas ficam em contato direto com a fauna e flora da região (Figura 7).

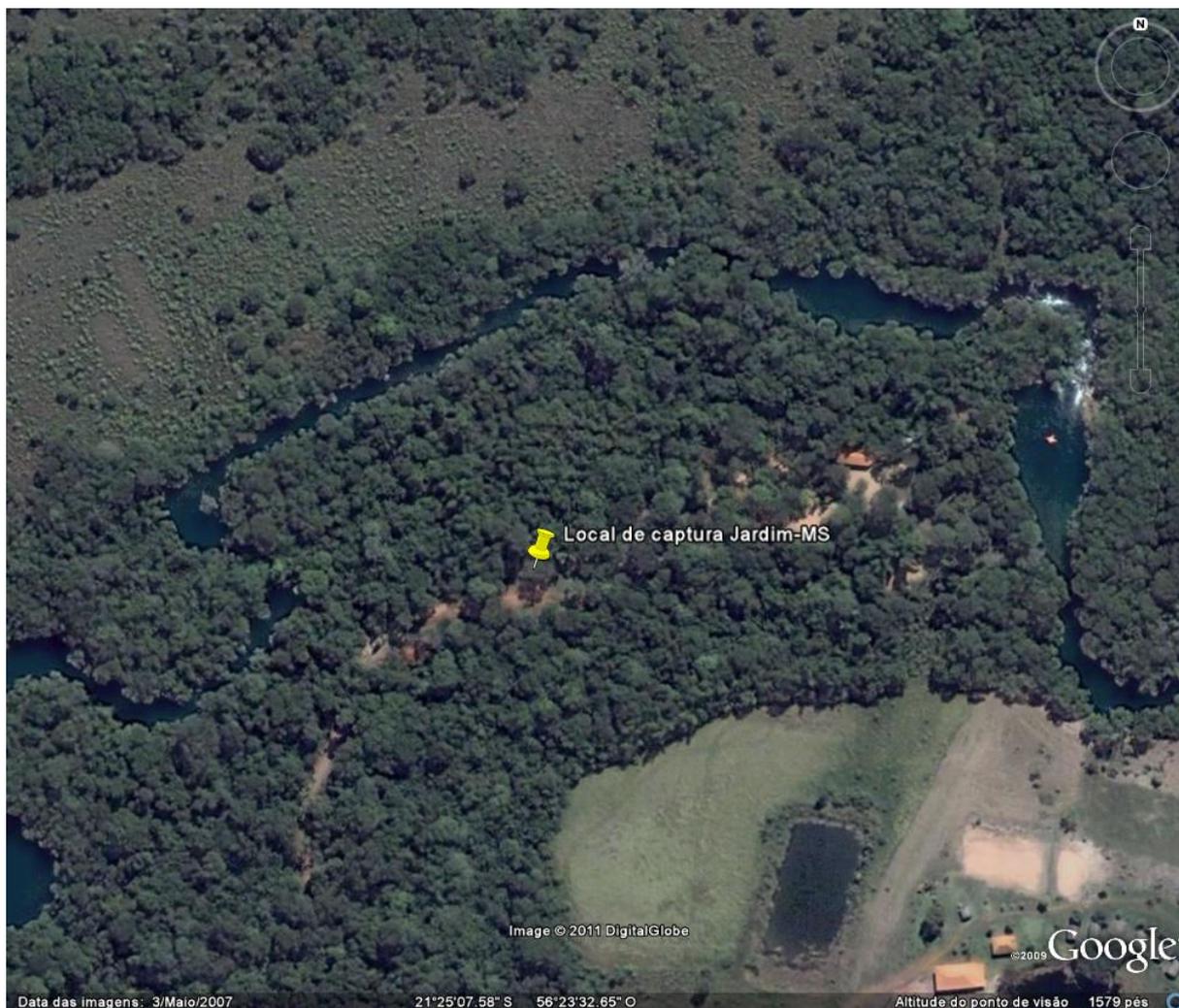


Figura 7 – Imagem de satélite do Balneário Municipal no município de Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010  
Fone: Google earth (2011)

O município de Bonito localiza-se na Serra da Bodoquena no sudoeste do Estado, apresenta altitude aproximada de 315 metros ( $21^{\circ}07'16''S$  e  $56^{\circ}28'55''W$ ) e uma população com cerca de 25 mil habitantes. O município é conhecido mundialmente pelas suas grutas, rios, balneários e lagoas de águas cristalinas. O Balneário do Sol, uma das localidades onde realizou-se a pesquisa no município, localiza-se a 10 km do perímetro urbano, à beira do Rio Formoso. O balneário oferece toda estrutura para práticas de ecoturismo e lazer (Figura 8). O Hotel Cabanas, outra localidade do município onde realizou-se o estudo, está localizado a apenas 6 km do centro da cidade e oferece infra-estrutua turística, que inclui hospedagem, lazer e contato com a flora e fauna da região, além de ser frequentado por turistas do mundo todo (Figura 9).



Figura 8 – Imagem de satélite do Balneário do Sol no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010  
Fonte: Google earth (2011)



Figura 9 – Imagem de satélite do Hotel Cabanas no município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010  
 Fonte: Google earth (2011)

### 5.3 Fontes de dados

Foram incluídas na pesquisa amostras de 65 primatas não humanos (2 *Alouatta caraya*, 1 *Callicebus donacophilus* e 62 *Cebus apella*). Destes, 28 (43,1%) eram do sexo feminino e 37 (56,9%) do sexo masculino; 11 (16,95%) foram capturados no município de Jardim, 35 (53,9%) no município de Bonito e 19 (29,2%) eram procedentes da colônia do CRAS (Tabela 1). Os animais utilizados para coleta de material sanguíneo pertencentes a colônia do CRAS, não foram capturados. Os mesmos são provenientes de várias regiões do estado do Mato Grosso do Sul vítimas de maus tratos, atropelamentos e de tráfico. Os primatas são alojados de acordo com suas características biológicas em recintos coletivos, alimentando-se de

frutas, sementes, verduras. Em sua maioria são soltos na natureza em locais determinados pelo CRAS, logo após sua reabilitação.

Também foram incluídos na pesquisa vetores transmissores de arbovírus capturados nas localidades dos municípios de Bonito e Jardim.

A técnica da amostragem foi não probabilística por conveniência.

#### **5.4 Procedimentos para coleta dos dados**

Para coleta de dados utilizou-se ficha de identificação, registro e coleta de amostras de primatas (Apêndice A), que inclui todas as informações com as variáveis de interesse na pesquisa, como dados relativos à localidade (endereço, coordenadas, data, período e horário), dados relativos ao animal capturado (número do *microchip* a ser aplicado, espécie, sexo, faixa etária, peso, estado físico geral e dados biométricos) e dados relativos à amostra coletada (sangue, soro e tipo de exame a ser realizado).

Para coleta de vetores utilizou-se a ficha de coleta, armazenamento e envio das amostras de vetores, com informações relativas ao local da coleta, nível arbóreo (solo, intermediário, copa) e métodos de coleta (sucção, puçá, outros).

##### 5.4.1 Proteção imunitária

Antes da realização das pesquisas os técnicos foram vacinados previamente contra febre amarela, raiva, hepatite B e tétano com posterior avaliação das titulações sorológicas para raiva.

##### 5.4.2 Equipamentos de proteção individual (EPI)

Foram utilizados os seguintes EPI, conforme necessidade: botas impermeáveis, aventais descartáveis, luva de raspa de couro (para contenção física manual dos animais), luvas de procedimento (colheita e processamento dos materiais biológicos), máscaras, óculos de procedimentos e equipamentos para comunicação de longo alcance.

### 5.4.3 Animais

O trabalho de campo foi previamente planejado em conjunto com técnicos das Secretarias Municipais de Saúde dos municípios selecionados e autoridades locais. Nas localidades estudadas, os animais de vida livre foram acompanhados durante algumas semanas, para verificar as características do grupo (locais mais frequentados, hábitos alimentares, número de indivíduos, entre outras) e para determinar os locais das “cevas” (Figura 10). Para a coleta das amostras dos animais do CRAS foi realizado um contato prévio com as autoridades e técnicos responsáveis pela instituição.



Figura 10 - Exemplares de primatas do gênero *Cebus* capturados durante o estudo nos municípios de Bonito e Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010

Foto: Batista (2010)

### 5.4.4 Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos

Por serem animais predominantemente frugívoros e possuírem hábitos de forrageio terrestre, os animais de vida livre foram capturados com armadilhas terrestres do tipo Tomahawk. A montagem das armadilhas ocorreu em local previamente determinado pela observação dos locais mais frequentados pelos primatas, isto é, no interior das matas, onde há possibilidade de visualização do grupo para com a ceva. Para as cevas foram utilizados vegetais como, manga, laranjas, milho e outras, dependendo da preferência alimentar do grupo. O fornecimento dos alimentos no interior das armadilhas ocorreu em dias alternados durante aproximadamente duas a três semanas antes das capturas e diariamente na semana que precedeu a captura. O alimento que não foi consumido pelos animais

foi trocado por alimentos novos. Após a ceva inicial, utilizada como atrativo, as armadilhas foram instaladas e armadas de acordo com a metodologia adotada por Rocha *et al.* (2007).

