

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**PAULO MIRA BATISTA**

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

**CAMPO GRANDE  
2015**

**PAULO MIRA BATISTA**

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

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandeta” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Professor Doutor Renato Andreotti e Silva.

**CAMPO GRANDE  
2015**

## RESUMO

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes vetores e seus principais hospedeiros são os primatas não humanos e o homem. Estes vírus representam um problema de saúde pública devido ao seu potencial em causar epidemias de menor ou maior impacto. O objetivo do presente estudo foi detectar infecções por arbovírus em primatas não humanos de vida livre capturados no estado do Mato Grosso do Sul. Trata-se de um estudo descritivo do tipo inquérito, seccional, com coleta de dados primários, com objetivo de investigar a presença de arbovírus, que têm potencial de causar surtos, epidemias e impactos negativos para saúde pública, em municípios do estado do Mato Grosso do Sul. No presente estudo, foram realizados inquéritos soroepidemiológicos em primatas não humanos de vida livre capturados em regiões de matas dos municípios de Aquidauana (1), Bodoquena (3), Campo Grande (8), Coxim (8), Jardim (14), Miranda (2), além dos municípios de Corumbá (1), que faz fronteira com a Bolívia, e Mundo Novo (22), que faz fronteira com o Paraguai e divisa com o estado do Paraná. Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram submetidas à técnica sorológica de Inibição de Hemaglutinação para detecção de anticorpos para arbovírus e as amostras dos municípios de Mundo Novo e Bodoquena foram submetidas à técnica de biologia molecular para detecção de genoma viral de *Flavivírus*. Anticorpos para o vírus Mayaro foram detectados em amostras de primatas do município de Coxim (2) e do município de Jardim (2). Anticorpos para o vírus Cacipacoré foram identificados em primatas do município de Aquidauana (1) e para o vírus Oropouche foram identificados no primata capturado no município de Miranda (1). Vírus pertencentes ao gênero *Flavivírus* foram detectados em primatas capturados no município de Coxim (4), de Campo Grande (1), de Jardim (1) e de Mundo Novo (22). Vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* foram detectados em primatas capturados no município de Jardim (1). Todas as amostras testadas dos municípios de Bodoquena e Mundo Novo (25) foram negativas para detecção do genoma de *Flavivirus*. Os resultados do estudo demonstraram que os animais foram infectados por arbovírus do gênero *Flavivirus* e do gênero *Alphavirus*, além dos vírus Mayaro, Oropouche e Cacipacoré em algum momento de suas vidas, sugerindo a circulação de arbovírus nas regiões estudadas. Os resultados negativos da técnica de biologia molecular indicaram que os animais não estavam infectados no momento da coleta. A presença de animais infectados nas regiões estudadas evidencia a necessidade de ações de vigilância contínuas das arboviroses, que permitam identificar as áreas de risco de transmissão a que as populações humanas estão expostas, prevenindo infecções e evitando impactos negativos para a saúde pública.

**Palavras-chaves:** Saúde Pública. Primatas não humanos. Infecções por arbovírus. Biologia Molecular.

## ABSTRACT

The arbovirus are viruses transmitted by arthropods vectors and its main hosts are non-human primates and man. These viruses represent a public health problem because of its potential to cause epidemics. This is a descriptive study of type survey, sectional, with primary data collection, in order to investigate the presence of arboviruses that could potentially cause outbreaks and epidemics and negatively affect public health, in free-living non-human primates (NHP) from municipalities of Mato Grosso do Sul. In the present study, was conducted seroepidemiological surveys in non-human primates captured in forests regions of the municipalities of Aquidauana (1), Bodoquena (3), Campo Grande (8), Coxim (8), Jardim (14), Miranda (2) and of the municipalities of Corumbá (1), on the border between Brazil and Bolívia, and Mundo Novo (22), on the border between Brazil and Paraguay and border with the state of Paraná. All samples used in this study were analyzed by hemagglutination inhibition test for detection of arbovirus antibodies and the samples from Mundo Novo and Bodoquena municipalities were analyzed by molecular biology technique for detection of *Flavivirus* genome. Mayaro virus antibodies were detected in samples of primates from municipality of Coxim (2) and the municipality of Jardim (2). Cacipacoré virus antibodies have been identified in primates from municipality of Aquidauana (1) and Oropouche virus antibodies have been identified in primates captured in the municipality of Miranda (1). Arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* was detected in primates captured in the municipality of Coxim (4), Campo Grande (1) Jardim (1) and Mundo Novo (22). Arbovirus belonging to the genus *Alphavirus* was detected in primates captured in the municipality of Jardim (1). All samples tested from Bodoquena and Mundo Novo municipalities (25) were negative for detection of *Flavivirus* genome. Results of this study have shown that animals were infected by the arbovirus belonging to the *Flavivirus* genus and to the *Alphavirus* genus, in addition to the virus Mayaro, Oropouche and Cacipacoré at some point in their lives, suggesting the arboviroses circulation in the regions studied. The negative results by the molecular biology technique indicated that animals were not infected at the time of collection. The presence of infected animals in the regions studied shows the requirement of a continuous surveillance of the activities of arboviruses, identifying the transmission risk areas that human populations are exposed, preventing infections and avoiding negative impacts to public health.

Key words: Public health. Non-human primates. Arbovirus infection. Molecular biology.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por orientar-me 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.

Ao meu orientador, Renato Andreotti, pelas orientações que serviram para o meu crescimento profissional e desenvolvimento desse trabalho.

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 durante a pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, 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 Aquidauana, Bodoquena, Bonito, Corumbá, Jardim e Mundo Novo, 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.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar  
C - Capsídeos  
Ckl - Cloreto de potássio  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dNTP - Desoxirribonucleotídeos  
E – Envelope  
pM – Pré-membrana  
ECP - Efeito citopático  
ELISA - Enzyme linked immunosornet assay  
EPT - Equipamento de proteção individual  
ESL - Encefalite de Saint Louis  
EUA - Estados Unidos da América  
FA - Febre amarela  
FAS - Febre amarela silvestre  
FAU - Febre amarela urbana  
FC - Fixação de complemento  
FNO - Febre do Nilo Ocidental  
HCl - Cloreto de hidrogênio  
IFI - Imunofluorescência indireta  
IgM - Immunoglobulina M  
IgG - Immunoglobulina G  
IH - Inibição da hemaglutinação  
MAY - Mayaro  
MgCl - Cloreto de Magnésio  
NT - Neutralização  
PCR - Reação em cadeia de polimerase  
PNH - Primatas não humanos  
RNA - Ácido ribonucleico  
RT-PCR - Técnica de transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase  
VCHIK - Vírus Chikungunya  
VCPC - Vírus Cacipacoré  
VDEN - Vírus da dengue  
VEEL- Vírus da encefalite equina do Leste  
VEEO - Vírus da encefalite equina do Oeste  
VEJ - Vírus da encefalite japonesa  
VEMV - Vírus da encefalite de Murray Valley  
VESL - Vírus da encefalite de Saint Louis  
VFA - Vírus da febre amarela  
VILH - Vírus Ilheus  
VMAY - Vírus Mayaro  
VNO - Vírus do Nilo Ocidental  
VORO - Vírus Oropouche  
VROC - Vírus Rocio

## SUMÁRIO

|             |                                                                        |            |
|-------------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1</b>    | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                      | <b>7</b>   |
| <b>2</b>    | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                           | <b>9</b>   |
| <b>2.1</b>  | <b>Arbovírus</b>                                                       | <b>9</b>   |
| 2.1.1       | <u>Aspectos gerais</u>                                                 | 9          |
| 2.1.2       | <u>Aspectos laboratoriais</u>                                          | 12         |
| 2.1.3       | <u>Famílias e respectivas síndromes</u>                                | 20         |
| 2.1.3.1     | Flaviviridae                                                           | 20         |
| 2.1.3.1.1   | Vírus da febre amarela                                                 | 21         |
| 2.1.3.1.2   | Vírus da encefalite de Saint Louis                                     | 26         |
| 2.1.3.1.2   | Vírus do Nilo Ocidental                                                | 28         |
| 2.1.3.2     | Togaviridae                                                            | 30         |
| 2.1.3.2.1   | Vírus Mayaro                                                           | 30         |
| 2.1.3.2.2   | Vírus Chikungunya                                                      | 31         |
| 2.1.3.3     | Bunyaviridae                                                           | 33         |
| 2.1.3.3.1   | Vírus Oropouche                                                        | 33         |
| <b>2.2</b>  | <b>Utilização de “animais-sentinela” na vigilância das arboviroses</b> | <b>34</b>  |
| 2.2.1       | <u>Vigilância de epizootias em primatas não humanos</u>                | 35         |
| 2.2.2       | <u>Inquéritos sorológicos em “animais sentinelas”</u>                  | 37         |
| <b>3</b>    | <b>OBJETIVO</b>                                                        | <b>41</b>  |
| <b>3.1</b>  | <b>Objetivo geral</b>                                                  | <b>41</b>  |
| <b>3.2</b>  | <b>Objetivos específicos</b>                                           | <b>41</b>  |
| <b>4</b>    | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                             | <b>42</b>  |
| <b>4.1</b>  | <b>Tipo de pesquisa</b>                                                | <b>42</b>  |
| <b>4.2.</b> | <b>Local e período da pesquisa</b>                                     | <b>42</b>  |
| <b>4.3</b>  | <b>Fontes de dados</b>                                                 | <b>44</b>  |
| <b>4.4.</b> | <b>Procedimentos para coleta de dados</b>                              | <b>45</b>  |
| 4.4.1       | <u>Equipamentos de proteção individual (EPI)</u>                       | 46         |
| 4.4.2       | <u>Animais</u>                                                         | 46         |
| 4.4.3       | <u>Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos</u>   | 46         |
| 4.4.4       | <u>Colheita de Material Biológico</u>                                  | 48         |
| 4.4.5       | <u>Aplicação do microchip (“transponder”) de identificação</u>         | 49         |
| 4.4.6       | <u>Término dos procedimentos, acompanhamento e soltura dos animais</u> | 49         |
| 4.4.7       | <u>Diagnóstico laboratorial</u>                                        | 49         |
| <b>4.5</b>  | <b>Estratégias para análise dos dados</b>                              | <b>51</b>  |
| <b>4.6</b>  | <b>Aspectos éticos</b>                                                 | <b>51</b>  |
| <b>5</b>    | <b>RESULTADOS</b>                                                      | <b>52</b>  |
| <b>5.1</b>  | <b>Artigo 1</b>                                                        | <b>53</b>  |
| <b>5.2</b>  | <b>Artigo 2</b>                                                        | <b>60</b>  |
| <b>5.3</b>  | <b>Artigo 3</b>                                                        | <b>66</b>  |
| <b>6</b>    | <b>DISCUSSÃO</b>                                                       | <b>85</b>  |
| <b>7</b>    | <b>CONCLUSÃO</b>                                                       | <b>88</b>  |
|             | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                     | <b>90</b>  |
|             | <b>ANEXO A</b>                                                         | <b>108</b> |
|             | <b>ANEXO B</b>                                                         | <b>109</b> |
|             | <b>ANEXO C</b>                                                         | <b>112</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções por arbovírus, na sua grande maioria, ocorrem em ambientes silvestres no qual insetos hematófagos atuam como vetores e vertebrados silvestres como hospedeiros reservatórios, possuindo caráter zoonótico. Periodicamente esses vírus surgem em áreas urbanas ou periurbanas sob forma de epidemias e surtos, infectando comunidades susceptíveis e causando entre os vertebrados doença febril, encefalites, meningites, hemorragias, doença hepática e altas taxas de morbidade e mortalidade.

Os primatas não humanos (PNH) são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outras espécies de animais silvestres, por serem considerados espécies arbóreas e geralmente diurna. Além disso, são importantes hospedeiros reservatórios que participam direta ou indiretamente do ciclo epidemiológico de diversos arbovírus. A interação entre os PNH 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 de doenças.

Os PNH são considerados animais sentinelas para investigação de diversas viroses que podem afetar os homens, através de estudos soro epidemiológicos, o que torna este um método de escolha para obtenção de informações sobre a circulação desses vírus em ambientes naturais.

No estado do Mato Grosso do Sul há evidências da participação de PNH nos ciclos epidemiológicos de arbovírus zoonóticos responsáveis por surtos de doenças febris hemorrágicas, meningites e doenças exantemáticas (BATISTA *et al.*, 2012; BATISTA, *et al.* 2013). Além disso, considerando a evidência da presença do vírus do Nilo Ocidental em cavalos do Pantanal (CORRÊA, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013), notificações de casos de doença febril aguda inespecífica, casos de meningites, casos de paralisia flácida aguda, casos de febre amarela e dengue, por ano no Brasil, sem diagnóstico laboratorial conclusivo, é necessário intensificar e aprimorar as pesquisas e ações de vigilância das arboviroses com a finalidade de detectar precocemente a circulação viral, se possível, antes mesmo de incidir em seres humanos e caracterizar a importância destes animais nos ciclos de transmissão das doenças.

Por fazer fronteira com países como Paraguai e Bolívia, onde foi evidenciada a presença de alguns arbovírus, várias regiões do estado do Mato Grosso do Sul



estão suscetíveis para a reemergência destes vírus. Como alguns arbovírus têm nos mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus*, *Culex* e *Sabethes* seus principais vetores, há um potencial de urbanização das arboviroses zoonóticas nos municípios do Estado.

Estudos eco-epidemiológicos dessa natureza podem sugerir ainda o envolvimento de outras espécies de animais selvagens no ciclo de manutenção dos arbovírus, havendo necessidade de maiores investigações para elucidar essa relação.

Os dados coletados nesse tipo de estudo permitem avaliar a magnitude do problema e obter informações dos riscos de infecção que as populações humanas estão expostas. O tipo de estudo oferece subsídios técnicos para políticas públicas de saúde, permitindo assim a prevenção de episódios dessas importantes zoonoses nas populações, evitando impactos negativos para a saúde pública.

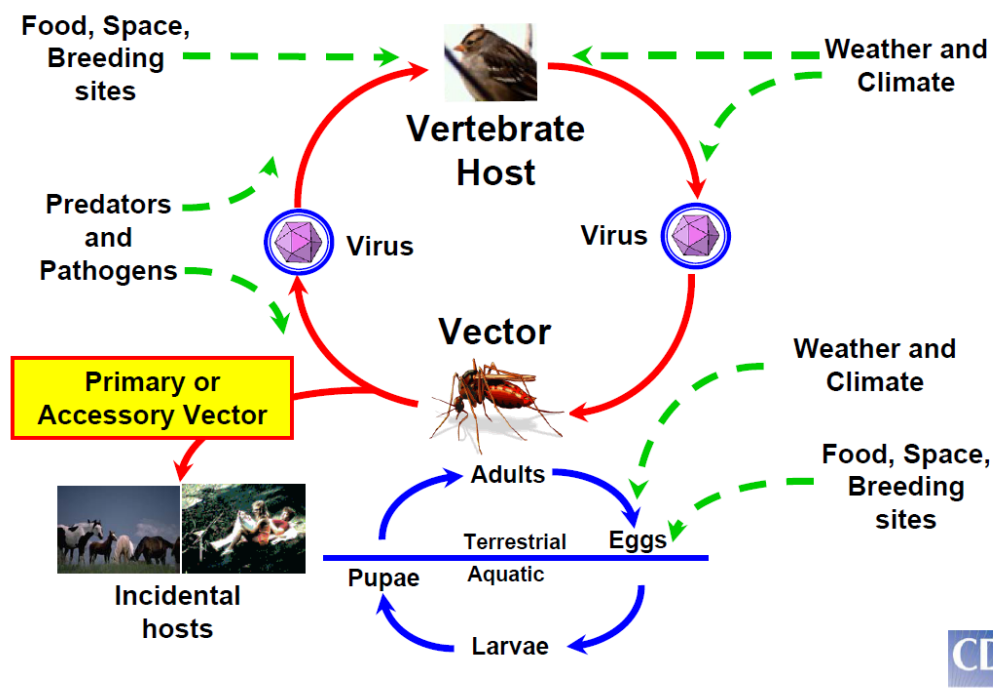
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1 Arbovirus

#### 2. 1. 1 Aspectos gerais

Arbovírus, termo derivado de sílabas iniciais das palavras *arthropod-borne virus* (LOVOSEI, 2005), são um grupo de vírus transmitidos e mantidos na natureza entre hospedeiros vertebrados susceptíveis através de picadas hematofágicas de artrópodes vetores. Assim, infecções causadas por arbovírus possuem caráter zoonótico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985). Os arbovírus podem ser transmitidos entre os hospedeiros artrópodes através da via transovariana e possivelmente pela via venérea. Os vetores infectam-se ao sugarem 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 de sua saliva (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).