Tanto os animais capturados de vida livre como os de cativeiro, foram anestesiados utilizando protocolo anestésico à base de cloridrato de tiletamina associado com cloridrato de zolazepam, 4,4 mg/kg, administrados com seringas de 1 mL. A quantidade do fármaco foi adaptada ao peso do animal e a administração foi realizada via intramuscular (SANTOS *et al.*,1999). Em alguns casos os animais foram sedados com auxílio de zarabatanas com dardos anestésicos e contidos com auxílio de puçás e manipulados com luvas de raspa de couro (Figuras 11 e 12).



Figura 11 – Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos  
Legenda: A e B - armadilhas do tipo tomahawk armadas no interior da mata; C - primata do gênero *Cebus* capturado; D - processo de sedação pelo uso de zarabatana e dardo anestésico  
Foto: Batista (2010)



Figura 12 - Dardos anestésicos de diferentes volumes utilizados em zarabatanas para sedação dos animais

Fonte: Svoboda (2007, p. 51)

#### 5.4.5 Procedimentos com animais sedados

Após a captura e sedação, foram utilizadas luvas de procedimentos para manipulação e coleta de amostras dos animais, sobre uma mesa de trabalho a campo (tipo desmontável) forrada com plástico descartável. Após a manipulação de cada animal capturado, procederam-se limpeza e desinfecção do local com álcool 70%, e ao final dos procedimentos houve descarte de todo material em depósito específico para lixo hospitalar.

#### 5.4.6 Colheita de material biológico

Após a sedação completa, por punção da veia femoral ou braquial, coletou-se de 3 a 5 mL de sangue dos animais até 3 kg e 6 a 10 mL dos animais acima de 3 kg. Posteriormente, o sangue total coletado foi centrifugado a 1.000 rpm durante 10 minutos, para obtenção de soro. Alíquotas de soro e sangue total foram acondicionadas em criotubos, devidamente identificados. As amostras inicialmente foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o processamento (BRASIL, 2005). Dados biométricos foram coletados e cada animal foi monitorado por meio da temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória. Os dados obtidos foram anotados na ficha individual de identificação, registro e coleta de amostras de primatas (Figura 13).



Figura 13 – Procedimentos com animais sedados

Legenda: A - coleta de dados biométricos; B - coleta de material sanguíneo

Foto: Batista (2010)

#### 5.4.7 Coleta de vetores

Os vetores foram capturados utilizando-se métodos fundamentados nas características relacionados aos hábitos e atividades diárias das espécies de vetores. De acordo com a preferência alimentar de culicídeos os próprios técnicos envolvidos na pesquisa atuaram como atrativos para os insetos. Capturadores de Castro e puçás foram utilizados para apreensão dos mosquitos pousados em superfície sólida ou sobre as vestes dos técnicos. As capturas foram realizadas no horário de 9:00 às 16:00 horas, de acordo com os hábitos diurnos dos vetores. Os culicídeos capturados foram acondicionados em criotubos de 5 mL devidamente identificados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -70°C para posterior tentativa de isolamento viral (Figura 14) (BRASIL, 2005).



Figura 14 – Método utilizado para captura de vetores com capturados de Castro, atração humana e puçás  
Foto: Batista (2010)

#### 5.4.8 Aplicação do *microchip* (*transponder*) de identificação

Para controle futuro, foram aplicados *microchips* (“transponders”) de identificação, via subcutânea na região interescapular, com posterior leitura de confirmação com leitor específico (Figura 15). Antes de cada uso o *microchip* e o aplicador foram desinfectados por imersão em solução de álcool iodado a 2%.



Figura 15 – Leitura de *microchip* após aplicação da região interescapular em um exemplar de *Cebus* capturado  
Foto: Batista (2010)

#### 5.4.9 Término dos procedimentos, acompanhamento e soltura dos animais

Até o completo retorno anestésico, os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, cobertas por lona e afastados de fatores estressantes. Após o retorno anestésico os animais foram libertados ao nível do solo, antes do anoitecer, para diminuir a ação dos predadores noturnos.

#### 5.4.10 Diagnóstico laboratorial

Todos os exames laboratoriais foram realizados no Instituto Evandro Chagas (IEC), na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Para demonstração da presença do agente viral e da dosagem de anticorpos inibidores de hemaglutinação, as amostras séricas coletadas dos primatas foram testadas contra 19 diferentes tipos de arbovírus, incluindo os gêneros: *Alphavirus* (Encefalite Equina do Leste, Encefalite Equina do Oeste, Mayaro e Mucambo), *Flavivirus* (febre amarela, Ilheus, encefalite Saint Louis, Cacipacoré, Rocio e Bussuquara), *Orthobunyavirus* (Guaroa, Maguari, Tacaiuma, Utinga, Belém, Caraparu, Oropouche e Catu) e *Phlebovirus* (Icoaraci), pertencentes ao acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC.

Os antígenos foram preparados a partir de cérebros, fígado ou soros de camundongos recém-nascidos infectados, pela técnica de extração por sucrose-acetona e sorovírus (CASALS; BROWN, 1954). Os soros foram pré-tratados por acetona e absorvidos com hemáceas de ganso (*Anser cinereus*) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994) para remoção de possíveis proteínas inespecíficas que possam inibir a aglutinação das hemáceas, evitando resultados falso positivos.

De acordo com a técnica de Shop (1963) os soros foram diluídos na placa (1:20 a 1:1024) e cada diluição é colocada em contato com o volume fixo de uma suspensão viral, contendo quatro unidades hemaglutinantes. A mistura é incubada por uma hora a 37°C, para permitir a reação do anticorpo com antígeno. A seguir, uma gota de suspensão de hemáceas é adicionada a cada orifício da placa. Após incubação de 30 minutos, faz-se a leitura da reação. Nos orifícios onde existem anticorpos estes vão recobrir os vírus e impedir que se liguem às hemáceas, combinado com a hemaglutinina viral, observando-se a inibição de hemaglutinação evidenciada pela sedimentação das hemáceas, formando um botão fechado. O título

do soro é determinado como sendo igual à recíproca da maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação.

Na tentativa de isolamento viral, camundongos recém-nascidos (*Mus musculos*) foram inoculados via intra cerebral com 0,02 $\mu$ L do soro e do sangue dos primatas não humanos estudados, diluído em 1,8 mL de penistrep (100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina) (GLUBER; KUNO; SATHER, 1984).

Os animais foram observados diariamente, durante 21 dias e qualquer alteração observada foi anotada em cartões de identificações. Concomitantemente, 40  $\mu$ L do sangue e de soro dos animais em estudo (diluído 1:10 em meio de cultura) foram acrescidos em diferentes garrafas que continham linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus* (Clone C6/36 ) e meio de cultura Leibonitz modificado com Lglutamina (L-15), acrescido de triptose, aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), 5% de proteína sérica bovina para meio de crescimento e 2% para meio de manutenção. As garrafas com monocamadas celulares confluentes foram observadas diariamente, durante 10 dias em microscópio óptico invertido para a verificação de efeito citopático (ECP). As suspensões de artrópodes hematófagos, após filtragem foram inoculados na proporção de 1:10 em meio de cultura. Se há o ECP, que não ocorreu durante o presente estudo, a confirmação da presença do vírus nas amostras estudadas se dá por imunofluorescência indireta (IF) (GLUBER; KUNO; SATHER, 1984).

## 5.5 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (nº 251/2010) (Anexo A), pelo IBAMA (nº 21808-2) (Anexo B) e pelo Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso (nº 23/108891/2009) (Anexo C), além disso, contou-se com o apoio técnico, logístico, administrativo e de material permanente e de consumo da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul. As técnicas de captura e identificação dos animais foram as menos invasivas com propósito de preservar o bem estar e amenizar o estresse dos animais.

A pesquisa em questão não acarretou em mudanças ambientais, tomando-se os devidos cuidados durante a interação entre o pesquisador e os animais, para

evitar a possibilidade de contaminação recíproca de doenças, tais como o uso de EPI adequados aos níveis de biossegurança.

Os resíduos biológicos gerados no trabalho de campo, que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente, foram colocados em sacos plásticos resistentes na cor branca e incinerados, para destruição completa dos materiais orgânicos potencialmente patogênicos. Também considerou-se a limpeza e a desinfecção do local de trabalho, utensílios, equipamentos e veículos como forma de reduzir o risco à saúde humana e ao meio ambiente.