A maioria dos arbovírus é mantida em natureza através de ciclos de transmissão silvestres, no qual os artrópodes participam como vetores e

hospedeiros. Uma vez infectados, os artrópodes permanecem assim por toda sua existência. Portanto, são considerados vetores, reservatórios e disseminadores de arbovírus (CAUSEY, 1958). Já os hospedeiros vertebrados são considerados hospedeiros amplificadores e de dispersão (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; HERVÉ *et al.*, 1986; RÁCZ, 2005; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997). As pessoas que mantêm contato mais estreito com o ambiente silvestre, onde situam-se os nichos ecológicos dos arbovírus, são infectadas com maior frequência (VASCONCELOS *et al.*, 2005). No ciclo de transmissão silvestre os humanos são geralmente hospedeiros acidentais e normalmente não são importantes na manutenção dos vírus na natureza (VASCONCELOS *et al.*, 1997).

Alguns arbovírus são transmitidos pela mesma espécie de artrópodes vetores 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). Outros arbovírus têm ciclos de transmissão envolvendo mosquitos ornitófilicos e aves hospedeiras amplificadoras (JOZAN, *et al.*, 2003; MCLEAN; SCOTT, 1979; PEREIRA *et al.*, 1964).

Em ciclos de transmissão urbana, como nos casos de infecções pelos vírus da Dengue (VDEN) e febre amarela (VFA), os seres humanos produzem altas taxas de viremia e são considerados como hospedeiros de amplificação e dispersão (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

Há aproximadamente 535 espécies de arbovírus registrados no *Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World*, desses, cerca de 100 espécies infectam humanos, quarenta infectam animais domésticos e ao menos 10 podem causar epidemias (KARABATSOS, 1985). No Brasil, mais de 200 espécies diferentes de arbovírus têm sido isoladas (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Os arbovírus classificavam-se de acordo com suas propriedades antigênicas, com base no cruzamento sorológico entre dois ou mais vírus através de resultados de testes sorológicos, como a inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC) e neutralização (NT), reunidos por Casals (1963). Assim cada família é constituída de dois ou mais vírus que possuem relação antigênica.

Mais recentemente os arbovírus passaram a ser classificados de acordo com suas características físico químicas, com base em estudos filogenéticos que demonstram características comuns na morfologia, organização do genoma e estratégias de replicação entre os vírus pertencentes a mesma família

(LINDENBACH *et al.*, 2001; KUNO *et al.*, 1998). Os arbovírus estão taxonomicamente distribuídos em diversas famílias virais, tais como, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdovirae*, *Orthomyxoviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Asfaviridae* e *Flaviviridae* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985). Assim, os arbovírus podem ser divididos em oito famílias e 14 gêneros, sendo que a maioria dos arbovírus de interesse para a saúde pública pertence a cinco famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. Os arbovírus possuem genoma constituído por ácido ribonucleico (RNA), podendo ser segmentado ou não (BARRETT; TEUWEN, 2009).

A ocorrência de arbovírus é predominante em regiões tropicais onde as condições climáticas favorecem a propagação contínua dos vírus e a ocorrência de surtos de arboviroses durante os meses mais quentes e chuvosos do ano, quando a população de vetores é mais abundante. Nessas regiões as arboviroses ocorrem de forma esporádica, endêmica ou epidêmica, ao contrário de regiões de clima temperado onde as arboviroses ocorrem de forma indene, pela interrupção da cadeia de transmissão durante os meses de inverno (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1991).

A dispersão dos arbovírus pelo mundo está diretamente relacionada à distribuição geográfica dos seus vetores. Na Europa ocidental alguns arbovírus são transmitidos por carrapatos que produzem baixa ou uma alta viremia. Dessa forma os carrapatos vetores podem dispersar o vírus para áreas livres de arbovírus (GOULD *et al.*, 2003).

Vários fatores são responsáveis pela dispersão de arbovírus e assim pelo aumento das infecções, principalmente aqueles relacionados aos vetores e hospedeiros vertebrados. Fatores relacionados ao aumento de atividades turísticas e de pesca, redução ou inexistência de programas de controle de artrópodes, desmatamentos, reflorestamentos, práticas agrícolas, programas de urbanização; projetos de irrigação, incluindo a construção de barragens, alterações climáticas e outras mudanças ecológicas, promovem o aumento da população de vetores potencialmente transmissores de arbovírus, favorecendo a emergência de arboviroses. A modernização dos meios de transportes com deslocamento de artrópodes transmissores, de pessoas e de animais infectados em fase de viremia, oriundos de sítios eco epidemiológicos onde existem zoonoses arbovíricas para

localidades onde há presença de vetores potenciais, influenciam na emergência das arboviroses (FIGUEIREDO, 2007; GOULD *et al.*, 2003).

Os arbovírus patogênicos aos humanos causam doença febril aguda, mialgias, cefaleias e artralgias severas, como ocorre com o vírus Chikungunya (VCHIK), o vírus Mayaro (VMAY) e o vírus Oropouche (VORO), ou ainda podem causar febre exantemática e/ou hemorrágica, como no caso dos vírus da Dengue (VDEN), da febre amarela (VFA) e o vírus Cacipacoré (VCPC). Este último, isolado pela primeira vez no Brasil em 2011. Alguns desses vírus têm surgido periodicamente em áreas urbanas, como o VDEN, VORO e o VCHIK, sob forma de epidemias, ou em áreas periurbanas, como o VMAY e o VFA, infectando comunidades susceptíveis (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; BATISTA *et al.*, 2011; CAUSEY; MAROJA; AZEVEDO, 1958; MOURÃO *et al.*, 2009; VASCONECLOS *et al.*, 2003).

Outros arbovírus podem causar encefalites assépticas e meningites, como no caso do vírus da encefalite de Saint Louis (VESL), do Rocio (VROC), da encefalite eqüina do Leste (VEEL) e da encefalite eqüina do Oeste (VEEO) (CALISHER, 1994; IVERSSON; TIRIBA, 2002). Os vírus VEEL, VESL e o vírus do Nilo Ocidental (VNO) são os principais arbovírus envolvidos em casos de meningite asséptica no homem (CALISHER *et al.*, 1990; REISEN *et al.*, 2008). O VNO e o VEEL também são responsáveis por causar encefalomielite em cavalos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000; WEESE *et al.*, 2003).

No Brasil as arboviroses emergentes podem potencialmente causar doenças significativas e grande impacto aos serviços públicos de saúde. Mas a grande maioria é caracterizada por síndromes sistêmicas inespecíficas ou pela baixa incidência, freqüentemente permanecendo sem identificação e com um grande número de casos subnotificados. Os exames laboratoriais para diagnosticar estas infecções são de grande importância, uma vez que o diagnóstico baseado em evidências clínicas não é fácil, especialmente durante a fase inicial da doença, quando os sintomas são inespecíficos (BRÉS, 1988; CALISHER, 1994).

## 2. 1. 2 Aspectos laboratoriais

Após a infecção viral primária o sistema imunológico é ativado e induz a formação de anticorpos específicos da classe M (IgM) em menor quantidade e

detectáveis a partir do quarto dia após o início dos sintomas, atingindo o pico máximo em torno do sétimo ao oitavo dia, declinando-se lentamente para níveis não detectáveis depois de dois a três meses. As imunoglobulinas da classe G (IgG) são considerados anticorpos de memória. Estes são produzidos em grandes quantidades durante a infecção e 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, sendo a imunoglobulina predominante no soro (76%) (BARRETT; TEUWEN, 2009; SANTOS; BENATI, 2008).

A detecção de anticorpos da classe IgM em uma única amostra de soro permite o diagnóstico da infecção recente e devem ser solicitados a partir do 6º dia de sintoma. A presença de IgG pode significar um contato prévio com o vírus ou infecção recente quando há um aumento significativo no título de anticorpos de 4 vezes ou mais (conversão sorológica) entre duas amostras de soro coletadas com intervalo de 15 a 20 dias (amostras pareadas). Portanto, a detecção de anticorpos específicos é uma opção para confirmar uma infecção aguda prévia por um determinado agente infeccioso, uma vez que o agente não está presente permanecendo apenas os anticorpos como prova de que a infecção ocorreu (SANTOS; BENATI, 2008).

Os métodos de diagnóstico das viroses são baseados em quatro parâmetros: isolamento e identificação do vírus, sorologia para detecção de antígenos e/ou anticorpos, detecção direta de partículas virais e amplificação de ácidos nucleicos virais. Os métodos de isolamento e identificação viral juntamente com os métodos de sorologia para detecção de anticorpos são os mais utilizados para confirmação do diagnóstico de doenças transmitidas por arbovírus. Para êxito do diagnóstico por isolamento as amostras devem ser coletadas na fase aguda da doença no momento da replicação viral (SANTOS; BENATI, 2008) e no caso do isolamento viral, para garantir a integridade das partículas dos vírus, as amostras de sangue total devem ser enviadas imediatamente ao laboratório ou armazenadas congeladas à temperatura de -70°C ou mais baixa, e transportadas em gelo seco ao laboratório (SANTOS; BENATI, 2008; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

Os métodos virológicos de isolamento viral são ideais para determinação do arbovírus específico responsável pela infecção e são considerados o padrão de referência para comprovação dos novos métodos (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). O isolamento viral fundamenta-se na inoculação do vírus pesquisado em um

sistema hospedeiro susceptível e sua capacidade citopatogênica de se propagar modificando através da sua biossíntese viral a fisiologia desse sistema. A propagação viral é realizada em sistemas de hospedeiros vivos, tais como animais de laboratório e/ou em culturas de células, causando alterações morfológicas celulares conhecidos como efeitos citopáticos (ECP), desenvolvimento de paralisia, lesões degenerativas ou morte (SANTOS; BENATI, 2008).

O isolamento de arbovírus em animais de laboratório é realizado através da inoculação da amostra intracerebral, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular em camundongos recém-nascidos de 2 a 3 dias. Após inoculação intracerebral, os animais são observados durante 2 a 3 semanas para verificação da evidência de sinais clínicos antes de serem sacrificados. Após, retira-se o cérebro e o fígado para realização de exames histopatológicos e/ou testes para identificação do vírus isolado (CALISHER *et al.*, 1975; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

O isolamento viral em culturas celulares de vertebrados e de invertebrados é um método que apresenta boa sensibilidade (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994) e bastante utilizado em pesquisas, já que amplificam a quantidade de vírus, facilitando sua detecção e identificação (BATISTA *et al.*, 2011; SVOBODA *et al.*, 2014; TESH *et al.*, 1999; WHITE, 1987).

Os arbovírus podem ser propagados e ou replicados em culturas de células de vertebrados produzindo ECP. Essa capacidade das células de suportar a replicação viral é devido a presença de receptores virais, fatores que facilitam o desnudamento viral, fatores de transcrição, proteíno-cinases, proteases, enzimas de replicação do DNA e fatores de tradução (SANTOS; BENATI, 2008).

As culturas de células ou linhagens celulares de vertebrados são classificadas de acordo com sua morfologia, em epitelióides e fibroblastóides, e de acordo com sua capacidade de aderência, formando monocamadas contínuas sobre uma superfície ou em suspensão, que se proliferam suspensas no meio (SANTOS; BENATI, 2008). As linhagens contínuas representam a grande maioria das linhagens em estudo e entre as de maior aplicação destacam-se as culturas de células VERO originadas de rins de macacos Verdes Africanos (AGUILAR *et al.*, 2004), as culturas de células BHK-21 originadas de rins de hamster recém-nascido e a célula LLC-MK2 originadas de rins de macacos *Rhesus* (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

As culturas celulares de insetos têm sido utilizadas para isolamento de inúmeros arbovírus e para avaliar a competência vetorial na transmissão das

arboviroses. As linhagens de células podem ser obtidas a partir de qualquer estágio do ciclo de vida do mosquito, dependendo da adequação de cada abordagem experimental (WALKER *et al.*, 2014). As culturas de mosquitos mais susceptíveis à infecção e utilizadas para isolamento de arbovírus são de *Aedes albopictus* (clone C6/36), que possui boa susceptibilidade para propagação e produção de efeitos citopáticos pelos VDEN, VEEL, VROC e VESL (FIGUEIREDO, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2002; WHITE, 1987), de *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) (KUNO, 1981) e células de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA284) (KUNO, 1982).

Outras culturas celulares de mosquitos também foram desenvolvidas para replicação viral e para isolar arbovírus, como as linhagens de células derivadas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-171) que replicou o VDEN, VFA e VESL (KUNO, 1981), de *Aedes aegypti*, que replicou o VCHICK, o VNO e o VDEN (SUDEEP *et al.*, 2009), além de culturas de células derivadas de *Culex tritaeniorhynchus* e *Culex theileri*, que replicou o VNO e o vírus da encefalite japonesa (VEJ).

A evidência da propagação viral em culturas de células com observação do ECP é em torno do 5º ao 7º dias a partir da infecção da cultura e a observação da alteração da morfologia celular induzida pela infecção do vírus é observada ao microscópio óptico (TRAVASSOS AD ROSA *et al.*, 1994).

Após a replicação viral em culturas de células retira-se o material sobrenadante para novas passagens ou para a identificação viral através de testes sorológicos, tais como, teste de fixação de complemento (FC), teste de neutralização (NT), através do teste de inibição de hemaglutinação (IH) ou do teste de imunofluorescência indireta (IFI) (AGUILAR *et al.*, 2004; CALISHER *et al.*, 1975; SANTOS; BENATI, 2008; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994; WHITE *et al.* 1987).

A identificação dos vírus ou do sorotipo do vírus infectante depende da sensibilidade do sistema hospedeiro e de testes sorológicos utilizando anticorpos monoclonais (SAMUEL; TYAGI, 2006). Além de servirem para identificação do vírus isolado em cultura, os testes sorológicos são empregados para detectar infecções virais através da detecção de anticorpos e estudar epidemiologicamente o comportamento de uma virose em uma determinada comunidade (SANTOS; BENATI, 2008).

O teste de fixação de complemento (FC) detecta anticorpos totais e baseia-se na ligação de um complemento, agente lítico, a um complexo de reação antígeno-anticorpo. Se o anticorpo é específico para o antígeno, o complexo antígeno-



anticorpo é formado e o complemento adicionado é fixado a este complexo. Um sistema revelador, hemácia ligada à lisina, é adicionado. Como o complemento está fixado ao complexo antígeno-anticorpo, este não atuará no complexo hemácia-anticorpo e as hemácias não serão lisadas pela não ativação da cascata de complemento, sedimentando e formando um botão no fundo da placa. A presença de hemólise após a reação indica que o anticorpo e antígenos não eram específicos um para o outro (SANTOS; BENATI, 2008; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

Quando o teste FC é utilizado para identificação do vírus, o antígeno está no sobrenadante de células infectadas e os anticorpos específicos para o vírus conhecidos estão presentes em soros padrão. Caso o teste de FC seja utilizado para detecção de anticorpos, o antígeno é uma suspensão de um vírus conhecido e os anticorpos estão presentes nas amostras de soros testadas (SANTOS; BENATI, 2008).

O teste de NT pode ser utilizado para identificação do vírus ou para avaliação dos níveis de anticorpos. Este possui um alto grau de especificidade imunológica e é fundamentado na perda da capacidade do vírus em infectar células permissivas, através da reação do vírus com o anticorpo específico. O vírus pesquisado é misturado ao anticorpo específico formando uma interação vírus-anticorpo que posteriormente é inoculada em cultura de células. Após um período de incubação a cultura é examinada para observação do ECP. Se houver a neutralização do vírus pelos anticorpos não haverá infecção das culturas de células, não sendo possível observar o ECP (SANTOS; BENATI, 2008). O resultado de neutralização é expresso como aquela diluição do soro que reduz o número de placas por uma porcentagem específica de 90% (CALISHER *et al.*, 1975; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). Os anticorpos neutralizantes aparecem na primeira semana da infecção e permanecem por muitos anos conferindo imunidade permanente.

O teste sorológico de IH também é utilizado para identificação do vírus infectante e para detecção de anticorpo (FERREIRA, *et al.* 1994; SANTOS; BENATI, 2008). A técnica é sensível e específica quando comparada a métodos que utilizam volume de amostras maiores, além de economizar tempo e reagentes consideráveis, sendo ideal para inquéritos sorológicos com pesquisa de anticorpos em animais capturados de florestas, uma vez que os anticorpos inibidores de hemaglutinação

persistem por um longo período de tempo (SHOPE, 1963; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

A técnica somente é aplicada a vírus com capacidade hemaglutinante e consiste na adição de hemácias ao complexo vírus-anticorpo com bloqueio da capacidade de hemaglutinação do vírus quando este reage com o anticorpo específico, isto é, se houver presença de anticorpos específicos nos soros-teste os mesmos vão se ligar à hemaglutinina viral e impedir que o vírus cause hemaglutinação. A IH é interpretada como positiva quando há uma reação negativa, as hemáceas não se aglutinam e se sedimentam no fundo do poço formando um botão. Quando o anticorpo não é específico para o vírus, não há formação do complexo vírus-anticorpo e o vírus mantém a sua capacidade de induzir hemaglutinação, formando uma camada e não um botão no fundo do poço (CLARKE; CASALS, 1958; SHOPE, 1963; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

Para identificação viral a amostra ou soro do paciente é misturado com soros padrões que contêm anticorpos específicos. Se os anticorpos inibirem a hemaglutinação, o vírus é identificado. Para detectar anticorpos, o vírus hemaglutinante conhecido é misturado ao soro do paciente ou do animal. Se o soro inibir a hemaglutinação pelo vírus, o anticorpo presente no soro é identificado. Assim como o teste NT, o teste de IH detecta anticorpos totais, contudo as classes de imunoglobulinas não são diferenciadas por esses métodos e o diagnóstico de uma infecção recente, por pesquisa de anticorpos, somente pode ser realizado pela conversão sorológica (SANTOS; BENATI, 2008; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). 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 (CALISHER *et al.*, 1975; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994; WHITE, 1987).

Através desse método é comum ocorrer reações cruzadas com outros vírus do mesmo gênero, limitando sua utilização para definir o agente etiológico e dificultando a interpretação dos resultados principalmente nas respostas secundárias (CALISHER *et al.*, 1975). Em locais com circulação de mais de um *Flavivírus*, por exemplo, 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, como consequência da memória

imunológica prévia, anticorpos contra o primeiro vírus infectante são produzidos rapidamente e em alta escala, levando a entender que o animal ou paciente foi infectado pelo vírus com o qual ele apresenta títulos mais elevados (SILVA, 2010).

Portanto, o diagnóstico conclusivo de uma infecção causada por arbovírus é confirmado através de isolamento viral ou pela detecção de uma conversão sorológica, bem como, por detecção de antígenos virais específicos e, ainda pela detecção de IgM específica pelo método imunoenzimático (MAC-ELISA) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

O teste de imunofluorescência indireta (IFI), além de ser utilizado para identificação do vírus isolado, utilizando anticorpos monoclonais (SAMUEL; TYAGI, 2006), é utilizado para detecção de antígenos virais presentes nas amostras, utilizando também anticorpos monoclonais (SANTOS; BENATI, 2008; HENCHAL *et al.*, 2003; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). A técnica consiste em fixar células infectadas com antígenos virais em lâminas com múltiplas áreas. Para isso utilizam-se anticorpos específicos que se fixarão aos antígenos virais e em seguida adicionam-se anticorpos anti imunoglobulina marcados com fluoresceína (conjugados) para revelar a formação de imunocômplexo vírus-anticorpo. Se o conjugado se ligar ao complexo antígeno-anticorpo a fluorescência será observada em microscópio de fluorescência (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

A reação imunoenzimática ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) é um método sorológico de diagnóstico para detectar antígeno ou anticorpo. É a técnica mais utilizada e recomendada atualmente disponível para vigilância virológica. Para detecção de anticorpos, o teste envolve a formação de um imunocômplexo (antígeno-anticorpo), onde um antígeno viral é fixado a uma placa e o soro contendo anticorpos é adicionado. Em seguida, um conjugado formado por anticorpo e enzima e um substrato são adicionados. A ação da enzima sobre o substrato produz uma mudança de cor (revelação). O resultado do teste é determinado pela observação ou medida espectrofotométrica da coloração produzida pela reação (SANTOS; BENATI, 2008).

O ELISA tem mostrado que é uma técnica sensível para monitorar arbovírus em populações selvagens de mosquitos e pode ser utilizada em animais menos susceptíveis a eles, como o *Cebus apella*, como instrumento de busca ativa na vigilância desses arbovírus, permitindo a implementação de ações preventivas antes mesmo da ocorrência de epizootias ou epidemias (LIMA *et al.*, 2010).

O MAC-ELISA que captura anticorpos específicos IgM é um método utilizado para o diagnóstico de infecções recentes e ativas com uma amostra clínica colhida na fase aguda da doença (TRAVASSOS DA ROSA, *et al.*, 1994). O uso de proteínas de domínios III recombinantes tem sido proposto como fonte de antígenos mais específicos, que permitem padronizar ELISAs *in-house* com especificidade e sensibilidade comparáveis às de *kits* disponíveis no mercado (SHUKLA *et al.*, 2009).

A técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é uma técnica de biologia molecular altamente sensível, específica e rápida que permite a detecção de sequências do ácido nucleico viral a partir de amostras de sangue colhidas na fase aguda da doença. A técnica consiste em amplificação do genoma viral presente na amostra e visualização do produto amplificado em eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. A técnica também é utilizada para genotipagem viral quando o DNA é amplificado e sequenciado, permitindo a completa identificação da espécie e da cepa do vírus infectante (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994).

A técnica envolve três passos, tais como, a extração do ácido nucleico, no caso da maioria dos arbovírus, o RNA viral, a transcrição reversa, na qual o RNA é convertido em cDNA e a amplificação do cDNA. Uma etapa adicional é a identificação e caracterização dos fragmentos amplificados durante a PCR, que é feita por meio de eletroforese em gel de agarose 2% ou poliacrilamida 10%, com formação de bandas de DNA de tamanho característicos para cada tipo de vírus, pois cada iniciador (*primer*) tipo específico anela em diferentes posições originando fragmentos de DNA, pares de base. Esta etapa pode ainda ser seguida pelo sequenciamento genético (BROZONI *et al.* 2005).

Os *primers* utilizados no ensaio de RT-PCR para amplificar o genoma viral podem ser espécie-específico ou gênero-específico, isto é, podem ser utilizados *primers* que permitem a amplificação de fragmentos específicos para determinados vírus ou *primers* consenso que são projetados para amplificar vírus geneticamente relacionados. A maior parte destes protocolos utiliza *primers* consenso para alinhar a região terminal do gene NS5 do genoma de *Flavivirus* e a região da proteína não-estrutural 1 do genoma de *Alphavirus*, devido à existência de sequências altamente conservadas nestas regiões (BROZONI *et al.*, 2005; BRONZONI *et al.*, 2004; FULOP *et al.*, 1993; KUNO, G., 1998; SCARAMOZZINO *et al.*, 2001; STURGESS *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Devido à inexistência de sintomas clínicos

específicos para infecção de um determinado vírus e de diferentes espécies de arbovírus circulando na mesma região, a utilização de um método diagnóstico de gêneros por PCR deveria ser frequentemente mais utilizado (SCARAMAZZINO *et al.*, 2001).

### 2. 1. 3. Famílias, espécies virais e respectivas síndromes

#### 2. 1. 3. 1 Flaviviridae

A família Flaviviridae é constituída pelos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, porém, somente os *Flavivirus* contém representantes do grupo dos arbovírus. O termo *Flavivirus* tem origem no termo *Flavus*, que em latim, significa amarelo, em referência à icterícia proveniente da disfunção hepática causada pelo vírus febre amarela identificado pela primeira vez em humano (LINDENBACH; RICE, 2001)

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são os mais relevantes para a saúde pública. Este gênero é constituído por cerca de 70 vírus que exibem reatividade cruzada e que causam uma variedade de doenças caracterizadas por febres, encefalites e febres hemorrágicas. A maioria dos *Flavivirus* de importância médica está distribuído em um dos três complexos: complexo da encefalite japonesa, que inclui o vírus da encefalite japonesa (VEJ), o vírus da encefalite Saint Louis (VESL) e o vírus do Nilo Ocidental (VNO); complexo das encefalites transmitidas por carrapatos; incluindo o vírus da encefalite de Russian spring-summer, o vírus da doença da floresta Kyasanur e o vírus da febre hemorrágica de Omsk; complexo da Dengue, que inclui os vírus da Dengue I a IV. O vírus da febre amarela (VFA) é antigenicamente distinto e junto com os demais vírus citados são os arbovírus mais comuns que afetam os seres humanos em todo o mundo (CALISHER, 1994; FAUQUET *et al.*, 2005; LINDENBACH; RICE, 2001).

Os *Flavivirus* possuem envoltório lipoproteico, morfologia esférica e têm entre 40 e 60 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e tem cerca de onze kilobases de tamanho. O genoma viral codifica as 3 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 de produzir anticorpos inibidores de hemaglutinina.

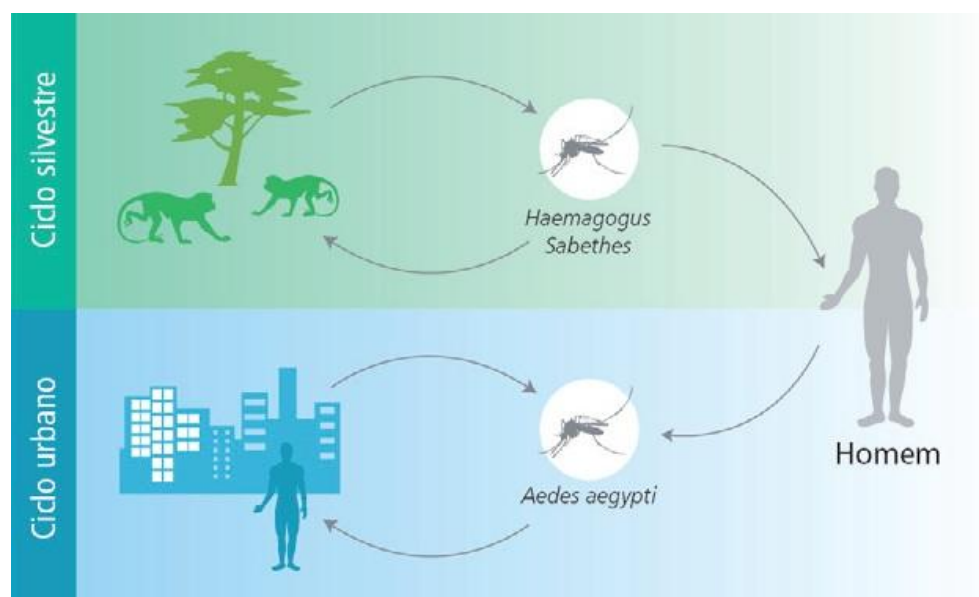
O genoma viral dos *Flavivirus* também codifica 7 proteínas não estruturais localizadas na região 3' do genoma: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (BARRETT; TEUWEN, 2009; LINDENBACH *et al.*, 2001). A proteína E possui 3 domínios, sendo que o domínio III gera uma resposta celular de padrão Th1, com posterior indução de anticorpos fortemente neutralizantes e que apresentam reações cruzadas com outros *Flavivirus* (ALKA *et al.*, 2007).

#### 2. 1. 3. 1. 1 Vírus da febre amarela

O VFA causa doença caracterizada por febre e/ou manifestações hemorrágica, mantendo-se endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e da África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública. O vírus é transmitido ao homem mediante a picada de insetos hematófagos do gênero *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes*. 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).

A febre amarela possui ciclos epidemiologicamente distintos, a febre amarela silvestre (FAS) e a febre amarela urbana (FAU) (Figura 2) (BRASIL, 2006).

Figura 2 – Ciclo urbano e silvestre da febre amarela



Fonte: Brasil (2009, p. 48).

No ciclo urbano, o vírus é transmitido ao homem pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* após um período de incubação extrínseca que varia entre 7 a 14 dias, sendo que o próprio homem infectado e em fase virêmica, que dura entre 2 a 5 dias, atua como amplificador e disseminador do vírus (MASSAD *et al.*, 2001; VASCONCELOS, 2003). Além do *Aedes aegypti*, o *Aedes albopictus*, considerado uma espécie silvestre, demonstra capacidade de transmitir o VFA além de outros *Flavivirus*. Portanto, a ocorrência da FAU está relacionada com a distribuição e dispersão do *Aedes aegypti* no perímetro urbano e ao aumento da densidade populacional do *Aedes albopictus* no perímetro periurbano (GOMES *et al.*, 1999; JOHNSON *et al.*, 2002; LOVOSEI, 2003), já que este último serve como ligação entre a FAS e a FAU (GOMES *et al.*, 1999). Mesmo que a doença seja imunoprevenível, ainda há ocorrência de casos humanos de FA em perímetro urbano na América Latina, como ocorreu no Paraguai em 2008 (TAUIL, 2010).

A forma silvestre da doença é endêmica e/ou enzoótica nas florestas tropicais da África e das Américas, apresentando-se sob a forma de surtos com intervalos de 5 a 7 anos alternados por períodos com menor número de casos. Nas regiões de florestas a doença é sazonal ocorrendo com maior frequência entre os meses de janeiro a abril, quando os índices pluviométricos e as altas temperaturas favorecem o aumento da densidade vetorial (BRASIL, 2005).

Na FAS o vírus é transmitido pelos mosquitos do gênero *Haemagogus* (*Haemagogus janthinomys*, *Hemagogus albomaculatus* e o *Haemagogus leucocelaenus*) e os do gênero *Sabethes*, que no Brasil são os vetores com maior capacidade de transmitir o vírus. Esses mosquitos possuem hábitos diurnos e vivem nas copas das árvores descendo às vezes ao solo para alimentar-se na presença do homem ou quando a quantidade de hospedeiros arbóreos é pequena (HERVÉ *et al.*, 1986).

No ciclo silvestre a FA é uma zoonose, no qual os primatas não humanos (PNH) são os principais hospedeiros amplificadores e disseminadores do vírus, pelo seu deslocamento a distâncias consideráveis (HERVÉ *et al.*, 1986). O homem é um hospedeiro acidental, que se infecta quando entra em contato com ambientes enzoóticos onde o vírus circula entre primatas e mosquitos. Nestes animais, a doença manifesta-se periodicamente num intervalo suficiente para o surgimento de novas populações suscetíveis após cada grande epizootia, e na população humana o aparecimento de casos é precedido por essas epizootias (BRASIL, 2005; BRASIL, 1999). Quando não há população símia disponível, o vírus movimenta-se para encontrar novos hospedeiros viáveis visando a manutenção natural, incluindo marsupiais, preguiças, morcegos, entre outros (SOPER, 1937).

O VFA persiste nos mosquitos por um longo período, superior àqueles em macacos. Uma vez infectada a fêmea permanece assim por toda vida podendo haver transmissão transovariana. Por este motivo o mosquito é considerado um hospedeiro reservatório do vírus amarílico. Assim, esses mosquitos têm importante papel disseminador do vírus superior ao desempenhado pelos macacos (HERVÉ *et al.*, 1986).

Nas Américas, alguns macacos mostram grande susceptibilidade ao vírus amarílico, como os do gênero *Alouatta* (guariba ou bugios), outros apresentam grande resistência, como os macacos do gênero *Cebus* (Prego). Frequentemente os *Alouattas* infectados com o VFA desenvolvem infecção fulminante e morrem entre o terceiro e sétimo dia da infecção, com comportamento similar aos casos humanos fatais. Quando não morrem durante esse período desenvolvem imunidade permanente. Já os do gênero *Cebus* mostram-se mais refratários ao VFA (BRASIL, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 1997).

Anualmente ocorrem aproximadamente 200.000 casos de FA no mundo, sendo 90% deles na África. Os maiores surtos de FA na América do Sul desde 1950



ocorreram no Peru, Bolívia, Brasil, Colômbia e Equador entre 1985 a 1995. (VASCONCELOS, 2003). De janeiro a junho de 2000 foram relatados 77 casos de febre amarela em 8 estados brasileiros, tais como, em Goiás com (50), ou seja 64,9% dos casos, Amazonas (1), Bahia (10), Distrito Federal (1), Mato Grosso (4), Minas Gerais (2), Pará (1), São Paulo (2); e Tocantins (6). A taxa de letalidade foi de 50,6% (39/77). O *Haemagogus janthinomys* foi a principal espécie de mosquito implicado na transmissão do vírus naquela ocasião e epizootias ocorreram em 49 municípios, principalmente em Goiás. Além do aumento da temperatura e das chuvas nesse período, a baixa cobertura vacinal nas áreas de foco e migração de indivíduos susceptíveis às regiões florestais onde a doença é transmitida, contribuiu para o recrudescimento da doença no Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2001a).

No período de 1981 até maio de 2009, foram registrados 41 casos de FA em humanos em município do estado do Mato Grosso do Sul, como, em Anastácio, Pedro Gomes, Campo Grande, Aquidauana, Bela Vista, Sidrolândia, Caracol, Antônio João, Jardim, Coxim, Corguinho, São Gabriel do Oeste, Jaraguari, Terenos, Ribas do Rio Pardo, Camapuã, Ponta Porá, Bonito, Maracaju, Aral Moreira e Água Clara (GUERRA, 2009; SÃO PAULO, 2008).

No Rio Grande do Sul, no período de dezembro de 2008 a abril de 2009, foram confirmados 21 casos de FA e destes 9 evoluíram para o óbito (letalidade de 43%) (RIO GRANDE DO SUL, 2011). De fevereiro a maio de 2009, no Estado de São Paulo, registrou-se 92 notificações de casos suspeitos de FA. Destes, 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, 2009a).

Alguns fatores estão associados à reemergência da FA e à dinâmica da transmissão do vírus no Brasil durante este período, tais como, grande susceptibilidade da população humana, alta prevalência de vetores e hospedeiros primários (PNH), condições climáticas favoráveis com aumento da pluviosidade, emergência de uma nova linhagem genética e a circulação de humanos e primatas infectados pelo vírus (VASCONCELOS, 2010).