O transporte do material biológico foi apropriado e garantiu a integridade, conservação e inviolabilidade da embalagem até o momento da sua utilização, de forma que não expôs a riscos desnecessários os profissionais envolvidos no transporte, a população e o meio ambiente.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resultados dos testes sorológicos por Inibição de Hemaglutinação (IH)

As 11 amostras séricas coletadas dos primatas não humanos capturados no município de Jardim e testadas por IH foram negativas. Das 19 amostras séricas coletadas dos primatas não humanos da colônia do CRAS, uma apresentou títulos de 1:20 para *Flavivirus*, sendo a mesma de um primata do gênero *Cebus*. Das 35 amostras séricas coletadas em Bonito, 17 (48,5%) apresentaram títulos de anticorpos para arbovírus. Destas 4 (11,4%) amostras foram positivas para o gênero *Alphavirus*, 5 (14,28%) amostras foram positivas para o gênero *Flavivirus*. Reações monotípicas foram observados para o vírus Mayaro (n=10), para o vírus Oropouche (n=5) e seis (17,1%) amostras apresentaram títulos para mais de um arbovírus (Tabela 2).

Os títulos dos soros dos quatro animais que foram positivos para *Alphavirus* variaram de 1:40 a 1:640. Os títulos dos soros dos cinco animais que foram positivos para *Flavivirus* variaram de 1:40 a 1:1280. Os títulos sorológicos que apresentaram reação monocítica para o vírus Mayaro variaram de 1:80 a 1:640. Os títulos dos soros que apresentaram reação monocítica para o vírus Oropouche variaram de 1:20 a 1:160.

Dos animais que apresentaram positividade para mais de um arbovírus, dois apresentaram títulos para *Alphavirus* e Oropouche, dois apresentaram títulos para Mayaro e Oropouche, um para *Flavivirus* e Mayaro e um para *Alphavirus* e *Flavivirus*.

Dos dois animais que foram positivos para *Alphavirus* e Oropouche, o primeiro apresentou títulos que variaram de 40 a 320 para *Alphavirus* e de 80 para *Flavivirus*. Já o segundo animal apresentou títulos que variaram de 40 a 320 para *Alphavirus* e de 20 para *Alphavirus*. Dos dois animais que foram positivos para Mayaro e Oropouche, o primeiro apresentou títulos de 80 para Mayaro e 40 para Oropouche. Já o segundo animal apresentou títulos de 160 para Mayaro e 160 para Oropouche.

Os resultados da titulação e positividade dos primatas capturados estão apresentados na Tabela 3 e os resultados da titulação dos soros dos animais que tiveram reação para mais de um arbovírus encontram-se na Tabela 4.

Tabela 1 – Distribuição das espécies e sexo dos primatas de vida livre e de cativeiro capturados nos municípios de Bonito, Campo Grande e Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil – 2010

Espécie de primatas	Municípios			Sexo	Total
	Bonito	Jardim	Campo Grande	Fêmea / Macho	
<i>Allouata caraya</i>	-	-	2	0 / 2	2
<i>Callicebus Donacophelus</i>	-	-	1	0 / 1	1
<i>Cebus apella</i>	35	11	16	28 / 34	62
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>28 / 37</b>	<b>65</b>

Tabela 2 – Arbovírus identificados das amostras dos sessenta e cinco primatas não humanos por município de captura, Mato Grosso do Sul, Brasil - 2010

Arbovírus	Município					
	Bonito (n=35)		Jardim (n=11)		Campo Grande (n=19)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Flavivirus</i>	5/35	14,2	-	-	1/19	5,2
<i>Alphavirus</i>	4/35	11,4	-	-	-	-
Mayaro	10/35	28,5	-	-	-	-
Oropouche	5/35	14,2	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>17/35</b>	<b>48,5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1/19</b>	<b>5,2</b>

Tabela 3 - Resultados da titulação para as arboviroses, por meio do teste de Inibição de Hemaglutinação (IH) e positividade dos sessenta e cinco primatas de vida livre capturados e de cativeiro, nos municípios de Bonito, Campo Grande e Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil - 2010

Resultados IH* (títulos de anticorpos)	Titulação								Total	
	<i>Alphavirus</i>		<i>Flavivirus</i>		Mayaro		Oropouche			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20			1	1,5			1	1,5	2	3,0
40							1	1,5	1	1,5
80	1	1,5			2	3,0	2	3,0	5	7,6
160			1	1,5	7	10,7	1	1,5	9	13,8
320	2	3,0	1	1,5					3	4,6
640	1	1,5	1	1,5	1	1,5			3	4,6
1280			1	1,5					1	1,5

\*Resultado do teste IH: positivo IH  $\geq$  20

Tabela 4 - Título dos soros de seis primatas capturados no município de Bonito que apresentaram positividade para mais de um arbovírus, Mato Grosso do Sul, Brasil - 2010

<b>Amostra / tipo de reação</b>	<b>Título <i>Alphavirus</i></b>	<b>Título <i>Flavivirus</i></b>	<b>Título Mayaro</b>	<b>Título Oropouche</b>
1 (Alphavirus / Oropouche)	320	-	-	80
1 (Alphavirus / Oropouche)	320	-	-	20
1 (Alphavirus / Flvavivirus)	80	160	-	-
1 (Flavivirus / Mayaro)	-	1280	160	-
1 (Mayaro / Oropouche)	-	-	80	40
1 (Mayaro / oropouche)	-	-	160	160

## 6.2 Resultados de testes de isolamento viral

Nenhum dos camundongos inoculados com as amostras séricas dos 65 primatas oriundos do estudo apresentou evidência de sinais de infecção do sistema nervoso central. Das 35 amostras submetidas ao teste de isolamento viral em células clone C6/36, nenhuma induziu à formação de ECP nas culturas empregadas.

## 6.3 Resultados da captura de vetores

Até a conclusão do estudo somente foram liberados os resultados laboratoriais da identificação e tentativa de isolamento viral dos vetores capturados no município de Jardim-MS.

Foram capturadas 122 espécies de vetores competentes associados a transmissão de alguns *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*, conforme apresentado na Tabelas 5.

Tabela 5 - Diversidade e abundância das espécies de vetores potenciais transmissores de arbovirozes, capturados em ambientes silvestres no município de Jardim, Mato Grosso do Sul, Brasil - 2010

<b>Espécie</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<i>Aedes scapularis</i>	11	9,01
<i>Aedes serratus</i>	48	39,34
<i>Culex species</i>	8	6,55
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	11	9,01
<i>Psorophora ferox</i>	9	7,37
<i>Sabethes ferox</i>	4	3,27
<i>Sabethes albiprivus</i>	3	2,45
<i>Sabethes chlopterus</i>	1	0,81
<i>Sabethes glaucodaemon</i>	3	2,45
<i>Sabethes intermedius</i>	24	19,67
<b>Total</b>	<b>122</b>	<b>100</b>

## 7 DISCUSSÃO

As arboviroses em quase sua totalidade são zoonoses mantidas em natureza em um ciclo de vertebrados não humanos e artrópodes. Conseqüentemente, as pessoas que mantêm contacto com os focos enzoóticos são as que correm maior risco de adquirir a infecção, o que representa um problema à saúde pública (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Alguns arbovírus têm surgido periodicamente em áreas urbanas, como o vírus Dengue (VDEN) e vírus Oropouche (VORO), ou em áreas periurbanas, como o vírus Mayaro (VMAY) e o da febre amarela (VFA). Apresentam sob a forma de epidemias infectando comunidades susceptíveis e causando doença febril exantemática e/ou febres hemorrágicas. Outros arbovírus podem causar doenças do sistema nervoso central e meningites, com no caso dos vírus da Encefalite Saint Louis (SLEV), do Rocio (VROC), da Encefalite Eqüina do Leste (VEEE) e da Encefalite Eqüina do Oeste (VEEW) (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Os estudos das arboviroses envolvem a virologia, a sorologia, a entomologia, além da ecologia e da zoologia (DÉGALLIER *et al.*, 1989). Como demonstrado neste estudo, a avaliação sorológica em primatas não humanos como indicador da circulação de arbovírus e a utilização destes como “animais sentinelas” em estudos soropidemiológicos, é um método factível para obtenção de informações sobre a circulação de vírus em ambientes naturais (SVOBODA, 2007). Para detectar níveis de distribuição de soropositividade e de títulos de anticorpos foi realizado inquéritos transversais em animais de vida livre e de cativeiro, como descrito por Thoyse *et al.* (2003).

A utilização dos primatas não humanos para detecção da circulação de alguns arbovírus se torna um método factível por tratar-se de espécies arbóreas e geralmente diurnas, sendo mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres, no entanto, na maioria das vezes apresentam baixos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (THOYSE *et al.*, 2003). Além disso, os primatas podem agir como importantes hospedeiros no ciclo de diversas zoonoses e, como fazem parte de um *habitat* com grande diversidade biológica, servem como “sentinelas naturais” na vigilância de várias viroses emergentes.

Características fisiológicas e genéticas comuns aos antropóides primatas, incluindo o homem, e a interação entre eles, observados nas práticas de ecoturismo,

aumentam o risco de transmissão de patógenos comuns, principalmente através da via vetorial (WOLFE *et al.*, 1998), observado nos locais de realização da presente pesquisa.

No presente estudo o teste de IH foi utilizado com a finalidade de detectar níveis de distribuição de soropositividade e de títulos de anticorpos em PNH para obter informações da circulação de alguns arbovírus. Esse teste é muito usado em inquéritos sorológicos, pois consegue detectar anticorpos durante um longo período após infecção natural. Ele é considerado um teste de alta sensibilidade e baixa especificidade quando comparado a outros, como o teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina M (IgM) denominado MAC-ELISA (VASCONCELOS, 2003).

Nesse estudo detectou-se reação cruzada entre os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* em cinco amostras séricas e ao gênero *Alphavirus* em quatro amostras, o que impossibilitou a definição do vírus infectante e do tempo de infecção dos animais. No teste de IH é comum observar-se a ocorrência de reação cruzada entre os vírus pertencentes aos diferentes gêneros citados (VASCONCELOS, 2003). O SLEV, o VROC e o VNO formam um complexo antigênico com o JEV, o que dificulta a interpretação dos resultados dos testes de IH, fazendo-se necessária a realização de testes mais específicos (PETERSEN; ROHRIG, 2001). Desta forma, as análises dos resultados dos testes de IH devem ser feitas de forma cautelosa principalmente quando as amostras investigadas forem procedentes de localidades onde é comum a co circulação de diferentes arbovírus (SILVA, 2010), como observado nos resultados desse estudo, em que seis amostras de primatas apresentaram títulos para mais de um arbovírus. Devido à proteção imune cruzada é possível que alguns arbovírus permaneçam silenciosos no Brasil.

Resultados positivos para a presença de anticorpos contra *Flavivirus* sugerem que o hospedeiro, em algum momento, foi exposto a algum dos arbovírus estudados e que produziu anticorpos contra os mesmos (THOISY *et al.*, 2003).

No presente estudo, a tentativa de isolamento viral das amostras de sangue dos animais em cultura de células de mosquitos *Aedes Albopictus*, clone C6/36, e por inoculação em camundongos recém-nascidos, resultou negativa. O isolamento viral de amostras de sangue de animais e pacientes através da inoculação em tecidos de camundongos recém-nascidos e em cultivo celular é considerado o

padrão ouro para o diagnóstico virológico e um método sensível e econômico (VASCONCELOS, 2003).

Os resultados negativos encontrados no isolamento viral em camundongo e no cultivo celular do presente estudo coincidem com os encontrados em um estudo com 35 primatas não humanos do departamento de San Pedro localizado na região central do Paraguai, onde buscava-se isolar o VFA em cultivo celular em linhagem Vero E6, provavelmente pelo baixo número de animais capturados (ROIG *et al.*, 2009).

Diferentemente do presente estudo, por inoculação em camundongos recém-nascidos e por RT-PCR, o VFA foi isolado do sangue e de amostras de vísceras provenientes de um primata do gênero *Alouatta*, que foi a óbito no município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, no ano de 2008, onde se buscava evidências da circulação do vírus na região na qual havia relatos de ocorrência de epizootia em primatas (BATISTA, 2008). Outros isolados foram relatados na Bolívia, durante a ocorrência de epizootias em PNH, nos quais o VFA foi amplificado de amostras de quatro primatas pela técnica RT-PCR (MÉNDES *et al.*, 2007).

O VFA também foi isolado em uma amostra de *Alouatta caraya* (TORRES *et al.*, 2003) e a partir de 23 mosquitos da espécie *Haemagogus leucocelaenus* em área de ocorrência de epizootia no Estado do Rio Grande do Sul em 2002. (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Mediante esse acontecimento o Ministério da Saúde normatizou a vigilância de epizootia como parte da vigilância da FA objetivando identificar áreas silvestres factíveis para ocorrência do vírus amarelo.

Em 2008, o VFA foi isolado em 33 municípios do Rio Grande do Sul, a partir de amostras de primatas durante uma epidemia por FA (RIO GRANDE DO SUL, 2011) e em São Paulo, a partir de primatas mortos em 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b). A ocorrência de epizootias de FAS e a presença do *Aedes aegypti* em diversas regiões apontam para um iminente risco de reintrodução da FA em áreas periurbanas, daí a importância de ser mantida a vigilância das arboviroses (TORRES *et al.*, 2003).

Estudos semelhantes aos inquéritos sorológicos em PNH no Mato Grosso do Sul, com objetivo de detectar anticorpos de arbovírus, foram realizados em outras regiões do Brasil e em outros países da América Central e do Sul, como durante a vigilância ativa da FA no Rio Grande do Sul, que ocorreu no período de 2002 a 2007, capturando-se 181 primatas não humanos de várias regiões e detectando-se,

por teste de neutralização, anticorpos para o VORO (n=1) e para o SLEV (n=16) nesses animais (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Um estudo com 570 soros de *Alouatta caraya* na região do Porto Primavera, localizado no município de Presidente Epitácio, no estado de São Paulo, apresentou resultado negativo para a presença de anticorpo IgG contra o VFA, resultado este semelhante aos observados no município de Jardim, sugerindo, a ausência da circulação do VFA na região (LIMA *et al.*, 2010).

Alguns arbovírus, como o SLEV e o VNO, que não foram identificados no presente estudo, são introduzidos em determinadas regiões por aves migratórias que, em determinadas épocas do ano, como primavera e verão, deslocam-se para regiões que apresentam condições climáticas favoráveis à reprodução. A não identificação da presença dessas duas espécies de vírus pode ser em consequência do tamanho limitado da amostra coletada, da disponibilidade e susceptibilidade dos hospedeiros e das populações de vetores, que de certa forma influenciam muito no tamanho da população viral e na taxa de transmissão (MACLEAN; SCOTT, 2010).

Nas províncias de Chaco e Corrientes, no Norte da Argentina, “animais sentinelas” e vetores transmissores foram utilizados em um inquérito soropidemiológico com o objetivo de detectar o VFA. Na ocasião foram detectados anticorpos anti SLEV em quatro amostras séricas, pelo teste de IH. Destas, duas foram confirmadas por NT, sugerindo a possível participação destes primatas no ciclo natural do vírus. O SLEV também foi isolado de amostras de humanos, roedores e artrópodes na Argentina (BONTINELLI *et al.*, 2010).

Em outro estudo soropidemiológico com primatas selvagens realizado na divisa do Estado do Paraná com Mato Grosso do Sul, capturou-se 123 primatas, destes 21 amostras séricas apresentaram títulos de anticorpos para SLEV, por teste de IH (SVOBODA, 2007), sugerindo a participação dos primatas no ciclo de manutenção do SLEV na região do Conesul. O SLEV também foi detectado no Estado do Pará em *Culex declarator* e em aves migratórias durante casos de epizootia observados em primatas (VASCONCELOS *et al.*, 1991), ratificando a importância desses hospedeiros no ciclo da doença.

As altas taxas de anticorpos para o VMAY encontradas nos soros dos animais capturados nas regiões de matas do Município de Bonito sugerem a possível circulação deste vírus nessas localidades. Apesar da circulação do VMAY nas localidades estudadas do município, os vetores podem voar por longas

distâncias infectando macacos que vivem em matas nos arredores da cidade comprometendo a saúde dos indivíduos que habitam essas localidades (THOISY *et al.*, 2003). Além disso, o vírus também pode ser introduzido na área urbana da cidade, por aves virêmicas ou por viajantes humanos infectados, já que pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti* (TESH *et al.*, 1999).

Um inquérito sorológico que utilizou 150 primatas sentinelas realizadas na Guiana Francesa detectou altos títulos de anticorpos para o VMAY, também sugerindo a possível circulação deste vírus no país. Amostras séricas de humanos demonstraram a alta prevalência de anticorpos para arbovírus no mesmo estudo (TALARMIM *et al.*, 1998), Anticorpos para o VMAY também foram encontrados em primatas da espécie *Callithrix argentata*, por teste de IH durante uma investigação de um surto de Mayaro e FA em Belterra no Estado do Pará (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

A detecção de anticorpos para o VORO nas amostras dos primatas do município de Bonito sugere a possível circulação deste vírus naquela região, o que torna as populações locais e turistas, que mantêm contato estreito com o ambiente silvestre, suscetíveis à infecção pelo VORO (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Em Minas Gerais, durante a vigilância da febre amarela e Oropouche, o VORO foi isolado em uma amostra do fígado de um primata do gênero *Callithrix* (NUNES *et al.*, 2005), sendo este considerado um novo hospedeiro para o VORO no Brasil.