Análises genéticas de 79 amostras virais isoladas no Brasil entre 1935 e 2001 provenientes de 12 estados, demonstraram que há duas cepas do VFA dispersas no Brasil, genótipo America do Sul I e genótipo America do Sul II, sendo

que a linhagem genética mais antiga tipo I foi substituída por uma nova linhagem dominante tipo II (VASCONCELOS *et al.*, 2004). Uma nova linhagem genética do VFA foi descoberta por Souza *et al.* (2009), demonstrando que uma nova sublinhagem do VFA denominado de IE, surgiu a partir do genótipo America do Sul I isolados em 2004 e 2008 (SOUZA *et al.*, 2010).

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 (2009b, p. 9)

A subcepa vacinal 17DD que tem origem do vírus selvagem Asibi, é usada na produção de vacinas no Brasil. A vacina produz uma rápida viremia de 3 a 7 dias após vacinação e a imunidade mediada ocorre em até 10 dias em 95% das pessoas vacinadas. Ela produz tanto uma resposta humoral rápida e específica com produção de anticorpos, quanto uma resposta imune celular, promovendo uma

proteção de pelo menos 10 anos em 98% dos vacinados. Os efeitos adversos associados à vacina da FA vão desde efeitos leves a doença neurotrópica ou viscerotrópicas (BARRETT; TEWEN, 2009).

#### 2. 1. 3. 1. 2 Vírus da encefalite Saint Louis

O VESL pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* e é relacionado ao complexo antigênico do VEJ, grupo que contém também outros patógenos de importância médica, como os VNO e vírus da encefalite de Murray Valley (VEMV) (LINDENBACH; RICE, 2001).

O VESL é o agente etiológico da encefalite de Saint Louis (ESL), uma doença infecciosa febril aguda de grande importância na América do Norte e amplamente distribuída do Canadá a Argentina. Nos Estados Unidos das Américas (EUA) é o arbovírus mais prevalente que tem potencial em causar epidemia (CALISHER, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1991).

Nos seres humanos o vírus causa doença aguda importante, com manifestações clínicas de encefalites causadas por danos neurais pela replicação viral nos tecidos nervosos. A doença caracteriza-se frequentemente por início abrupto com febre, dores de cabeça, fotofobia, mal estar generalizado, tontura, náuseas, vômitos e rigidez de nuca, seguidos por sinais e sintomas de doença neural, entre eles, alterações sensoriais, como confusões, sonolência, letargia e coma. Tremores, paresias e paralisias podem estar presentes. Convulsões são comuns em crianças e injúria renal é relatada pela replicação viral nesse órgão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985). Contudo, a maioria das pessoas infectadas são assintomáticas e febre e dor de cabeça ou meningite asséptica são os únicos sinais observados em 40% dos adultos jovens e crianças (CALISHER, 1994). A letalidade da doença varia consideravelmente de 5% a 10% (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Normalmente o VESL infecta pássaros e é mantido em focos naturais da doença entre pássaros e populações de mosquitos do gênero *Culex*. As aves silvestres, principalmente Passeriformes e Columbiformes, são as fontes do vírus para os mosquitos infectarem os seres humanos, portanto, são considerados os principais reservatórios do VESL e os humanos os hospedeiros finais, portanto, não contribuem para a transmissão e manutenção do vírus. Outros mamíferos podem ser

hospedeiros importantes para o VESL, como primatas, tatus, marsupiais e preguiças (LOVOSEI, 2003; MCLEAN; SCOTT, 1979). O vírus não é patogênico para cavalos (DÉGALLIER *et al.*, 1986).

De acordo Lovosei (2003) os vetores transmissores do VESL nos EUA são os *Culex tarsalis*, *Culex pipens* e *Culex quinquefasciatus*, além do *Culex declarator* e *Culex coronator*.

O VESL 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).

Análises filogenéticas nas sequências do gene E obtidas de 30 cepas de VESL brasileiros indicam uma alta variabilidade genética do vírus dispersas no Brasil e em outros países do mundo. O genótipo tipo II é mais prevalente na América do Norte e os genótipos tipo I, III e VIII são amplamente dispersos por todas as Américas, sugerindo que VESL surgiu inicialmente na América do Sul e se espalhou para a América do Norte (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Em 2002 o VESL foi identificado como agente etiológico em um surto de encefalites por *Flavivirus* ocorrido na província de Córdoba na Argentina, onde os pacientes apresentavam encefalites, meningites, febre e dores de cabeça severas (SPINSANT *et al.*, 2002). Em 2004 o VESL foi isolado no sudeste do Brasil em um paciente com febre e dores de cabeça, que a princípio era considerado um caso de dengue (ROCCO *et al.*, 2005).

Durante uma epidemia de dengue no primeiro semestre de 2006 em São José do Rio Preto - SP, o VESL foi identificado em seis pacientes que tiveram diagnóstico anterior de dengue, dos quais três apresentaram quadros de meningoencefalite viral e três apresentaram sinais de doenças hemorrágicas. Portanto, muitas vezes a encefalite de Saint Louis não é considerada como diagnóstico diferencial para dengue e a falta de pesquisa diagnóstica e a similaridade entre os sintomas da doença e da dengue fazem com que os casos não sejam diagnosticados (MONDINE *et al.*, 2007).

Além da detecção do VESL em humanos, o vírus tem sido identificado em muitos estudos de vigilância de arbovírus em equinos e primatas no Brasil e no restante da América do Sul (CORRÊA *et al.*, 2010; IVERSSON *et al.*, 2003;

RODRIGUES *et al.*, 2010; SVOBODA *et al.*, 2014; SILA *et al.*, 2014; TAURO *et al.*, 2012).

### 2. 1. 3. 1. 3 Vírus do Nilo Ocidental

O VNO é um membro da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus* e pertence ao complexo da encefalite japonesa. O vírus é o agente etiológico da febre do Nilo Ocidental (FNO), doença caracterizada por manifestações clínicas que variam de infecção assintomática a manifestações graves de encefalite ou meningoencefalite, que nos últimos anos ocorre de forma endêmica e de surtos esporádicos em humanos e equinos na África, sul da Europa, América do Norte e Ásia. 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 (CALISHER *et al.*, 1989; CAMPBELL *et al.*, 2002).

Nos mamíferos o vírus acomete o sistema nervoso central causando desordens neurológicas em virtude da proliferação viral, levando a doença neuroinvasiva com quadro clínico de febre (forma branda da doença), meningite e encefalites (forma mais severa da infecção) e quadros esporádicos de paralisia flácida aguda (BAHANGOO *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).

Embora as aves sejam consideradas as principais disseminadoras do 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 (RAPPOLE; DERRICKSON; HUBÁLEK, 2000).

As espécies *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* e *Culex quinquefasciatus* são os vetores com maior competência envolvidos na transmissão do VNO nos EUA, apresentando uma elevada viremia (TURREL *et al.*, 2005). No Brasil, além dos mosquitos do gênero *Culex*, o *Aedes scapularis* e *Aedes albopictus* podem ser

responsáveis pela transmissão do VNO (NATAL; UENO, 2004). Na natureza, a capacidade de perpetuação do vírus em condições climáticas adversas é atribuída à transmissão viral vertical e à sua capacidade de manutenção durante a diapausa do vetor (COORÊA; VARELLA, 2008).

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 em 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).

O VNO possui duas linhagens, a linhagem 1 e a linhagem 2. Uma análise filogenética demonstrou que o VNO introduzido nos EUA em 1999 pertence a linhagem tipo 1, que é a mesma linhagem do vírus que causou epizootia em gansos em Israel em 1998 (GLUBER, 2002).

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, já na América do Sul, anticorpos virais foram detectados em cavalos na Colômbia e em 2006 o vírus foi isolado de cavalos na Argentina (MORALES *et al.*, 2006). Ainda na Argentina, cavalos foram identificados com anticorpos do VNO em 2012 (TAURO *et al.*, 2012). No Brasil, anticorpos neutralizantes foram identificados em cavalos e galinhas do Pantanal (CORRÊA, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Na América do Sul, o vírus foi detectado em humanos pela primeira vez em 2010 na Argentina, quando o paciente apresentava febre, cefaléia e dores musculares (ARGENTINA, 2010).

Um caso esporádico de infecção natural pelo VNO foi descrito em um cão proveniente da região central do Mississippi no EUA que apresentava febre aguda, hiperatividade descontrolada e tremores generalizados. Com a detecção do genoma viral e os sinais clínicos compatíveis, é consistente o diagnóstico de encefalite causada pela infecção do VNO, demonstrando que a infecção em cães ocorre onde há circulação do vírus e presença dos mosquitos transmissores (READ, 2005).

### 2. 1. 3. 2 Togaviridae

Os vírus pertencentes a família Togaviridae possuem envoltório lipoproteico, genoma constituído por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e é constituída por dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus*. O RNA genômico sintetiza um RNA sub-genômico, que codifica a proteína envolvida no encapsulamento e desenvolvimento do vírus, correspondendo a 3' região do genoma. O RNA genômico também codifica as proteínas não estruturais responsáveis pelas funções de replicação do vírus na 5' região do genoma (DAM; FLINT; RYAN, 1999).

O gênero *Alphavirus* é constituído por cerca de 28 vírus que exibem reatividade cruzada e são distribuído em 6 complexos. Os *Alphavirus* possuem 70 nm de diâmetro e possui genoma constituído por RNA, envoltório proteico não glicosado e pelo menos duas proteínas de envelope (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

#### 2. 1. 3. 2. 1 Vírus Mayaro

O VMAY, um membro da família Togaviridae e do gênero *Alphavirus*, é o agente etiológico do Mayaro (MAY), que causou surto de doença febril aguda na região amazônica e no planalto central do Brasil, bem como na Venezuela. A doença caracteriza-se por febre, cefaléia, mialgia, exantema e dores nas grandes articulações causadas por uma poliartrite migratória prolongada, com curso que dura entre 3 a 5 dias. A convalescência por Mayaro pode durar semanas (PINHEIRO *et al.*, 1981; TORRES *et al.*, 2004).

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).

Apesar de o VMAY ser ativo principalmente em florestas, os vetores podem voar por longas distâncias infectando macacos e aves, e com a pressão demográfica resultando no crescimento urbano próximo a florestas, o risco de indivíduos serem infectados é considerado grande (THOISY *et al.*, 2003). Em Luisiana nos EUA, em 1967, se isolou pela primeira vez o VMAY em um pássaro migratório proveniente da América do Sul através de técnicas sorológicas e de identificação viral (CALISHER *et al.*, 1975).

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

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). Em 1998 o vírus foi isolado novamente em um paciente da Guiana Francesa e em 1962 uma alta prevalência do vírus foi identificada durante a realização de um inquérito sorológico em pessoas para verificar a dispersão viral naquele País (TALARMIN *et al.*, 1998).

Outros surtos e epidemia causada pelo VMAY ocorreram no estado do Pará em 1978, onde pacientes apresentaram febre, exantema e artralgia grave e intensa nas articulações das extremidades (AZEVEDO *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 1981). Nesse último surto, a sequência genética de três isolados do vírus caracterizou o genótipo D (AZEVEDO *et al.*, 2009).

No ano de 2000, casos de infecção por MAY foram detectados em três pacientes de São Paulo quando realizavam atividades de pesca no município de Camapuã, no estado de Mato Grosso do Sul, que 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).

#### 2. 1. 3. 2. 2 Vírus Chikungunya

O VCHIK classifica-se entre os vírus da família Togaviridae, ao gênero *Alphavirus* e pertence ao complexo antigênico da floresta Semlik, juntamente com outros *Alphavirus*, baseados nas suas propriedades antigênicas (CALISHER *et al.*, 1998). A doença causada pelo vírus caracteriza-se por febre, dor de cabeça, mialgia, erupções cutâneas e dores das articulações, que podem durar anos. O vírus multiplica-se em monócitos e macrófagos que migram para os tecidos sinoviais



levando a uma resposta inflamatória persistente, mesmo com ausência de viremia (MANSON; HADDOW, 1957).

O vírus tem origem na Tanzânia, África, em 1952-53 e desde então é responsável por surtos isolados e epidemias. No continente Africano foram identificadas duas linhagens do vírus, a linhagem Africana leste e a linhagem Africana sul, na qual inclui um genótipo Asiático (POWERS *et al.*, 2000). Surtos de doença causada pelo vírus ocorreram em outras regiões da África e Ásia, demonstrando uma evolução adaptativa genética do vírus para os vetores potenciais. Como o VCHIK é capaz de sofrer mutações e adaptar-se a novos ciclos zoonóticos, podem adquirir um maior potencial para a emergência (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; TSETSARKIN *et al.*, 2007).

No continente Africano o vírus é mantido em ciclos silvestres entre macacos, mamíferos selvagens e mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes Aegypti*. Já no continente Asiático o ciclo ocorre entre pessoas e os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* (SCHUFFENECKER *et al.*, 2006).

Surtos mais antigos ocorreram nas Filipinas em 1954, 1956 e 1968. Durante os anos 1970 os surtos ocorreram na Tailândia, Sri Lanka, Vietnã, Paquistão, Camboja, Laos, Birmânia, Filipinas e Índia. Entre 1982 e 1998 o vírus se espalhou na Indonésia e foi identificado no sul de Sumatra, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Timor, Nusatenggara, Ilhas Molucas e Irian Jaya (BURT *et al.*, 2012).

A partir de 2000 o vírus reemergiu em países da África e Ásia causando surtos e epidemias de grande magnitude. Em 2006 e 2009, na Índia, análises filogenéticas das cepas virais encontradas em humanos e em *Aedes Albopictus* indicaram que esta espécie foi a principal vetora do vírus na transmissão de CHIKV no continente Asiático (KUMAR *et al.*, 2012).

Em 2013 o genótipo asiático do VCHIK foi introduzido nas Américas pelas ilhas do Caribe, por viajantes que estiveram em áreas afetadas da Ásia e África e logo casos autóctones foram identificados, com 15.000 casos notificados. Em 2014 o vírus atingiu a América Central e do Sul causando surtos no Panamá, Nicarágua, El Salvador, Venezuela e Colômbia (RÚA *et al.*; 2014).

Em 2010 e 2014 casos importados foram identificados no Brasil em viajantes que estiveram no Caribe (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O primeiro caso autóctone no Brasil foi confirmado no Amapá em 2014 e surtos da doença foram estabelecidos na Bahia e no Amapá com 1422 casos

confirmados. Casos de Chikungunya foram registrados também no estado de Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

#### 2. 1. 3. 3. Bunyaviridae

Os vírus pertencentes à família Bunyaviridae possuem envoltório lipoproteico, tamanho de 90-100 nm, genoma constituído por RNA de fita simples e trissegmentados. Dois segmentos tem polaridade negativa, que são denominados de grande (L), médio (M) e pequeno (S). O segmento S do RNA viral codifica a proteína N. O segmento M codifica proteínas não estruturais do envelope viral, proteínas G1 e G2, proteína L e a proteína NS, responsáveis pela replicação viral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

A família Bunyaviridae é constituída por mais de 300 vírus distintos antigenicamente, distribuídos em 4 gêneros: *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*, os quais ao menos 41 estão associados com doenças em humanos (FIGUEIREDO, 1990; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

No Brasil, o vírus da família Bunyaviridae mais importante, do ponto de vista epidemiológico, é o vírus Oropouche, por causar epidemias extensas na Região Amazônica (FIGUEIREDO, 1990; GLUBER, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

##### 2. 1. 3. 3. 1 Vírus Oropouche

O VORO 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 da febre do Oropouche, 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*. 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*). Já o primeiro surto de febre pelo VORO no Brasil foi em Belém em 1961, quando 159 pessoas apresentavam sintomas de dor de cabeça, febre, dores nos músculos, nas articulações e dorso, fotofobia, diplopia, náuseas e tonturas (PINHEIRO *et al.*, 1962).

Em 1988 uma epidemia causada pelo VORO foi registrada nos estados do Maranhão e Goiás, em cidades vizinhas. Os 65 pacientes apresentavam em comum febre, cefaléia, calafrios, mialgias e artralgias que duraram em média de 3 a 5 dias (VASCONCELOS *et al.*, 1989). Em 2006 o VORO foi confirmado ser a causa de uma epidemia de febre em uma região localizada a oeste do Amazonas. Na ocasião, 119 pacientes que apresentavam febre aguda, dores de cabeça, calafrios, tonturas, fotofobia, mialgia, náuseas e vômitos apresentaram anticorpos e alta prevalência do vírus nas amostras examinadas.

Análises genéticas demonstraram que o genótipo II do VORO estava associado com a epidemia da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Os genótipos I e II do VORO são mais comumente encontrados no Oeste e Leste da Amazonas e o genótipo tipo III foi descrito no Sudeste do Brasil (NUNES *et al.*, 2005).

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

Os PNH apresentam-se como importantes hospedeiros vertebrados para os arbovírus (HERVÉ *et al.*, 1986). Por se tratarem de espécies arbóreas e diurnas são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres, quando alimentam-se nas copas das árvores no mesmo horário de alimentação dos vetores (THOISY *et al.*, 2003). Ao se infectarem produzem elevados títulos de anticorpos, viremia persistente e suficiente para infectar vetores. Portanto, são considerados reservatórios, hospedeiros, amplificadores e disseminadores de arbovírus (CALISHER, 1994)

Os primatas são importantes reservatórios no ciclo de diversas zoonoses e como fazem parte de *habitat* com uma grande diversidade biológica, servem como modelos para estudos sobre a dinâmica da transmissão natural de patógenos.

Portanto, são considerados sentinelas naturais para a vigilância de vírus emergentes (WOLFE *et al.*, 1998).

Esses animais também podem ser sentinelas para investigação de epizootias de interesse em saúde pública, como no caso da FA, identificando-se precocemente a circulação do vírus em determinadas localidades e fornecendo 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, 2014).

Muitos estudos sorológicos em animais de vida livre são realizados através de 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). Inquéritos sorológicos e isolamentos têm sido obtidos de primatas dos gêneros *Cebus*, *Saguinus*, *Chiropotes* (HERVÉ *et al.*, 1986), *Alouatta*, *Ateles* e *Callithrix* (HÉERVE; TRAVASSOS DA ROSA, 1983).

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).

Outras espécies de animais, como equinos e morcegos também podem agir como sentinelas para identificar a circulação de arboviroses de interesse em saúde pública em determinada região, fornecendo informações sobre a magnitude e dinâmica da transmissão dos arbovírus (CORRÊA *et al.*, 2010; IVERSSON *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; TAURO *et al.*, 2012; THOMPSON *et al.*, 2015).

### 2. 2. 1 Vigilância de epizootias em primatas não humanos

Epizootias envolvendo 4 macacos sentinelas foram investigadas para detectar o agente causador da morte dos animais na região de Belém. Na ocasião o

VESL foi isolado a partir de amostras sanguíneas de aves e de amostras de *Culex declarator*, ratificando a importância da participação desses hospedeiros no ciclo da encefalite de Saint Louis (VASCONCELOS *et al.*, 1991).

O VFA também foi identificado como a causa de epizootias nos municípios de Jaraguari, Nioaque e São Gabriel do Oeste, no estado do Mato Grosso do Sul, em 2002, segundo dados do Ministério da Saúde, 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, o VFA foi identificado como sendo a causa de epizootias de cinco primatas da espécie *Alouatta seniculus* encontrados mortos em parques ecológicos no município de La Paz e no departamento de Magdalena, ambos na Bolívia, pela técnica de RT-PCR de amostras de tecido hepático coletadas. Das cinco amostras processadas quatro amplificaram o VFA, 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 pelo VFA foram relatadas em várias regiões do estado do Mato Grosso do Sul e no Paraná em 2008. Nas duas ocasiões isolou-se o vírus da FA, pelas técnicas de isolamento viral e RT-PCR, a partir das amostras de vísceras e de material sanguíneo de dois primatas do gênero *Alouatta* que foram à óbito no município de Anastácio, em Mato Grosso do Sul e em Rio Bonito do Iguaçu, no Paraná (BATISTA, 2008; TRANQUILIN *et al.*, 2013).

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 laboratorialmente para o VFA, demonstrando a ocorrência de epizootias precedentes aos 21 casos humanos de FA ocorridos no Estado no mesmo período (OLIVEIRA; LOPES; BAIRROS, 2010; RIO GRANDE DO SUL, 2011), assim como em 2001 (SALLIS *et al.*, 2003).

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).

### 2. 1. 2 Inquéritos sorológicos em animais-sentinela

Inquéritos sorológicos em animais sentinela são utilizados tanto para monitoramento de vírus quanto para confirmar a circulação viral em localidades específicas, como durante um surto de MAY e FA em Belterra, no estado do Pará em 1978, quando alta prevalência de anticorpos do VMAY foi encontrada nos *Callithrix argentata* durante a investigação nos hospedeiros vertebrados. Das 119 amostras testadas por 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).

Em um estudo realizado no Paraná em 1997 para identificar o agente causador de encefalites em equinos, foram analisadas amostras sorológicas de vinte e dois equinos para detecção de anticorpos e amostras de 1.883 culicídeos na tentativa de isolamento viral. Tanto as amostras dos equinos quanto dos culicídeos foram negativas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000). Os resultados negativos das amostras podem ser decorrentes da influência de fatores biológicos, ecológicos e físicos na transmissão dos arbovírus naquele tempo e espaço, 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. A maior prevalência de anticorpos para o VMAY foi encontrada em *Alouatta seniculus* (70/66%) e em *Saguinus midias* (8/18,2%). Dos soros humanos testados 6,3% foram positivos para VMAY e a prevalência foi maior em pessoas que mantêm contato com a floresta, indicando que o vírus circula naquele país (TALARMIN *et al.*, 1998). Outro inquérito sorológico para o VMAY com vinte e oito mamíferos da floresta da Guiana Francesa revelou uma soroprevalência de 0 a 52% para o VMAY (THOISY *et al.*, 2003).

Após o isolamento do VFA em um primata da espécie *Alouatta caraya* morto em 2001, no Rio Grande do Sul, outros estudos ecológicos foram desencadeados para pesquisa de arbovírus. Na ocasião estudos entomológicos com coletas de vetores foram realizados e o VFA foi isolado 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, ações de vigilância ativa da FAS em primatas e em vetores com objetivo de identificar e definir 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 à circulação do vírus sem a necessidade de sacrifício de nenhum animal, adequando a vigilância à legislação ambiental. Até aquele momento, apenas em um animal (*Alouatta caraya*) foi detectado presença de anticorpos para VFA (TORRES *et al.*, 2003).

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 Estado. Nas amostras de soro dos primatas foram detectados anticorpos para o VORO (n=1) e VESL (n=16) pelo teste de IH e NT (ALMEIDA *et al.*, 2008).

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 PNH, capturados através de rifle com dardos anestésicos, resultou em quatro macacos positivos para o VESL através da técnica de IH. Nenhuma das sete amostras positivou para o VFA. Das quatro amostras positivas, duas apresentaram isolamento viral, confirmando a infecção pelo VESL em macacos no Nordeste da Argentina e reforçando a possível intervenção desses primatas no ciclo natural do vírus. Além dos macacos, o VESL foi isolado de pacientes, roedores e mosquitos (BOTTINELLI *et al.*, 2002).

Durante o período de junho de 2004 a dezembro de 2005, amostras de sangue de 133 primatas de três espécies, capturados através de armadilhas na região de Porto Rico no Nordeste do estado do Paraná, e de 23 equinos foram submetidas ao teste de IH e ao teste de NT. Vinte e uma amostras dos primatas e nove de equinos apresentam títulos para VESL. Esse foi o primeiro relato de soroprevalência de anticorpos específicos do VESL em macacos selvagens na

região Sul do Brasil, incriminando-os na manutenção natural do ciclo da ESL na região do Conesul (SVOBODA *et al.*, 2014).

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

Após isolamento do VFA em macacos de São José do Rio Preto e de dois casos humanos fatais no estado de São Paulo em 2011, foram conduzidas expedições para avaliação eco-epidemiológica da FA com coletas de sangue de 108 primatas de três espécies diferentes. Do total de amostras analisadas quatro foram positivas pela técnica de isolamento viral e RT-PCR, confirmando a circulação do vírus mesmo de forma esporádica no estado de São Paulo, reforçando a importância da vacinação em áreas consideradas de risco (MORENO *et al.*, 2011).

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 isolamento viral e pelo teste de 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).

Equinos também são considerados animais sentinelas para pesquisa da circulação de arboviroses, como foi demonstrado em estudos sorológico com 1401 equinos provenientes de várias regiões do Brasil, incluindo do município de Maracajú, no estado do Mato Grosso do Sul. O estudo avaliou e investigou a circulação de arbovírus nas localidades pesquisadas. Foram detectados anticorpos neutralizantes específicos para VESL e para vírus Ilheus (VILH) (RODRIGUES *et al.*, 2010), assim como em cavalos da Argentina (TAURO, 2012), confirmando uma ampla distribuição de VESL e outros arbovírus na região Conesul da América do Sul (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Inquéritos sorológicos em equinos foram realizados no Pantanal com objetivo de detectar infecções por arbovírus que causam encefalites em humanos. Os resultados dos testes sorológicos evidenciaram que o VESL e o VROC estão amplamente distribuídos no estado do Mato Grosso do Sul, assim como em cavalos da Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo (SILVA *et al.*, 2014; TAURO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2010).



Evidências sorológicas confirmaram a presença do VNO através de inquéritos em equinos na região do Pantanal através da técnica de Neutralização (CORRÊA, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Em um desses estudos foi demonstrado a presença de anticorpos do VNO em cavalos do estado da Paraíba (SILVA *et al.*, 2013) e em galinhas do Pantanal (MELANDRI *et al.*, 2012), demonstrando a emergência do VNO em regiões do País.

Em uma investigação preliminar, pela presença de arbovírus em amostras 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).

Inquéritos sorológicos em aves selvagens sentinelas são também ações efetivas e factíveis na vigilância de arbovírus nos EUA e na Europa (JOZAN *et al.*, 2003; LÓPEZ *et al.*, 2011). A vigilância de epizootias em aves hospedeiras causadas pelo VNO é considerada uma estratégia efetiva para vigilância do vírus, como demonstrado em estudos realizados com carcaças de aves de rapina coletadas nos EUA entre 2001 e 2004, utilizando métodos de detecção de antígenos e de isolamento viral (ELLIS *et al.*, 2007).

O vírus também foi isolado em corvos que morreram durante um surto de FNO em humanos no verão de 1999 em Nova York, New Jersey e em Connecticut, definindo que o VNO foi a causa do surto em humanos no mesmo limite geográfico e temporal (EIDSON *et al.*, 2001).

Curiosamente, PNH foram considerados sentinelas para investigação epidemiológica durante período em que uma epidemia de encefalite e meningite ocorreu no Canadá. Na ocasião um animal no Canadá (*Macaca sylvanus*), que apresentou sinais clínicos neurológicos, foi positivo para o VNO nas técnicas de RT-PCR, IH, isolamento e imunohistoquímica. Após a confirmação diagnóstica, outros trinta e três PNH foram testados, sendo que três animais foram positivos para VNO na IH e dois destes três foram positivos na NT (OLBERG *et al.*, 2004).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Detectar infecções por arbovírus em primatas não humanos de vida livre capturados no estado do Mato Grosso do Sul.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Para a consecução do objetivo geral seguem os objetivos específicos:

- a) realizar inquéritos sorológicos para detectar a presença de anticorpos específicos para arbovírus de interesse em saúde pública nos primatas não humanos capturados;
- b) identificar soropositividade e títulos de anticorpos contra arbovírus em populações de primatas não humanos capturados;
- c) detectar genoma viral de arbovírus através da técnica de RT-PCR em amostras sanguíneas de primatas não humanos capturados;

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de pesquisa**

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

### **4.2 Local e período da pesquisa**

A pesquisa desenvolveu-se em regiões de matas dos municípios de Campo Grande, Aquidauana, Jardim, Miranda, Bodoquena e Coxim, selecionados por critério de risco de transmissão entre pessoas susceptíveis, e dos municípios Corumbá, por fazer fronteira com os países da Bolívia, onde a informação sobre a circulação de arbovírus é escassa, e no município de Mundo Novo, selecionado por fazer fronteira com o Paraguai e com o estado do Paraná (Figura 4). A pesquisa ocorreu no período de fevereiro de 2012 a outubro de 2014. 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.

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 acima do nível do mar (20°26'34"S e 54°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 município de Corumbá situa-se a 415 km da capital Campo Grande, na região do pantanal sul matogrossense, (19°00'33"S e 57°39'12"W) com altitude de 188 metros acima do nível do mar. O município faz fronteira com a Bolívia e possui uma área estimada em 64.960,86 Km<sup>2</sup>, sua extensão representa 18,19% do Estado, sua população é de 101.089 habitantes.

O município de Aquidauana localiza-se no sul da região Centro Oeste do Brasil, no Pantanal Sul-Mato-Grossense (Microrregião de Aquidauana), situada numa região da Serra da Piraputanga e de Maracaju. Localiza-se na latitude de 20°28'15" Sul e longitude de 55°47'13" Oeste.

No município de Jardim os animais foram capturados no Balneário municipal, onde turistas de todo o mundo frequentam. O município de Jardim está localizado no sudoeste do Estado ( $21^{\circ}28'49''$  e  $56^{\circ}08'17''$ ). Possui uma extensão territorial de 2.207,6 km<sup>2</sup>.

No município de Miranda os animais foram capturados em um parque hotel localizado na Estrada Parque Pantanal, pantanal Sul-Mato-Grossense, entre os pontos de coordenada geográfica  $20^{\circ}30'S$  e  $56^{\circ}15'W$ . No município de Corumbá o PNH foi capturado na sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato-Grossense ( $18^{\circ}20'-19^{\circ}40'S$  e  $57^{\circ}57'-55^{\circ}00'W$ ).

O município de Mundo Novo está situado no sul da região Centro-Oeste do Brasil, no Sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul, possui Bioma de Mata Atlântida e uma área estimada de 477.783 km<sup>2</sup>. Sua população estimada é de 17.043 habitantes e o município faz divisa com a cidade de Guaíra, no estado do Paraná, e com a cidade paraguaia de Salto del Guairá. As amostras dos animais foram coletadas em duas localidades. A primeira localidade estudada foi em um fragmento florestal próximo a rodovia BR 163 ( $23^{\circ}54'15,7''S$  e  $54^{\circ}18'9,4''W$ ), a qual passa de Santarém, no estado do Pará, até Tenente Portela, no Rio Grande do Sul. A localidade é caracterizada por ser um local de parada e descanso de caminhoneiros de todo o País onde o contato entre a população humana e os animais favorece alto risco de transmissão de doenças. A outra localidade estudada situa-se num fragmento de floresta no centro do município de Mundo Novo, em uma propriedade particular ( $23^{\circ}56'16,3'S$  e  $54^{\circ}17'8,9''W$ ), onde os PNH são de vida livre e adaptados a convivência humana, ocorrendo um contato muito próximo entre os PNH e seres humanos.

O município de Coxim está situado na Bacia do Alto Paraguai e é um dos principais pontos de pesca do país, atraindo milhares de turistas e pescadores. Está situado no norte de Mato Grosso do Sul (Microrregião do Alto Taquari). Localiza-se na latitude de  $18^{\circ}30'25''S$  e longitude de  $54^{\circ}45'36''$  Oeste, distante 255 km da capital estadual.

O município de Bodoquena está situado na região da Serra da Bodoquena e é um dos municípios que integram o complexo turístico do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, apresentando grande potencial turístico. A cidade está localizada a oeste de Mato Grosso do Sul e próximo à fronteira com o Paraguai e Bolívia.



Figura 5 - Exemplares de primatas do gênero *Sapajus* capturados durante o estudo



Foto: Batista (2010)

Figura 6 - Exemplares de primatas do gênero *Alouatta* capturados durante o estudo



Foto: Marcos Shiozama  
Fonte: Svoboda (2007)

#### 4.4 Procedimentos para coleta dos dados

Para coleta de dados foi utilizada ficha de identificação, registro e coleta de amostras de primatas, 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).

#### 4.4.1 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.

#### 4.4.2 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”.

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

Os primatas de pequeno porte, gênero *Cebus* spp., foram capturados com armadilhas terrestres do tipo Tomahawk (Figura 7) e os primatas de grande porte, gênero *Alouatta* spp, foram capturados com uso de rifle com dardo anestésico (DUQUE; ROTUNDO, 2003) (Figura 8). 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 não 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).



Os animais capturados 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 (Figura 7).

Figura 7 – Procedimentos utilizados para captura de primatas não humanos de pequeno porte.



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)



#### 4.4.4 Colheita de material biológico

Após a sedação completa, por punção da veia femoral ou braquial, foi coletado 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°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 8).

Figura 8 – Procedimentos com animais sedados



Legenda: A - coleta de dados biométricos; B - coleta de material sanguíneo  
Foto: Batista (2010)

#### 4.4.5 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. Antes de cada uso o *microchip* e o aplicador foram desinfectados por imersão em solução de álcool iodado a 2%.

#### 4.4.6 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.

#### 4.4.7 Diagnóstico laboratorial

Os exames sorológicos e de isolamento viral das 59 amostras de primatas coletadas foram realizados na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas do Ministério da Saúde, localizado no município de Ananindeua no estado do Pará, e os testes de biologia molecular das amostras coletadas dos primatas dos municípios de Bodoquena e Mundo Novo (25) foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

Para demonstração da presença e 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). O teste de IH utilizado foi padronizado pela seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (CLARKE; CASALS, 1958) seguindo um protocolo de Shope (1963) adaptado para microplacas.