Outras espécies de animais, como eqüinos, também podem ser utilizados como animais sentinelas para vigilância e *Flavivirus*, como em estudos sorológicos realizados em eqüinos no estado do Mato Grosso do Sul, onde se detectou, por ELISA, anticorpos IgG específicos para VNO e para SLEV, e pelo teste de IH e NT, altas taxas de títulos de anticorpos para o SLEV em eqüinos do município de Maracaju, sugerindo a intensa circulação desses vírus no Estado (SILVA, 2010; RODRIGUES *et al.* 2010). Outro estudo sorológico em amostras de 22 eqüinos e em culídeos foi realizado no Paraná, mas resultou negativo (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

A diversidade de espécies entomológicas capturadas no município de Jardim torna a população dessa área susceptível à infecção por arbovírus, como o vírus da FA e Mayaro, por se tratar de um ambiente onde há circulação de pessoas ligadas ao ecoturismo, possuir um grande número de primatas e pela presença de mosquitos da espécie *Haemagogus leucocelaenus* e do gênero *Sabethes*, já que os

macacos são os principais reservatórios amplificadores e os *Haemagogus leucocelaenus*, juntamente com os *Sabethes*, são os principais vetores disseminadores da FA e do Mayaro (VASCONCELOS *et al.*, 2003). O VMAY também foi detectado em pacientes de São Paulo que realizavam atividades de pesca no município de Camapuã-MS, localizado na região nordeste do Estado, ratificando sua circulação além da região amazônica (COIMBRA *et al.*, 2007).

Nas Américas, os artrópodes das espécies *Culex tarsalis*, *Culex pipens* e *Culex quinquefasciatus*, *Culex declarator* e *Culex coronator*, apresentam importante papel em ciclos enzoóticos e epizoóticos do SLEV (LAVOSEI, 2003). A captura de artrópodes do gênero *Culex* no município de Jardim torna a localidade vulnerável à infecção por SLEV. O *Sabethes belisarioi*, capturado em Jardim, é considerado um potencial vetor do SLEV, uma vez que foi isolado pela primeira vez no Brasil, em 1960, em um lote de *Sabethes belisarioi* (FIGUEIREDO, 2007).

No Brasil, o *Culex quinquefasciatus* juntamente com o *Aedes scapularis*, também capturado em Jardim, e o *Aedes albopictus* são considerados importantes vetores transmissores do VNO (NATAL; UENO, 2004), colocando a localidade de pesquisa vulnerável a introdução desse vírus. Já nos EUA mosquitos do gênero *Culex*, em especial a espécie *Culex pipiens*, são considerados vetores do VNO (TURREL *et al.*, 2005).

A migração de pássaros reservatórios silvestres, infectados com VNO do hemisfério norte para o Brasil, associada às condições climáticas favoráveis, à biodiversidade dos ecossistemas e à abundante população de *Culex*, torna possível a emergência do VNO no Brasil, e em Mato Grosso do Sul. Em 2006, na Argentina o VNO foi isolado de amostras de equinos e de seres humanos que apresentavam febre, cefaléia e dores musculares (MORALES *et al.*, 2006).

O culicídeo *Psorophora ferox* e o *Aedes scapularis* foram incriminados vetores potenciais para o VROC, como observado em áreas de mata atlântica, no sudeste do estado de São Paulo. A captura desses vetores no município de Jardim favorece a circulação do vírus nas localidades pesquisadas. De acordo com Figueiredo (2007) o VROC foi isolado em humanos da região Sudeste e em aves silvestres do Sul do Brasil, representando uma ameaça permanente de surtos de encefalites graves.

Considerado um dos principais vetores para o VORO, o *Aedes serratus* (ROBERTS *et al.*, 1981), capturado no município de Jardim-MS, torna a localidade vulnerável a presença do vírus.

O não isolamento viral nas amostras de culicídeos no presente estudo pode ser decorrente da influência de fatores biológicos e ecológicos, tais como, pequena quantidade de mosquitos coletados e densidade vetorial baixa devido às condições ambientais na época das coletas, que alternaram dias frios e chuvosos (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

A presença de vetores transmissores de arbovírus também foi identificada em uma investigação preliminar pela presença de arbovírus em amostragem de culicídeos capturados no município de Corumbá, localizado no Pantanal do Mato Grosso do Sul no ano de 2010. Foram identificados o gênero *Culex* e *Sabethes*, sugerindo que a região é uma importante área de vigilância para arbovírus no Centro-Oeste do Brasil, pelas condições ambientais e climáticas favoráveis à circulação de arboviroses (CORRÊA *et al.*, 2010).

O desmatamento, a urbanização desorganizada e outras mudanças ecológicas promovem o aumento da população de vetores transmissores, principalmente artrópodes da espécie *Aedes aegypti* e do gênero *Culex*, o que favorece a emergência de arboviroses. Além disso, devido à modernização dos meios de transportes os artrópodes transmissores podem se deslocar e se disseminar em vários países, como observado com o VDEN, o VNO e vírus Chikungunya (FIGUEIREDO, 2007), gerando um potencial para a ocorrência de epidemias.

Considerando que as localidades pesquisadas nos municípios de Bonito e Jardim são utilizadas para fins de atividade de ecoturismo, o resultado do presente estudo é de grande importância para saúde pública, pois indicam risco de infecção em humanos que freqüentam esses locais, já que pessoas que mantêm contato com os focos enzoóticos são as que correm maior risco de adquirir a infecção. Em relação aos animais do CRAS, a recepção indiscriminada de animais originados de diversas regiões do Estado, e por este se localizar no perímetro urbano da cidade de Campo Grande, é possível a introdução de arbovírus, podendo gerar agravos à saúde de indivíduos que moram próximos ou freqüentam a localidade.

O Estado do Mato Grosso do Sul, por fazer fronteira com outros países da América do Sul como Paraguai e Bolívia nos quais já foram detectados arbovírus em

uma variedade de espécies de primatas e de artrópodes, apresenta condições propícias para a ocorrência de surtos e epidemias causadas pelo VMAY, pelo VORO e por alguns *Flavivirus*. Portanto, estudos desta natureza, são de extrema importância, pois através da detecção de anticorpos para arbovírus e do isolamento viral, bem como da identificação dos vetores transmissores circulantes, pode-se obter informações sobre os riscos de infecção a que estas populações estão sendo expostas. Os resultados obtidos por este tipo de pesquisa e a continuidade dessa atividade podem ajudar na descoberta de enfermidades que atinjam primatas e que possam ser transmitidas ao homem, permitindo a prevenção de episódios nas populações humanas (ALMEIDA *et al.*, 2008).

## 8 CONCLUSÕES

Diagnosticou-se pela primeira vez a infecção por *Flavivirus*, *Alphavirus*, vírus Mayaro e Oropouche em primatas no estado de Mato Grosso do Sul.

As taxas de anticorpos para VMAY e VORO observadas nos animais capturados sugerem uma intensa circulação desses arbovírus nos locais pesquisados no município de Bonito.

A soropositividade para mais de um arbovírus observada nos primatas capturados nos municípios de Bonito e Campo Grande é sugestiva de cocirculação de diferentes arbovírus nas localidades estudadas, impossibilitando a definição do vírus infectante e do tempo de infecção dos animais.

Inquéritos sorológicos em primatas não humanos, pelo teste de IH, mostrou-se ser uma abordagem adequada à vigilância das arboviroses no estado do Mato Grosso do Sul.

Verificou-se que a localidade pesquisada no município de Jardim, é susceptível a circulação de arboviroses pela diversidade de espécies entomológicas capturadas.