Todas as amostras sanguíneas foram submetidas ao teste de isolamento viral em camundongos recém nascidos e em culturas de células de *Aedes albopictus* (Clone C6/36). Camundongos foram observados diariamente, durante 21 dias e qualquer alteração observada foi anotada em cartões de identificações. As garrafas inoculadas foram observadas diariamente, durante dez dias em microscópio óptico invertido para a verificação de efeito citopático (ECP) (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1994). Quando a confirmação da replicação viral nas células é considerada, realiza-se o teste de imunofluorescência indireta (IFI) (GUBLER *et al.*, 1984) utilizando-se

anticorpos policlonais anti-*Alphavirus*, anti-*Flavivirus*, Anti-*Orthobunyavirus* e anti-*Phlebovirus* (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Para detecção do RNA viral de *Flavivírus* presente nas amostras coletadas em Bodoquena e Mundo Novo foi realizado o teste de RT-PCR, pela amplificação do c-DNA obtido a partir do RNA viral. O protocolo utilizado nesse estudo foi adaptado por BONA *et al.* (2012), no qual houve a substituição dos *primers* espécie e soro específicos originalmente utilizados por *primers* degenerados (genéricos) para o gênero *Flavivirus* (FG2 e FG1). Estes primers amplificam a região genômica NS5 dos *Flavivirus* (FULOP *et al.*, 2008). As cepas de *Flavivirus* utilizadas neste estudo como controles positivos foram: RNA viral do vírus da Dengue sorotipo 4 e RNA viral do vírus da Febre Amarela (cepa vacinal 17D), cedidas pelo Instituto Evandro Chagas.

A extração de RNA viral foi feita usando um kit comercial QIAmp Viral Mini (Qiagen, USA), seguindo protocolo do fabricante. A transcrição reversa para obtenção do cDNA foi conduzida utilizando 2000 ng do RNA viral e 1 µL do *primer* FG1 que foram colocados em termociclador por 5 minutos a 70°C. Em seguida foram adicionados 5 µL de tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8.3); KCl 375 mM; MgCl 15 mM], 0.5 µL de dNTPs e 20 unidades da enzima Transcriptase Reversa AMV (Promega, USA). As amostras retornaram para o termociclador por 90 min a 42 °C e 15 min a 70° C.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 3 µL do cDNA previamente obtido, 2.5 µL de tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 1 µL do *primer* FG2, 1 µL do *primer* FG1, 1.5 µL de MgCl, 0.5 µL de dNTPs e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, USA). Por fim, para a obtenção dos produtos de amplificação, as amostras retornaram ao termociclador para 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto, e 72 °C por 2 minutos. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se um controle positivo do vírus da Febre Amarela (cepa 17D) e um controle negativo.

Os fragmentos amplificados durante a etapa de PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética horizontal em gel de poliacrilamida 10% e então visualizados em aparelho transiluminador sob luz ultravioleta.

#### **4.5 Estratégias para análise dos dados**

Foi realizada a estatística descritiva, mediante representação tabular e gráfica. Para verificar possíveis associações entre as variáveis de estudo foi utilizado o teste qui-quadrado ou de Fisher, ao nível de significância de 5%. Foram utilizados os programas estatísticos Epi-Info versão 7 e o Bio Estat versão 5.3.

#### **4.6 Aspectos éticos**

O projeto foi autorizado pela Comissão de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, protocolo número 462-2012 (ANEXO A). A participação dos animais no estudo foi autorizada e ocorreu de acordo com legislação específica que estabelece normas para captura e manejo de animais, através da autorização e licenças para fins científicos e didáticos –SISBIO (nº 29430-1) emitida pelo IBAMA (ANEXO B). Além disso, contou 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 foi considerada 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.

## 5 RESULTADOS

Os resultados, como referem-se aos três objetivos específicos, serão apresentados sob a forma de artigos que correspondem aos mesmos.

O primeiro artigo, que diz respeito à detecção de arbovírus de interesse em saúde pública em primatas de vida livre do Novo Mundo (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) capturados em Mato Grosso do Sul, Brasil, foi publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em novembro de 2013.

O segundo artigo refere-se à avaliação de arbovírus de interesse da saúde pública em primatas não-humanos de vida livre e foi publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em março de 2015.

O terceiro artigo refere-se à serosurvey of arbovirus in free-living Non-human Primates (*Sapajus* spp.), in the Southern Cone region, Brazil, foi encaminhado para avaliação no periódico Zoonoses and Public Health, cujo documento de envio compõe o anexo C.

## 5. 1 Artigo 1 - Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical

### Major Article

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(6):684-690, Nov-Dec, 2013  
http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0181-2013



# Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil

Paulo Mira Batista<sup>[1],[2]</sup>, Renato Andreotti<sup>[3]</sup>, Paulo Silva de Almeida<sup>[1]</sup>,  
Alisson Cordeiro Marques<sup>[4]</sup>, Sueli Guerreiro Rodrigues<sup>[5]</sup>, Jannifer Oliveira Chiang<sup>[5]</sup>  
and Pedro Fernando da Costa Vasconcelos<sup>[5]</sup>

[1]. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [2]. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Estadual do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [3]. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Gado de Corte), Campo Grande, MS. [4]. Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Ponta Porã, Ponta Porã, MS. [5]. Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Ananindeua, PA.

### ABSTRACT

**Introduction:** A sero-epidemiological survey was undertaken to detect the circulation of arboviruses in free-living non-human primates. **Methods:** Blood samples were obtained from 16 non-human primates (13 *Sapajus* spp. and three *Alouatta caraya*) that were captured using terrestrial traps and anesthetic darts in woodland regions in the municipalities of Campo Grande, Aquidauana, Jardim, Miranda and Corumbá in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The samples were sent to the Instituto Evandro Chagas (IEC) in Ananindeua, Pará, Brazil, to detect antibodies against 19 species of arboviruses using a hemagglutination inhibition test (HI). **Results:** Of the 16 primates investigated in the present study, five (31.2%) were serologically positive for an arbovirus. Of these five, two (12.5%) exhibited antibodies to the *Flavivirus* genus, one (6.2%) exhibited a monotypic reaction to *Cacipacoré* virus, one (6.2%) was associated with *Mayaro* virus, and one (6.2%) was positive for *Oropouche* virus. **Conclusions:** Based on the positive serology observed in the present study, it was possible to conclude that arboviruses circulate among free-living primates. The viruses in the areas studied might have been introduced by infected humans or by primates from endemic or enzootic areas. Studies of this nature, as well as efficient and continuous surveillance programs, are needed to monitor viral activities in endemic and enzootic regions.

**Keywords:** Non-human primates. Arboviral infection. Zoonoses.

### INTRODUCTION

Arboviruses are transmitted and maintained in nature through wild cycles, in which several species of bloodsucking arthropods act as vectors and wild vertebrates act as reservoir hosts<sup>1</sup>. The most commonly affected people are those who maintain close contact with wild environments where ecological niches of arbovirus exist<sup>2</sup>. In these environments, arboviruses can cause meningitis and diseases of the central nervous system, as seen for infections with St. Louis encephalitis virus (SLEV), Rocio virus (ROCV), eastern equine encephalitis virus (EEEV) and western equine encephalitis virus (WEEV)<sup>1</sup>.

Certain arboviruses appear regularly in urban areas, such as dengue virus (DENV) and *Oropouche* virus (OROV), or in peri-

urban areas, such as *Mayaro* virus (MAYV) and yellow fever virus (YFV), causing epidemic febrile illnesses characterized by exanthematous and/or hemorrhagic fever<sup>1</sup>.

Arboviruses contain genomes made up of ribonucleic acid (RNA) that is either segmented or non-segmented<sup>3</sup>. These viruses are classified into five principal families according to their antigenic properties and physicochemical characteristics: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* and *Rhabdoviridae*<sup>1</sup>.

Arboviruses are considered to be emerging disease agents when they initially appear in a population or when their incidence or geographic distribution increases considerably<sup>3</sup>, as observed in a recent serological study of non-human primates (NHPs) in the municipality of Bonito, Mato Grosso do Sul, which detected antibodies to MAYV and OROV<sup>4</sup>. A number of factors can precipitate emerging disease, such as ecological changes due to economic development, agricultural or climatic abnormalities, demographic and behavioral changes, international traffic and wildlife trade, microbial adaptation or a collapse in public health control programs<sup>3</sup>.

Due to their arboreal and diurnal habits, non-human primates are more frequently infected by arboviruses than other terrestrial animals. They are infected when they feed in

**Address to:** Dr. Paulo Mira Batista. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica/SES/MS. Av. do Poeta, Bloco 7, Jardim Veraneio, Parque dos Poderes, 79031-902 Campo Grande, MS, Brasil.

**Phone:** 55 67 3318-1682

**e-mail:** paulomirabatista@gmail.com

**Received** 10 September 2013

**Accepted** 25 November 2013



treetops, using the same feeding schedule as vectors<sup>5</sup>. Thus, they can act as important reservoirs in the cycle of several zoonoses. Furthermore, because they are part of a habitat with high biological diversity, they could be used for natural sentinel surveillance of emerging arboviruses, even when endangered by these diseases<sup>6</sup>.

Non-human primates can be used in biomedical research because they have anatomical, physiological, biochemical and behavioral similarities with humans<sup>7</sup>. Serological studies in wild animals have been limited. They have been performed through cross-sectional surveys, using several animals at a time, to detect the distribution of seropositivity and antibody titers to determine whether the host has been exposed to an antigen<sup>5</sup>.

Because they have genetic and physiological characteristics similar to those of humans, primates are susceptible to several common pathogens that can cross the boundaries of species through various transmission routes, particularly through vectors. Interaction between humans and wild primates living in tropical forests has increased due to ecotourism and the invasion of the forests, thereby increasing the likelihood of the transmission of pathogens<sup>6</sup>.

Arboviruses could potentially become an important public health problem in Brazil in the coming years. Monitoring programs should be able to detect these emerging viruses before they cause major outbreaks. Laboratory tests to confirm diagnosis are of great importance because these viruses cannot be easily distinguished clinically from other viral diseases, such as dengue<sup>8</sup>.

The aim of the present study was to conduct serological and virological tests to detect circulating arboviruses in non-human primates in the regions of Serra da Bodoquena and the Pantanal in Mato Grosso do Sul (Brazil) to provide information that could be used to define and improve prevention and control strategies for these important zoonoses.

## METHODS

### The study site

The wild animals used in the present study were captured from forests in the municipalities of Campo Grande (8), Aquidauana (1), Jardim (4), Miranda (2) and Corumbá (1) in the State of Mato Grosso do Sul (Figure 1). In these municipalities, there is a predominance of the *cerrado* ecosystem, which is characterized by short, sloping, twisted trees with thin trunks. The *cerrado* has well-defined climatic seasons: a rainy season in summer, from October to April, and a dry season in winter, which extends from June to August.

The City of Campo Grande, which is the capital of the State of Mato Grosso do Sul, is situated in the central region of the state, at approximately 532m above sea level (20°26'34" S and 54°38'47" W). It has an estimated area of 8,096.05km<sup>2</sup>, and its population is approximately 765,000 inhabitants. The municipality of Aquidauana is located in the south of the Central West region of Brazil, in the Pantanal of Mato Grosso do Sul (micro-region - Aquidauana) in the region of the

Serra da Piraputanga and Maracajú (20°28'15" S and 55°47'13" W). The municipality of Jardim is located in southwest Mato Grosso do Sul (21°28'49" S and 56°08'17" W). It has an area of 2,207.6km<sup>2</sup>, with a humid sub-tropical climate and temperatures ranging from 15°C to 39°C.

In the municipality of Miranda, animals were captured at a park hotel on Pantanal Park Road, Mato Grosso do Sul (20°30' S and 56°15' W). In the City of Corumbá, non-human primates were captured in the Nhecolândia sub-region (18°20'-19°40' S and 57°57'-55°00' W).

The Pantanal is a seasonal tropical wetland with an area of approximately 140,000km<sup>2</sup>, and it is considered one of the largest freshwater ecosystems in the world<sup>9</sup>. The Brazilian Pantanal, which represents 85% of the total area of the Pantanal, is located in the States of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul in the Central-West region of Brazil, and the parts of the Pantanal in these two states are known as the Pantanal North and South, respectively<sup>10</sup>. This region is ecologically classified into sub-regions according to vegetation, flooding and physiography<sup>11</sup>. The Nhecolândia sub-region, which is situated in the South Pantanal, comprises approximately one-fifth of the total area of the ecosystem, and it is characterized by hundreds of shallow lakes that exhibit different degrees of salinity, as well as coalescence of the system during floods<sup>12</sup>.

### Primates

Blood samples from 16 free-living non-human primates were analyzed. Thirteen *Sapajus* spp. were captured using humane live terrestrial traps (Tomahawk) set in previously determined areas for easy viewing<sup>13</sup>. Three *Alouatta caraya* were captured with the aid of an anesthetic dart rifle<sup>14</sup>. Of the animals captured, four (25%) were female and 12 (75%) were male, and 11 (68.8%) were adults and five (31.2%) were juveniles. The animals were anesthetized using a protocol based on the association of tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride<sup>15</sup>. The dosage, adjusted to the weight of the animal, was injected intramuscularly. All of the capture procedures were performed by a group of biologists and veterinarians, with the authorization of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (*Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* - IBAMA) under authorization number 21808-1.

Blood samples were collected, and aliquots of serum and whole blood were initially frozen in liquid nitrogen and then stored in a freezer at -70°C until processing<sup>16</sup>. Biometric and clinical data were collected (data not shown), and microchip identification transponders were attached to the animals. After recovery from anesthesia, the animals were released.

### Serological tests

The serum samples from the 16 animals were analyzed using the hemagglutination inhibition test (HI) and a panel of 19 different types of arbovirus distributed among the following genera: *Alphavirus* (WEEV, EEEV, MAYV and *Mucambo* virus), *Flavivirus* (YFV, *Ilheus* virus, SLEV, *Cacipacoré* virus, ROCV and *Bussuquara* virus), *Orthobunyavirus* (*Guaroa*, *Maguari*, *Tacaiuma*, *Utinga*, *Belém*, *Caraparu*, *Catu* and *ORO* virus) and *Phlebovirus* (*Icoaraci* virus).



FIGURE 1 - Map of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, with the municipalities of Campo Grande, Aquidauana, Miranda, Jardim and Corumbá highlighted (study area).

The HI test used in the present study was standardized by the Section of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers (SAARB) of the Instituto Evandro Chagas (IEC) following the protocol described by Clarke and Casals<sup>17</sup>, as adapted for microplates by Shope<sup>18</sup>.

The antigens used were prepared from the brains and/or serum of newborn infected mice using the sucrose-acetone and sorovirus extraction methods, respectively<sup>19</sup>. The serum samples were pre-treated with acetone to remove natural inhibitors, and they were adsorbed on goose erythrocytes (*Anser cinereus*)<sup>20</sup> to remove non-specific agglutinins that might inhibit the agglutination of red blood cells, thereby avoiding false-positive results.

#### Virological tests

For virus isolation, newborn Swiss albino mice (*Mus musculus*) were inoculated intracerebrally with 0.02mL of the serum and/or blood of the captured primates. The serum or blood samples were diluted 1:10 in buffered saline (PBS) containing antibiotics (100IU/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin) and 0.4% bovine albumin. The animals were observed daily for 21 days, and any change was recorded on their identification cards. Concomitantly, a continuous culture of gut cells from *Aedes albopictus* Clone C6/36) was inoculated with the primate samples. The cultures were maintained in Leibovitz's modified culture medium with L-glutamine (L-15), supplemented with tryptose, non-



essential amino acids, penicillin (100IU/mL) and streptomycin (100µg/mL), using 5% fetal bovine serum (FBS) for the growth medium and 2% for the maintenance medium. The cultures were observed daily for 10 days with the aid of an inverted optical microscope to assess cytopathic effects (CPEs). Confirmation of viral replication in the cells was performed using the indirect fluorescent antibody test (IFAT)<sup>21</sup> with polyclonal antibodies to *Alphavirus* and *Flavivirus* genera<sup>1</sup>.

#### Statistical analysis

Associations between variables of interest and arbovirus infection were quantified using prevalence ratios and their 95% confidence intervals, and the significance level was 5%.

## RESULTS

Of the 16 non-humans primates assessed in the present study, five (31.2%) were serologically positive for antibodies to arboviruses (Table 1). Two primates exhibited antibodies to viruses belonging to the genus *Flavivirus* (titers from 1:80 to 1:160), one exhibited a monotypic reaction to *Cacipacoré* virus (titer 1:20), one exhibited a reaction to MAYV (titer 1:20), and one (6.2 %) exhibited a reaction to OROV (titer 1:80) (Table 2 and Table 3).

There were no differences in the prevalence of infection by arboviruses according to sex, age or species.

## DISCUSSION

The results found in the present study were similar to results previously reported for the municipality of Bonito (State of Mato Grosso do Sul), in which 17 (48.5%) animals exhibited antibodies to arboviruses of the genus *Alphavirus*

and *Flavivirus*, as well as monotypic reactions to *Mayaro* and *Oropouche* viruses. A number of samples also exhibited reactivity to more than one type of arbovirus<sup>4</sup>.