## REFERÊNCIAS

- ALKA, B. K.; BHARATI, K. MALIK, Y.; VRATI, S. Immunogenicity and protective efficacy of the E. coli expressed domain III of Japanese encephalitis virus envelope protein in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 196, n. 4, p. 227-231, Mar. 2007.
- ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E. DOS; CARDOSO, J. C.; FONSECA, D. F.; TORRES, M. A. N.; CARDOSO, L.L.; PAZ, F. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES, S. G. Surveillance for yellow fever and other arboviruses in free-ranging primates in southern Brazil: na important tool for emerging diseases detection. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2008, Atlanta. **Program and abstracts book**, Atlanta: Hyatt Regency Atlanta, 2008. p. 67.
- ARAUJO, T. P.; RODRIGUES, S. G.; COSTA, M. I. W. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 579-584, nov./dez. 2002.
- ARGENTINA. Ministério de Salud de La Nación. **Detección de vírus del nilo occidental (VNO) em humanos**, 2006. Disponível em: <[http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/internacional/VNO casos en humano.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/internacional/VNO_casos_en_humano.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2010.
- AZEVEDO, R. S. S.; SILVA, E. V. P.; CARVALHO, V. L.; RODRIGUES, S. G.; NUNES NETO, J. P.; MONTEIRO, H. A. O.; PEIXOTO, V. S.; CHIANG, J. O.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Mayaro fever vírus, brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 11, p. 1830-1832, Nov. 2009.
- BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian *Flavivirus* phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 379-382, Apr. 2003.
- BARRETT, A. D.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, n. 21, p. 308-313, June 2009.
- BARNETT, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. **Emerging Infections**, Boston, v. 44, n. 6, p. 850-856, Mar. 2007.
- BATISTA, P. M. **Relatório sobre vigilância da febre amarela no município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, 2008**. Campo Grande: Secretaria de Estado de Saúde, 2008.
- BENTLER, K. T.; HALL, J. S.; ROOT, J. J.; KLENK, K.; SCHMIT, B.; BLACKWELL, B. F.; RAMEY, P. C.; CLARK, L. Serologic evidence of West Nile Virus exposure in north american mesopredators. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 76, n. 1, p. 173-179, Jan. 2007.

BONTTINELLI, O.; PAZ V.; ENRIA, D.; SABATTINI, M.; SOLIS, G.; PEDRONI, E. Infecciones por flavivirus y alphavirus em monos *Alouatta caraya* del Nordeste Argentino, año 2001. **XXIII Sesión de Comunicaciones Científicas**. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, oct. 2002. Disponível em: <<http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-051.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: zoonoses**. Brasília, Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela**. Brasília: Ministério da Saúde, 1999.

BRONZONI, M. R. V.; MORELI, M. L.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphaviruses diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 8, p. 456-461, Aug. 2004.

CALISHER, C. H.; GUTIÉRREZ, E. V.; MANESS, K. S. C.; LORD, R. D. Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243-248, 1974.

CASALS, J.; BROWN, M. D. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 99, n. 5, p. 429-449, May 1954.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division of vector-borne infectious diseases. **Arboviral zoonosis transmission cycle**, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Arbor/schemat.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2010.

COIMBRA, T. L. M.; SANTOS, C. L. S.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S. M. C.; BISORDI, I.; NAGAMORI, A. H.; MARTI, A.; SANTOS, R. N.; FIALHO, D. M.; LAVIGNE, S.; BUZZAR, M. R.; ROCCO, I. M. Mayaro vírus: imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 221-224, Jul./Aug. 2007.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CORRÊA, A. P.; TAVARES, F. N.; ALENCAR, J.; SILVA, J. S.; MURTA, M.; FREIRE, N. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; SANTANA, H. G.; GUIMARÃES, A. E.; SILVA, E. E. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 17-23, jan./fev. 2010.

DÉGALLIER, N.; HERVÉ, J. P.; ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, J. F. S. T.; SÁ FILHO, G. C. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisa atuais e perspectiva. **Revista da Fundação SESP**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 127-129, 1986.

FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; ROSA, A. T. ; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalite eqüina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 232-235, jun. 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Arboviroses emergentes no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar./abr. 2007.

GOMES, A.C.; TORRES, M. A. N.; FERRI, L.; COSTA, F. R.C.; SILVA, A.M.S. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 95-97, fev. 1999.

GUERRA, Z. **Publicação eletrônica** – informações sobre Febre Amarela [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por < paulo.mira@saude.ms.gov.br > em jan. 2009.

GUBLER, D. J.; KUNO, G., SATHER, G. E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 33, n. 1, p. 158-165, Jan. 1984.

HERVÉ, J. P.; DÉGALLIER, N.; SÁ FILHO, G. C.; ROSA, A. P. A. T. Ecologia da febre amarela silvestre no Brasil. **Revista da Fundação SESP**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 131-134, 1986.

HOCH, A. L.; PETERSON, N. E.; LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 30, n. 3, p. 689-698, May 1981.

JOHNSON, B. W.; CHAMBERS, T. V.; CRABTREE, M. B.; FILIPPIS, A. M. B.; VILARINHOS, P. T. R.; RESENDE, M. C.; MACORIS, M. L. G.; MILLER, B. R. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* for Brazilian yellow fever virus isolate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 6, p. 611-613, Nov. 2002.

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

LEAL, S. **Publicação eletrônica** – informações epizootias primatas Paraguai [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por < paulo.mira@saude.ms.gov.br > em mai. 2011.

LIMA, M. A.; LIEBER, N. S. R.; DUARTE, A. M. R. C. Circulation of antibodies against yellow fever vírus in a simian population in the area of Porto Primavera hydroelectric plant, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 11-15, jan./feb. 2010.

LOVOSEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: CIMERMAN, S.; CIMERMAM, B. (Ed.). **Culicídeos (Mosquitos)**. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 6, p. 59-102.

LINDSEY, N. P.; STAPLES, J. E.; LEHMAN, J. A.; FISCHER, M. Surveillance for human West Virus Disease – United States, 1999-2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 59, n. 2, p. 1-17, Apr. 2010.

MARQUES, J. C. B.; FREITAS, D. S. The role of monkeys, mosquitos, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health. **Tropical Conservation Science**, v. 3, n. 1, p. 78-89, Mar. 2010.

MCLEAN, R. G.; SCOTT, T. W. Avian hosts of St. Louis encephalitis virus. **Wildlife Damage Management, Internet Center for Bird Control Seminars Proceedings**, Lincoln, nov. 1979. Disponível em: <<http://commons.unl.edu/icwdmbirdcontrol/20>>. Acesso em: 28 jun. 2010.

MÉNDES, J. A.; PARRA, É.; NEIRA, M.; REY, G. J. Detección por reacción cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa de virus de la fiebre amarilla em monos silvestres: a herramienta sensible para la vigilancia epidemiológica. **Biomédica**, Bogotá, v. 27, n. 3, p. 461-467, jul./set. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre amarela silvestre, Brasil, 2009. **Boletim de Atualização**, Brasília, DF, p 1-10, dez. 2009a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre amarela silvestre, Estado de São Paulo, 2009. **Boletim de Atualização**, Brasília, DF, p. 1-8, jun. 2009b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

MONDINE, A.; CARDEAL, I. L. S.; LÁZARO, E.; NUNES, S. H.; MOREIRA, C. C.; RAHAL, P.; MAIA, I. L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D. V. N.; RÚBIO, F. G.; CABRERA, E. M. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, F. G.; BRONZONI, R. V. M.; NOGUEIRA, M. L. Saint Louis Encephalites Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. 176-178, Jan. 2007.

MORALES, M. A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J. B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; West Nile Virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. 1559-1561, Oct. 2006.

NATAL, D.; UENO, H. M. Vírus do Nilo Ocidental: característica da transmissão e implicações vetorais. **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 417-433, jul./set. 2004.

NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S. S.; ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche vírus isolation, Southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1610-1613, Oct. 2005.

PETERSEN, L. R.; ROEHRIG, J. T. West Nile Virus: a reemerging global pathogen. **Revista Biomédica**, Yucatan, v. 12, n. 3, p. 208-216, Jul./Sept. 2001.

PETERSON, T. A.; SIGUENZA, A. G. N.; MEYER, E. M. El virus del Oeste del Nilo (VON) en las Américas: un resumen ecológico y geográfico. **Epidemiología**. México, v. 20, n. 34, p. 1-3, ago. 2003.

PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 15-23, 1962.

PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; ROSA, J. F. T.; GABBAY, Y. B.; MELLO, W. A.; LEDUC, J. W. An outbreak of Mayaro vírus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 30, n. 3, p. 674-681, May 1981.

RAPPOLE, J. H.; DERRICKSON, S. R.; HUBÁLEK, Z. Migratory birds and spread of West Nile Virus in the Western hemisphere. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 6, n. 4, p. 319-328, July/Aug. 2000.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Estado de Estado de Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da febre amarela no RS**, maio 2011. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br/dados/1305820907784Febre%20amarela%20no%20RS%20-0situa%E7%E3o%20em%20maio%20de%202011.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2011.

ROBERTS, D. R.; HOCH, A. L.; DIXON, K. E.; LLEWELLYN, C. H. III. Entomological observations from three epidemics in Pará, Brazil, 1975. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 30, n. 1, p. 165-171, Jan. 1981.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L. S.; BISORDI, I.; PRETELLA, S. M. C. N.; PEREIRA, L. E. SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. I. M.; BESSA, T. A. F.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. R. Q.; CERRONI, M. P.; MARTI, A. T.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Luis e encephalites vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 281-285, Sept./Oct. 2005.

ROCHA, V. J.; AGUIAR, L. M.; LUDWIG, G.; HILST, C. L. S.; TEIXEIRA, G. M.; SVOBODA, W. K.; SHIOZAWA, M. M.; MALANSKI, L. S.; NAVARRO, I. T.; AMRIÑO J. H. F.; PASSOS, F. C. Techniques and trap models for capturing wild tufted capuchins. **American Journal of Primatology**, v. 28, n. 1, p. 231-243, Feb. 2007.

RODRIGUES, S. G.; OLIVA, O. P.; ARAUJO, F. A. A.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; HENRIQUES, D. F.; SILVA, E. V. P.; RODRIGUES, D. S. G.; PRAZERES, A. S. C.; NETO, J.T.; VASCONCELOS, P; F. C. Epidemiology os Saint Louis encephalitis vírus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Belém, v. 1, n. 1, p. 81-86, mar. 2010.

ROIG, C.; ROJAS, A.; GUILLÉN, Y.; ARIA, L.; MENDONZA, L.; ACOSTA, M. E.; MEZA, T.; ROSA, L; ECHAG, G.; MULLER, V. V.; BILBAO, N. V.; SCHININI, A.; RODAS, J. H.; AQUINO, V. H. Estudio de fiebre amarilla em primates em área de brote de los departamentos de San Pedro y Central de Paraguay. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de La Salud**, v. 7, n. 1, p. 40-45, jun. 2009.

SANTOS, E., CARDOSO, J. C.; FONSECA, D. F.; DIEDRICH, G.; BERGINI, M.; SCHERER, S. B.; ALMEIDA, M. A. B. Vigilância do Vírus do Nilo Ocidental no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Estado de Saúde do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 5-7, jun. 2007.

SANTOS, F. G. A.; SALAS, E. R.; MARQUES, J. C. B.; MARQUES, C. C.; FARIAS, E. M. P. Cloridrato de tiletamina associado com cloridrato de zolazepam na tranquilização e anestesia de calitriquídeos (Mammalia, Primates). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 6, p. 539-545, dez.1999.

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado de Saúde. Divisão de Zoonoses do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, n. 55, p. 12-15, jul. 2008.

SHOPE, R. E. The use of a micro hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne vírus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 11, Parte A, p. 167-171, Sept. 1963.

SHUKLA, J.; BHARGAVA, R.; DASH, P.; PARIDA, M.; TRIPATH, N.; RAO, P. Cloning and expression of domain III of the envelop gene of Japanese encephalitis virus: evaluation for early clinical diagnosis by IgM ELISA. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 158, p. 165-170, June 2009.

SILVA, J. R. **Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de Saint Louis , Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral**. 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2010.

SPINSANT, L. I.; RÉ, V. E.; DIAZ, M. P.; CONTIGIANI, M. S. age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Cordoba, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 59-62, Mar./Apr. 2002.

STUYFT, P. V. D.; GIANELLA, A.; PINARD, M.; CESPEDES, J.; LORA, J.; PEREDO, C.; PELEGRINO, J. L.; VORNDAM, V.; BOELAERT, M. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolívia. **Lancet**, London, v. 353, n. 8, p. 1558-1562, May 1999.

SVOBODA, W. K. **Vigilância de epizootias em primatas não humanos como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de Interesse em Saúde Pública**. 2007. 136 f. Tese (Doutorado em ciência animal na área de concentração em sanidade animal) – Universidade Estadual de Londrina/UEL, Londrina, 2007.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. Expert Proteins Analysis System (ExPASy). Viral zone. **Flavivirus**: molecular biology, 2003. Disponível em: <[http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/24.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html)>. Acesso em: 25 fev. 2011.

TALARMIM, A.; CHANDLER, L. J.; KAZANJI, M.; THOISY, B.; DEBON, F.; LELARGE, J.; LABEAU, B.; BOURREAU, J. C. V.; SHOPE, R. E.; SARTHOU, J. L. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification e seroprevalence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 59, n. 3, p. 452-456, Sept. 1998.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 555-558, jun. 2010.

TESH, R. B.; WATTS, D. MM; RUSSELL, K. L.; DAMODARAN, C.; CALAMPA, C.; CABEZAS, C.; RAMIREZ G.; VASQUEZ, B.; HAYES, C. G.; ROSSI, C. A.; POWERS, A. M.; HICE, C. L.; CAHNDLER, L. J.; CROPP, B. C.; KARABATSOS, N.; ROEHRIG, J. T.; GUBLER, D. J. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical and Infectious Diseases**, Boston, v. 28, n. 1, p. 67-73, Jan. 1999.

THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro vírus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 10, p 1326-1329, Oct. 2003.

TORRES, J. R.; RUSSEL, K. L.; VASQUEZ, C.; BARRERA, R.; TESH, R. B.; SALAS, R.; WATTS, D. M. Family cluster of Mayaro Fever, Venezuela. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 10, n. 7, p. 1304-1306, July 2004.

TORRES, M. A. N.; SANTOS, E.; ALMEIDA, M. A. B.; CRUZ, L. L.; SPERB, A. F. Vigilância da febre amarela silvestre no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Estado de Saúde do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 1-7, 2003.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES S. G.; CRUZ, A. C. R. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. **Documento técnico nº 2. Instituto Evandro Chagas/ Fundação Nacional de Saúde**, Belém, 1994.

TURREL, M. J.; DOHM, D. J.; SARDELIS, M. R.; O'GUINN, M. L.; ANDREADIS, T. G.; BLOW, J. A. An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 42, n. 1, p. 57-62, Jan. 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.. Arboviroses. In: FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 9, p. 289-302.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, E.S.T. Arboviroses. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAM, B. (Ed.). **Medicina tropical**, São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 33, p. 363-386.

VASCONCELOS, P. F. C.; SPERB, A. F.; MONTEIRO, H. A. O.; TORRES, M. A. N.; SOUSA, M. R. S.; VASCONCELOS, H. B.; MARDINI, L. B. L. F.; RODRIGUES, S. G. Isolation of Yellow fever vírus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 1, p. 60-62, Jan. 2003.

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

VASCONCELOS P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. T.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, suplemento, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; DAGALIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Febre amarela. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Cejup, 1997. cap 17, p. 265-282.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 2, p. 117-124, Mar./June 1992.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P.; FILHO, G. C. S. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 465-476, nov./dez. 1991.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; GUERREIRO, S. C. G.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 271-278, ago. 1989.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KILBOURN, A.; SPIELMAN, A.; LAL, A. A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? **Emerging Infectious Disease**, Boston, v. 4, n. 2, p. 149-158, Apr./June 1998.

## APÊNDICE A

### Ficha de identificação, registro e coleta de amostras de primatas

Identificação da atividade:

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Natureza da atividade: ( ) Treinamento ( ) Investigação ( ) Pesquisa ( ) outro

Localidade da coleta: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ No. \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Referência: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Latitude (S): \_\_\_\_\_ Longitude (W): \_\_\_\_\_

Animal: ( ) Vida livre ( ) Cativo ( ) Domesticado ( ) Morto (epizootia)

Horário de captura: \_\_\_\_\_ Horário de soltura: \_\_\_\_\_

Data da morte: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Hora da morte: \_\_\_\_\_

Procedimento: ( ) Coleta de sangue

( ) Realização de necropsia: Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Gênero/espécie: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_ Micro-chip: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Histórico:

Animal sintomático: ( ) não ( ) sim Início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sintomas apresentados: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Hipótese diagnóstico: \_\_\_\_\_

Biometria:

Gênero/espécie: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_ Micro-chip: \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_ Mucosas: \_\_\_\_\_

Comprimento total: \_\_\_\_\_ Corpo: \_\_\_\_\_ Cauda: \_\_\_\_\_

Circunferência torácica: \_\_\_\_\_ Circunferência craniana: \_\_\_\_\_

Comprimento pé (direito): \_\_\_\_\_ mão (direita): \_\_\_\_\_ Orelha (direita) \_\_\_\_\_

Exame Geral:

Exame Externo

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Material enviado para laboratório:

1. Diagnóstico de arboviroses: (febre amarela, dengue, outros)

Sangue: ( ) Quantidade: \_\_\_\_\_ frascos      Soro: ( ) Quantidade: \_\_\_\_\_ frascos

Vísceras: \_\_\_\_\_

2. Outros:

I. Exame histopatológico ( )

II. Bacteriológico ( )

III. Viroológico ( )

IV. Sorológico ( )

V. Toxicológico ( )

VI. Parasitológico ( )

Amostras: \_\_\_\_\_

Tipo de fixador ou conservador: \_\_\_\_\_

Enviar para o laboratório: \_\_\_\_\_

Resumo dos achados:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Conclusão/desfecho:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Técnico Responsável:

\_\_\_\_\_

Médico Veterinário Responsável:

## ANEXO A



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 251/2010 do Mestrando Paulo Mira Batista, sob a orientação do Prof. Renato Andreotti e Silva, referente ao projeto de pesquisa, **“Pesquisa de arboviroses em primatas não humanos no Estado do Mato Grosso do Sul”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 24 de maio de 2010.