When non-human primates are assessed, the use of sero-epidemiological surveys as an indicator of the circulation of arboviruses, as well as *sentinel animals*, is a feasible method for obtaining information concerning the presence of viruses in natural environments<sup>22</sup> because these primates are arboreal and commonly diurnal species that are more frequently infected by arboviruses than other terrestrial animals<sup>5</sup>.

In the present study, the HI test was used to detect the distributions of seropositive animals and antibody titers in non-human primates. The same diagnostic technique was used to detect arbovirus antibodies in spider monkeys (*Ateles geoffroyi*)<sup>23</sup>. The HI test has often been used in serological surveys because it can detect antibodies over a long period after natural infection. It is considered a test of high sensitivity and low specificity compared to other serological tests, such as the immunoglobulin M (IgM) capture enzyme immunoassay (MAC-ELISA)<sup>24</sup>. However, it is a more sensitive and accurate technique than methods that use large sample volumes, enabling savings in time and reagents. The HI test is an ideal method for detecting antibodies in wild animals captured in forests<sup>19</sup>.

In the present study, cross-reactivity was found between viruses belonging to the genus *Flavivirus* in two serum samples, precluding the identification of the infecting virus and the time of infection of the animals. With the HI test, it is common to observe the occurrence of cross-reaction between viruses belonging to this genus<sup>24</sup>. Positive results for the presence of antibodies to *Flavivirus* suggest that the host was exposed at some stage to one of the arboviruses studied and produced antibodies to combat it<sup>5</sup>.

The negative results found for viral isolation in the present study corroborate the data found in a previous study conducted

TABLE 1 - Antibodies against arboviruses in sera from 16 non-human primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) detected by the hemagglutination inhibition test, with the results grouped by sex, age and species.

| Variables              | Hemagglutination inhibition |                        |                     | PR (95% CI) <sup>a</sup> |
|------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
|                        | positive (%)<br>(n=5)       | negative (%)<br>(n=11) | total (%)<br>(n=16) |                          |
| Sex                    |                             |                        |                     |                          |
| male                   | 4 (33.3)                    | 8 (66.7)               | 12 (75.0)           | 1                        |
| female                 | 1 (25.0)                    | 3 (75.0)               | 4 (25.0)            | 1.33 (0.20 - 8.71)       |
| Age                    |                             |                        |                     |                          |
| adult                  | 4 (36.4)                    | 7 (63.6)               | 11 (68.8)           | 1                        |
| not adult              | 1(20.0)                     | 4 (80.0)               | 5 (31.2)            | 1.82 (0.27 - 12.40)      |
| Species                |                             |                        |                     |                          |
| <i>Alouatta caraya</i> | 1 (33.3)                    | 2 (67.7)               | 3 (18.7)            | 1                        |
| <i>Sapajus</i> spp.    | 4 (30.8)                    | 9 (69.2)               | 13 (81.3)           | 1.08 (0.18 - 6.53)       |

PR (95% CI): prevalence ratio and 95% confidence intervals.

TABLE 2 - Arboviruses in samples from 16 non-human primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) according to the place of capture, Mato Grosso do Sul, Brazil, 2013.

|                         | Municipality |      |        |      |            |       |         |      |         |   |
|-------------------------|--------------|------|--------|------|------------|-------|---------|------|---------|---|
|                         | Campo Grande |      | Jardim |      | Aquidauana |       | Miranda |      | Corumbá |   |
|                         | (n=8)        |      | (n=4)  |      | (n=1)      |       | (n=2)   |      | (n=1)   |   |
| Arbovirus               | n            | %    | n      | %    | N          | %     | n       | %    | n       | % |
| <i>Flavivirus</i>       | 1            | 12.5 | 1      | 25.0 | -          | -     | -       | -    | -       | - |
| <i>Cacipacoré virus</i> | -            | -    | -      | -    | 1          | 100.0 | -       | -    | -       | - |
| <i>Mayaro virus</i>     | -            | -    | 1      | 25.0 | -          | -     | -       | -    | -       | - |
| <i>Oropouche virus</i>  | -            | -    | -      | -    | -          | -     | 1       | 50.0 | -       | - |
| Total                   | 1            | 12.5 | 2      | 50.0 | 1          | 100.0 | 1       | 50.0 | -       | - |

TABLE 3 - Antibody titers for arboviruses determined using the hemagglutination inhibition test, with the sex, age and the frequency of positive non-human primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in the municipalities of Campo Grande, Jardim, Aquidauana, Miranda and Corumbá in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil -2013.

| ID     | Location of capture | Sex | Age | Arbovirus         | HI results* (antibody titers) |
|--------|---------------------|-----|-----|-------------------|-------------------------------|
| CG1/12 | Campo Grande        | M   | J   | -                 | -                             |
| CG2/11 | Campo Grande        | M   | J   | -                 | -                             |
| CG3/12 | Campo Grande        | M   | A   | -                 | -                             |
| CG4/11 | Campo Grande        | M   | A   | -                 | -                             |
| CG5/11 | Campo Grande        | F   | J   | <i>Flavivirus</i> | 160                           |
| CG6/11 | Campo Grande        | F   | A   | -                 | -                             |
| CG7/11 | Campo Grande        | M   | A   | -                 | -                             |
| CG8/11 | Campo Grande        | M   | J   | -                 | -                             |
| AQ1/12 | Aquidauana          | M   | A   | <i>Cacipacoré</i> | 20                            |
| MR1/11 | Miranda             | M   | A   | -                 | -                             |
| MR2/11 | Miranda             | M   | A   | <i>Oropouche</i>  | 80                            |
| CO1/11 | Corumbá             | M   | A   | -                 | -                             |
| JD1/11 | Jardim              | F   | J   | -                 | -                             |
| JD2/11 | Jardim              | F   | A   | -                 | -                             |
| JD3/11 | Jardim              | M   | A   | <i>Flavivirus</i> | 80                            |
| JD4/11 | Jardim              | M   | A   | <i>Mayaro</i>     | 160                           |

ID: identification of animal; HI: hemagglutination inhibition. \* Test result: positive HI  $\geq 1:20$ ; M: male; F: female; J: juvenile; A: adult

in 35 non-human primates in a central region of Paraguay, which unsuccessfully attempted to isolate arboviruses in cell cultures of the Vero E6 strain<sup>25</sup>. Viral isolation from blood samples of animals and humans is considered to be a sensitive and economical method, and it is the gold standard for virological diagnosis<sup>24</sup>.

The detection of antibodies to *Cacipacoré* virus in a primate from the municipality of Aquidauana, together with a previous report of virus isolation on a farm in the State of Rondônia

(northern Brazil, bordering Bolivia)<sup>26</sup>, suggests that the State of Mato Grosso do Sul could enable the spread of this arbovirus because the BR-262 highway connects the Southeast region of Brazil to the Bolivian border.

Similar to the results of the present study, antibody titers for MAYV were detected in 150 primate sentinels from French Guiana. A high prevalence of antibodies to arboviruses was observed in humans in the same study<sup>27</sup>. Antibodies to MAYV were also found in *Callithrix argentata* primates, using the HI



test, during an investigation of outbreaks of *Mayaro* and yellow fever in Belterra, in the State of Pará, Brazil<sup>28</sup>. Similar results were also observed in a study of primates in the municipality of Bonito<sup>4</sup>.

MAYV can be transmitted by *Aedes aegypti*, which is the urban vector of dengue. Dengue is present in many Brazilian cities, including the municipalities surveyed, and there have been many cases of dengue in 2013, according to an epidemiological report of the State Department of Health<sup>29</sup>. MAYV might have been introduced into the urban areas near the study area by human travelers or by infected non-human primates that live in the forests around cities<sup>30</sup>. *Mayaro* virus was also detected in Venezuela, infecting the members of a family who exhibited clinical polyarthritis<sup>31</sup>.

The detection of antibodies to OROV in a primate sample from Passo da Lontra, in the municipality of Miranda, suggests the possible circulation of this virus in the region. Consequently, local people and tourists who maintain close contact with the natural environment could be susceptible to infection with OROV<sup>1</sup>. During a surveillance program of yellow fever and Oropouche in Minas Gerais, OROV was isolated in a liver sample from a primate of the genus *Callithrix*<sup>32</sup>, which is considered a new host for OROV in Brazil.

In contrast, the negative results for the primate captured in the City of Corumbá suggested that the virus did not circulate in that region or that the host was not exposed to any of the arboviruses studied. Another possible explanation for the negative result is the small number of animals captured<sup>4</sup>.

The positive results observed in the present study confirm the circulation of arboviruses in the wild, non-human primate populations of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The State of Mato Grosso do Sul borders Paraguay and Bolivia, where arboviruses have been detected in a variety of primate and arthropod species. These regions exhibit favorable conditions for the occurrence of outbreaks caused by arboviruses. Therefore, much larger studies of this nature, as well as efficient and continuous epidemiological surveillance programs, are needed to monitor viral activities in endemic or enzootic areas. The results of these epidemiological studies could facilitate the discovery of diseases that affect primates and that can be transmitted to humans, thereby helping to prevent outbreaks in human populations<sup>33</sup>.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul for the logistical support, equipment and consumables necessary for the execution of field work.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## FINANCIAL SUPPORT

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul.

## REFERENCES

1. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa APA, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos-da-Rosa ES. Arboviroses. In: Cimerman S, Cimerman B, editors. *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 363-386.
2. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa APA, Pinheiro FP, Travassos-da-Rosa JFS. Arboviroses. In: Focaccia R, editor. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 289-302.
3. Morse SS. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; 1:7-15.
4. Batista PM, Andreotti R, Chiang JO, Ferreira MSF, Vasconcelos PFC. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:168-173.
5. Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1326-1329.
6. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis* 1998; 4:149-158.
7. Torres LB, Araujo BHS, Castro PHG, Cabral FR, Marruaz KS, Araujo MS, et al. The use of new world primates for biomedical research: An overview of the last four decades. *Am J Primatol* 2010; 72:1055-1061.
8. Figueiredo LTM. Arboviroses emergentes no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:224-229.
9. Alho CJR. The Pantanal. In: Fraser LH, Keddy PA, editors. *The world's largest wetlands: ecology and conservation*. New York: Cambridge University Press; 2005. p. 203-271.
10. Alho CJR, Lacher TE, Gonçalves HC. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. *Bioscience* 1988; 38:164-171.
11. Silva JV, Abdon MM. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq Agrop Bras* 1988; 33:1703-1711.
12. Adámoli I. O pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito "Complexo Pantanal". In: *Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica*. Teresina, 1982. p. 109-119.
13. Aguiar LM, Ludwig G, Svoboda WK, Teixeira GM, Hilst CLS, Shiozawa MM, et al. Use of traps to capture Black and gold Howlers (*Alouatta caraya*) on the islands of the upper Paraná river, Southern Brazil. *Am J Primatol* 2007; 69:241-247.
14. Duque EF, Rotundo M. Field Methods for Capturing and Marking Azaraí Night Monkeys. *Int J Primatol* 2003; 24:1113-1120.
15. Santos FGA, Salas ER, Marques JCB, Marques CC, Farias EMP. Cloridrato de tiletamina associado com cloridrato de zolazepam na tranquilização e anestesia de calitriquideos (Mammalia, Primates). *Arq Bras Med Vet e Zootec* 1999; 51:539-545.
16. Ministério da Saúde. Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos. Secretaria de Vigilância em Saúde; Brasília; 2005.
17. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Hyg* 1958; 7: 561-573.
18. Shope RE. The use of a micro hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. In: *Anais de Microbiologia*, Rio de Janeiro, 1963. p. 167-171.

19. Casals J, Brown M. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J Exp Med* 1954; 99:429-449.
20. Travassos-da-Rosa APA, Travassos-da-Rosa ES, Travassos-da-Rosa JFS, Dégallier N, Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Cruz ACR. Os arbovirus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. Belém: Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde; 1994.
21. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:158-165.
22. Svoboda WK. Vigilância de epizootia em primatas não humanos como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de Interesse em Saúde Pública. [Doctors Thesis]. [Londrina]: Universidade Estadual de Londrina; 2007.
23. Tigor GH, Price HW. Antibody response in spider monkeys following single and double infections with group b arboviruses. *Am J Epidemiol* 1971; 94:386-396.
24. Vasconcelos PF. Yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:275-293.
25. Roig C, Rojas A, Guillén Y, Aria L, Mendonza L, Acosta ME, et al. Estudio de fiebre amarilla en primates em área de brote de los departamentos de San Pedro y Central de Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2009; 7:40-45.
26. Batista WC, Tavares GSB, Vieira DS, Honda ER, Pereira SS, Tada MS. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44:528-530.
27. Talarmin A, Chandler LJ, Kaznji M, Thoisy B, Debon F, Lelarge J, et al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification e seroprevalence. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:452-456.
28. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa JFS, Travassos-da-Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, Sá-Filho GC. Epidemiologia das encefalites por arbovirus na Amazônia brasileira. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:465-476.
29. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. *Boletim eletrônico epidemiológico* nº 35 de 2013.
30. Tesh RB, Watts DMM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clin Inf Dis* 1999; 28:67-73.
31. Torres JR, Russel KL, Vasques C, Barrera R, Tesh RB, Salas R, et al. Family cluster of Mayaro Fever, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1304-1306.
32. Nunes MRT, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo RSS, Travassos-da-Rosa APA, et al. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1610-1613.
33. Almeida MAB, Santos E, Cardoso JC, Fonseca DF, Torres MAN, Cardoso LL, et al. Vigilância da febre amarela e outras arboviroses através do monitoramento de primatas não humanos de vida livre no Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41 (suppl I): 173.



## 5. 2 Artigo 2 - Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(2):143-148, Mar-Apr, 2015  
http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0024-2015

Major Article

### Evaluation of arboviruses of public health interest in free-living non-human primates (*Alouatta* spp., *Callithrix* spp., *Sapajus* spp.) in Brazil

**Tatiana Carneiro da Rocha<sup>[1]</sup>, Paulo Mira Batista<sup>[2],[3]</sup>, Renato Andreotti<sup>[4]</sup>,  
Ana Caroline Dalla Bona<sup>[5]</sup>, Mário Antônio Navarro da Silva<sup>[5]</sup>, Rogério Lange<sup>[6]</sup>,  
Walfredo Kühl Svoboda<sup>[7]</sup> and Eliane Carneiro Gomes<sup>[1]</sup>**

[1]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. [2]. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Estadual do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. [3]. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. [4]. Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. [5]. Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. [6]. Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. [7]. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

#### ABSTRACT

**Introduction:** The aim of the present study was to evaluate the presence of arboviruses from the *Flavivirus* genus in asymptomatic free-living non-human primates (NHPs) living in close contact with humans and vectors in the States of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Methods:** NHP sera samples (total n = 80, *Alouatta* spp. n = 07, *Callithrix* spp. n = 29 and *Sapajus* spp. n = 44) were screened for the presence of viral genomes using reverse transcription polymerase chain reaction and 10% polyacrylamide gel electrophoresis techniques. **Results:** All of the samples were negative for the *Flavivirus* genome following the 10% polyacrylamide gel electrophoresis analysis. **Conclusions:** These negative results indicate that the analyzed animals were not infected with arboviruses from the *Flavivirus* genus and did not represent a risk for viral transmission through vectors during the period in which the samples were collected.

**Keywords:** Non-human primates. Arbovirus. RT-PCR. Zoonosis.

#### INTRODUCTION

The arbovirus life cycle is responsible for viral maintenance in the environment and represents a risk for human populations that live in close contact with wildlife, given that most arboviruses can cause zoonotic infections. Non-human primates (NHPs) are important wild hosts of arboviruses and can act as indicators of circulating viruses with public health significance<sup>(1) (2) (3)</sup>.

Most NHPs inhabit areas of tropical forests, and contact with humans constitutes a high risk of viral transmission through vectors. The risk of arbovirus transmission has increased recently due to several factors, including climate change, human population growth, unplanned urbanization, the construction

of new highways, ecotourism, rural tourism and fishing tourism<sup>(3) (4) (5) (6)</sup>. A number of these viruses carry a high epidemic risk, which could have negative social and economic impacts and pose a threat to public health<sup>(7) (8)</sup>.

The *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family) comprises some of the major arboviruses that are potentially pathogenic for humans worldwide<sup>(9)</sup>. These viruses can cause encephalitis, hemorrhage, liver disease and severe fever in vertebrate animals, including humans<sup>(10)</sup>. Indeed, the *Flavivirus* genus presents a serious public health threat in Brazil and throughout the world due to its wide geographical expansion, epidemic potential and high morbidity and mortality rates<sup>(11)</sup>.

According to the Brazilian Ministry of Health, this country registered more than two million dengue virus cases in 2013, which led to 213 deaths<sup>(12) (13)</sup>. Additionally, 324 cases of yellow fever, which led to 155 deaths, were recorded in the ten-year period from 2000-2010, with a high lethality rate of 48%<sup>(14)</sup>.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the presence of arbovirus genomes from the *Flavivirus* genus in sera samples from asymptomatic free-living NHPs inhabiting areas in close contact with humans and vectors in the States of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil.