Campo Grande (MS), 24 de maio de 2010.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Steln', is written over a faint circular stamp. Below the signature, the name 'Dr. Joice Steln' is printed in a standard font.

Presidente em exercício da CEUA

## ANEXO B



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21808-2	Data da Emissão: 19/04/2010 10:05
Dados do titular	
Nome: Paulo Mira Batista	CPF: 662.154.801-00
Título do Projeto: Pesquisa de arboviroses em primatas não humanos para monitoramento da febre amarela	
Nome da Instituição : Secretaria de Saúde	CNPJ: 02.955.271/0001-26

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura e coleta de material biológico de primatas não humanos para pesquisa de arboviroses	10/2009	07/2010

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

## Outras ressalvas

1	Apesar da solicitação só ter especificado o município de Nova Andradina, a Área de Proteção Ambiental Das Ilhas e Várzeas do Rio Paraná está localizada em um total de 25 municípios, sendo 10 no Mato Grosso do Sul. Por isso, se o pesquisador for realizar seus estudos em outro município abrangido pela APA, ele necessita corrigir sua solicitação de pesquisa.
2	Caso sejam encontrados durante a pesquisa na UC primatas mortos ou algum dos capturados venha a falecer, comunicar por escrito a administração da UC.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Gislaine Coelho Brandão	Coleta, Manuseio de Material Biológico	867.646.081-72	-	Brasileira
2	Maria Lucia Rocha Toledo	Captura, Manuseio de Primatas	050.579.888-32	128598323 ssp-SP	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JARDIM	MS	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA BODOQUENA	UC Federal
2	BONITO	MS	PARQUE NACIONAL DA SERRA DA BODOQUENA	UC Federal
3	NOVA ANDRADINA	MS	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DAS ILHAS E VARZEAS DO RIO PARANÁ	UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 14466897



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21808-2		Data da Emissão: 19/04/2010 10:05	
Dados do titular			
Nome: Paulo Mira Batista		CPF: 662.154.801-00	
Título do Projeto: Pesquisa de arboviroses em primatas não humanos para monitoramento da febre amarela			
Nome da Instituição : Secretaria de Saúde		CNPJ: 02.955.271/0001-26	
4	PONTA PORÁ	MS	Area rural do Município de Ponta Porá
5	CORUMBA	MS	área rural do município de Corumbá
			Fora de UC
			Fora de UC

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Atelidae, Cebidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Atelidae, Cebidae

### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Puçá, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Outros métodos de captura/coleta(Rifle com dardo anestésico)

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNASA-Instituto Evandro Chagas	Laboratório de Arboviroses do Instituto Evandro Chagas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 14466897





**ANEXO C**

**AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL PARA PESQUISA EM  
UNIDADES DE CONSERVAÇÃO Nº 001/2010  
PROCESSO IMASUL Nº 23/108891/2009  
VALIDADE: JANEIRO de 2010 a JANEIRO de 2011**

O Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul/IMASUL, no uso de suas atribuições que lhe são conferidas de acordo com a Lei nº2268 de 31 de julho de 2001 e Portaria IMAP nº 013/02, expede a presente Autorização a PAULO MIRA BATISTA.

**INFORMAÇÕES GERAIS:**

Instituição: UFMS

Endereço: Departamento de Medicina Veterinária- Saúde Pública

Telefone: (67) 3318-1682/ 3028-2784

E-mail: paulo.mira@uol.com.br

**DO PROJETO:**

Título: "Arboviroses em Primatas não Humanos em Mato Grosso do Sul."

Local do Projeto: Parque Estadual do Prosa – PEP/Centro de Reabilitação de Animais Silvestres-CRAS

Município: Campo Grande-MS

**OBJETIVOS:**

- 1) Identificar a prevalência do vírus da febre amarela e outras arboviroses em primatas não humanos de vida livre e de cativeiro.
- 2) Identificar quais vetores envolvidos na transmissão das arboviroses nessas localidades.

**ATIVIDADES PREVISTAS:**

Antes da realização da pesquisa haverá a vacinação prévia e titulações sorológicas dos pesquisadores para a febre amarela, raiva, hepatite B e tétano, será utilizados os seguintes materiais de proteção: botas impermeáveis, aventais descartáveis, luva de raspa de couro (para contenção física dos animais), luvas de procedimento e equipamentos para comunicação de longo alcance.

Os animais serão tranquilizados utilizando protocolo anestésico a base de cloridrato de tiletamina de cloridrato de zolazepam (1:2), sendo adaptado para as condições necessárias para os procedimentos realizados.

Após a captura e sedação, a manipulação dos animais e a coleta dos materiais biológicos serão utilizadas luvas de procedimento. O animal será monitorado por meio de temperatura corporal e frequência cardíaca e respiratória. A coleta de sangue será feita por punção da veia femoral ou braquial, utilizando agulhas e seringas compatíveis com o porte do animal e calibre do vaso.

Os animais serão mantidos em gaiolas apropriadas, cobertas por lonas e afastadas de fatores estressantes e monitorados até o completo retorno anestésico.

**EQUIPE:**

1. Renato Andreotti e Silva (Orientador)
2. Gislaine Coelho Brandão

**DAS OBSERVAÇÕES/CONDICIONANTES:**

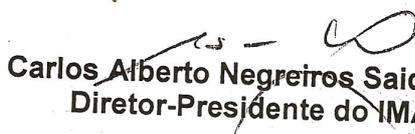
1. Esta Autorização é válida APENAS para as atividades descritas acima, durante o período de vigência estabelecido.

2. Esta autorização é válida por 1(um) ano, podendo ser renovada, caso necessário, através de pedido a GUC/IMASUL/SEMAC.
3. É necessário agendar a atividade de campo na UC, no mínimo com 48 horas de antecedência, pelos telefones (67) 33261370 –PEP e (67) 33266003- CRAS, falar com o (a) responsável pela Unidade de Conservação para verificação de disponibilidade de atendimento.
4. Fica estabelecido que os componentes da equipe deverão se apresentar ao (à) gerente ou responsável pelo Parque todas as vezes que for necessário o acesso à Unidade de Conservação, portando a presente autorização.
5. O pesquisador deverá ser acompanhado por um guarda-parque da Unidade de Conservação, durante os trabalhos de campo.
6. **O responsável pelo projeto deverá apresentar relatório parcial das atividades de campo semestral, que deverá conter, no mínimo: as atividades desenvolvidas, equipe envolvida, resultados alcançados e demais informações julgadas necessárias e/ou solicitadas pela GUC/IMASUL/SEMAC.**
7. **O responsável pelo projeto deverá apresentar relatório final, em duas vias impressas ou digital no máximo 90 (noventa) dias após o término da validade desta autorização, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente autorização.**
8. **O responsável pelo projeto deverá entregar cópia de trabalho científico produzido ou quaisquer publicações oriundas desta autorização a GUC/IMASUL/SEMAC.**
9. O pesquisador e a equipe deverão sujeitar-se as normas internas da UC apresentadas pelo GUC/IMASUL/SEMAC, como portar esta autorização durante a permanência da equipe na área.
10. Quaisquer inclusões e/ou exclusões de membros da equipe deverão ser comunicadas com antecedência, por escrito a GUC/IMASUL/SEMAC.
11. Todos os custos operacionais ficam a cargo do responsável pelo projeto, exceto eventuais apoios da GUC/IMASUL/SEMAC, claramente estabelecidos nesta Autorização.
12. Os produtos desta pesquisa que nos forem enviados ficarão anexados no processo e a disposição na GUC/IMASUL/SEMAC, para consulta quando necessário.
13. As publicações ou manifestações públicas do projeto deverão fazer referência a Unidade de Conservação pesquisada e apoio recebido.
14. Fica sob responsabilidade do IBAMA emitir a licença para captura, coleta e transporte de fauna e flora, sendo que, uma cópia da mesma deve ser encaminhada para GUC/IMASUL/SEMAC, antes do início das atividades.



15. Esta Autorização não permite o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contido no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, no território sul-mato-grossense, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial (Medida provisória nº 2.186-14 de 28 de junho de 2001; Decreto 4946/03 de 31 de dezembro.).
16. O não cumprimento das disposições constantes nesta Autorização Ambiental de Pesquisa e na Portaria IMAP nº13 de 16 de agosto de 2002, ou a violação de quaisquer condicionantes estabelecidos ou ainda, a violação ou inadequação de normas legais, importará na suspensão e/ou cancelamento da Autorização expedida, sem prejuízo da aplicação de multa e providências judiciais cabíveis.

Campo Grande, 06 de janeiro de 2010.

  
**Carlos Alberto Negreiros Said Menezes**  
**Diretor-Presidente do IMASUL**