**Corresponding author:** Dra. Tatiana Carneiro da Rocha. Laboratório de Saúde Pública e Saúde Ambiental/PPCF/UFPR. Av. Lothário Meissner 632, 80210-170 Curitiba, Paraná, Brasil.

**Phone:** 55 41 3360-4073; **Fax:** 55 41 3360-6726

**e-mail:** tcarneiro.rocha@gmail.com

**Received** 24 January 2015

**Accepted** 11 March 2015

## METHODS

### Study area

The present study was performed in six study areas located in four different municipalities of the States of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil (**Figure 1**). The first study area comprised a fragment of forest within the Porto Rico municipality, which is located between the Northwestern region of the State of Paraná and the Southeast region of the State of Mato Grosso do Sul, on the upper Paraná River in Brazil. This region consists of islands and sub-tropical forest reserves. The Porto Rico municipality is located in the Northwestern region of the State of Paraná (22°46'20"S, 53°16'01"W). This municipality is located in a region widely known for fishing tourism activities, in which visitors have close contact with animals, including free-living NHPs.

The second study area corresponded to *Bosque da Companhia de Energia Elétrica do Estado do Paraná* (25°25'57" S, 49°18'06" W), and the third study area included Barigui Park (25°25'37" S, 49°18'28" W). In both of these locations, the animals have close contact with vectors and humans, particularly in Barigui Park, where tourist activities attract many visitors every year. Both places are located in the City of Curitiba, the capital of the State of Paraná, which is located in the Eastern region of the state.

The fourth study area comprised a fragment of forest in the Pantanal region, which is a seasonal tropical wetland with an area of approximately 140,000km<sup>2</sup>. This area is considered to

be one of the largest freshwater ecosystems in the world. The Pantanal region is located within the Bodoquena municipality in the Southwest region of the State of Mato Grosso do Sul (20°32'19" S, 56°42'54" W).

The fifth study area comprised a forest fragment near the BR 163 highway (23°54'15" S, 54°18'9" W), which travels from Santarém, State of Pará, to Tenente Portela, State of Rio Grande do Sul. This locality is characterized as a rest place and a stop for truckers from all over the country, and because contact between humans and animals occurs here, it represents a high-risk interface for disease transmission. The sixth study area comprised a forest fragment where free-living NHPs had adapted to human contact, and very close contact was known to occur between species. Both the fifth and sixth study areas are located within the Mundo Novo municipality (23°56'16" S, 54°16'15" W), which is located in the Southwest region of State of Mato Grosso do Sul, where it borders the City of Guairá, State of Paraná, and the Paraguayan City of Salto del Guairá.

### Non-human primates

From November 2012 to January 2013, NHP blood samples from three different genera, including *Alouatta* (n = 07), *Callithrix* (n = 29) and *Sapajus* (n = 44), were collected and stored at -70°C until laboratory processing. The *Alouatta* (n = 07) and *Sapajus* (n = 19) NHPs were captured in the Porto Rico municipality and represented a native population of that area.

The *Callithrix* (n = 29) NHPs were captured in two locations in the City of Curitiba; 11 were captured from the *Bosque da*

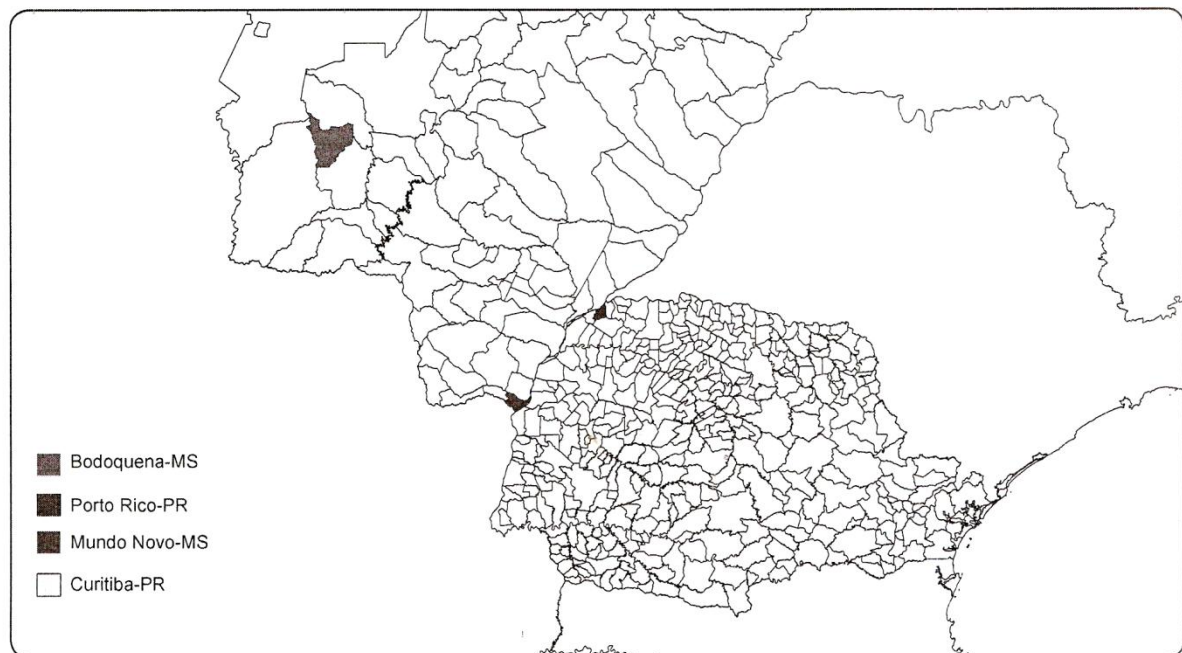


FIGURE 1 - The geographical locations of the four municipalities in the States of Paraná (PR) and Mato Grosso do Sul (MS), Brazil.



*Companhia de Energia Elétrica do Estado do Paraná*, and 18 were captured from Barigui Park.

Finally, 25 *Sapajus* NHPs were captured in the Bodoquena municipality (n = 3), as well as from forest areas of the Mundo Novo municipality (n = 22), both of which are located in the State of Mato Grosso do Sul.

#### Viral RNA extraction

Viral ribonucleic acid was extracted using the QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### Reverse transcription polymerase chain reaction

For the reverse transcription and complementary deoxyribonucleic acid reactions, 16.5µl of RNA and 1µl of Flav 200R primer (50pmol) were placed in a thermocycler at 70°C for 5 minutes. The samples were then removed from the thermocycler and placed in an ice bath. Subsequently, 5µl of 5x buffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>], 0.5µl of deoxyribonucleotide triphosphate (200mM) and 20U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase enzyme (Promega) were added. Finally, autoclaved Milli-Q water was added to achieve a final volume of 25µl. The final reaction was performed in a thermocycler at 42°C for 90 minutes followed by 70°C for 15 minutes.

The amplification reaction was prepared in a final volume of 25µl using 3µl of previously obtained cDNA, 2.5µl of 10x buffer [Tris-HCl 200mM (pH 8.4); KCl 500mM], 1µl of Flav 100F primer (20 pmol), 1µl of Flav 200R primer (20pmol), 1.5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.5µl de dNTPs (200mM) and 3U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The amplification protocol consisted of 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes. The primers have been described previously in the literature<sup>(15)</sup>. The same

procedure was used for the positive (yellow fever virus 17D vaccine strain) and negative (Milli-Q water) controls.

#### Electrophoresis

The amplicons were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis with molecular weight markers and positive and negative controls.

#### Ethical considerations

The use of animals in the present study was authorized by *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (IBAMA) under numbers 104/04, 23065-2/10, 29430-1/11 and the Ethics Committee for Animal Experimentation of the *Universidade de Londrina* (protocol number 34/05) and of the *Universidade Federal do Mato Grosso do Sul* (protocol number 462/12).

## RESULTS

All of the samples were negative for arbovirus genomes from the *Flavivirus* genus (Figure 2, Figure 3 and Figure 4). These results demonstrated that the analyzed NHP population did not exhibit *Flavivirus* infection during the period in which the samples were collected.

## DISCUSSION

Despite the fact that the free-living NHPs studied herein inhabited areas close to human populations, which could favor the transmission of arboviruses through vectors, the present study showed that there was no *Flavivirus* transmission risk during the period in which the samples were collected. From a sanitary point of view, these data are relevant<sup>(16)</sup>, particularly

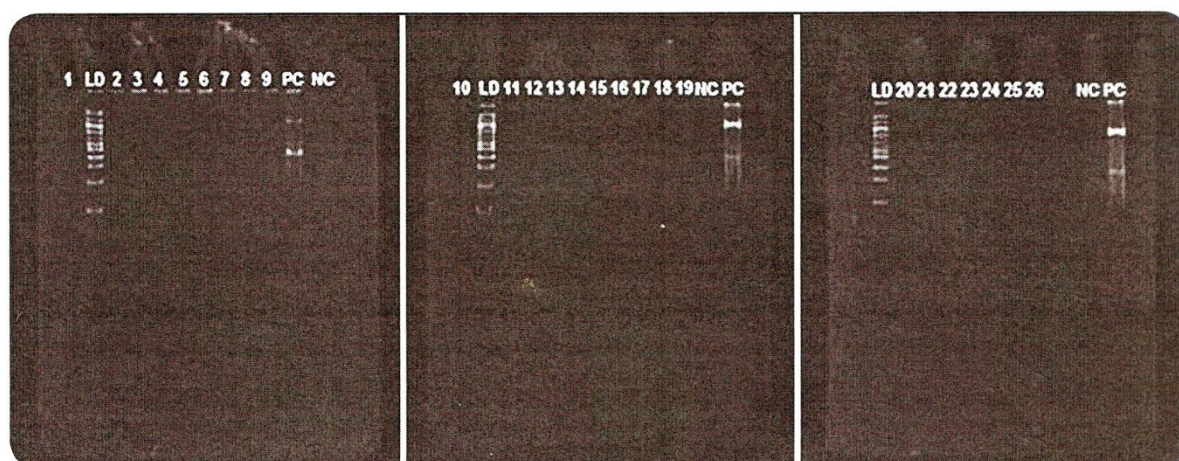


FIGURE 2 - The NHP samples (1-26) from Porto Rico municipality, State of Paraná, Brazil. NHP: non-human primate; LD (Ladder): 100 bp; NC: negative control; PC: positive control.



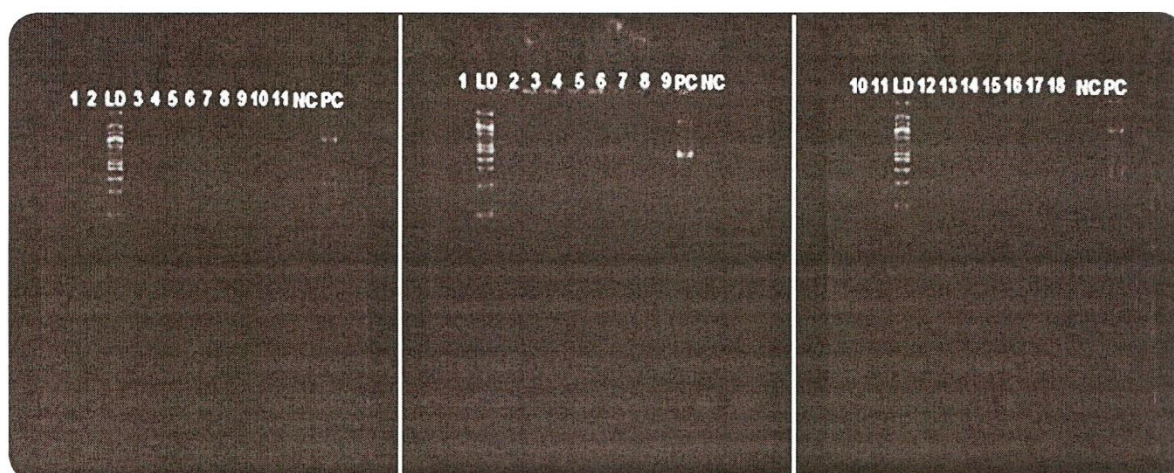


FIGURE 3 - The NHP samples (1-11) from *Bosque da Companhia de Energia Elétrica do Estado do Paraná*, Curitiba municipality, State of Paraná, Brazil. The NHP samples (1-18) from Barigui Park, Curitiba municipality, State of Paraná, Brazil. Note: NHP: non-human primate; LD (Ladder): 100 bp; NC: negative control; PC: positive control.

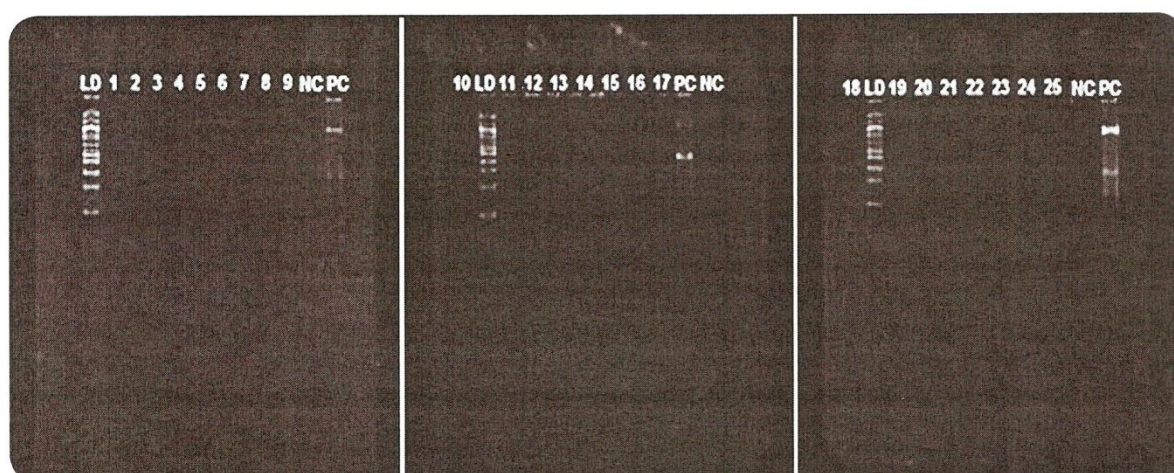


FIGURE 4 - The NHP samples (1-22) from Mundo Novo municipality, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The NHP samples (23-25) from Bodoquena municipality, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Note: NHP: non-human primate; LD (Ladder): 100 bp; NC: negative control; PC: positive control.

when considering that many free-living NHPs have been captured in parks and forest areas where tourism is popular.<sup>75</sup> Thus, these animals live in close contact with visitors and residents in these areas and carry the potential for high viral transmission risk.

To investigate arbovirus circulation in free-living NHPs, several studies have been conducted in Brazil, including studies in the States of Paraná and Mato Grosso do Sul. However, these wild animal studies had limitations because they mainly assessed the distribution of seropositive animals by detecting antibodies

and determining the exposure (or lack thereof) of the animals to the pathogens<sup>(17)</sup>.

In 2001, NHP deaths (*Alouatta guariba*) caused by the yellow fever virus were recorded in the State of Rio Grande do Sul<sup>(18)</sup>. From 2002 to 2007, during the active surveillance of yellow fever in the same State, 181 NHPs were captured in different regions. Antibodies against encephalitis virus (Saint Louis) and Oropouche virus were detected in 16 and 1 NHPs, respectively<sup>(19)</sup>. Of the 133 NHPs captured in a study conducted in the border region between the States of Paraná



and Mato Grosso do Sul, 21 were found to have Saint Louis encephalitis virus infections<sup>(2)</sup>, which suggested the involvement of these primates in the maintenance of this arbovirus in Southern Brazil<sup>(20)</sup>. Similarly, in the State of Mato Grosso do Sul, 65 NHPs were analyzed for the presence of antibodies against arboviruses (e.g., *Flavivirus* genus, Mayaro virus and Oropouche virus), and 18 animals showed positive test results<sup>(21)</sup>. In the same region, 16 NHP blood samples were examined, and five tested positive for antibodies against arboviruses, including *Flavivirus* (n = 3), Mayaro (n = 1) and Oropouche (n = 1)<sup>(22)</sup>.

Due to the re-emergence of arbovirus infection in different areas, studies aiming to identify these viruses in their vectors and wild hosts are essential for active surveillance. Moreover, these studies are important with regard to public health, as they can predict epidemics, thereby reducing the negative impacts that epidemics can have on the health of the population and on tourist activities<sup>(2) (11)</sup>.

Anthropogenic activities can have a direct influence on the environment, causing rapid changes that enable the emergence of pathogens and diseases. Therefore, continuous monitoring of the pathogens that affect NHPs is important, especially in environments that are close to urban areas. Indeed, this preventive measure can have a direct effect on public health and the conservation of primate species.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Marcio Nunes at the Evandro Chagas Institute and the Graduate Program of Pharmaceutical Sciences – Universidade Federal do Paraná.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## FINANCIAL SUPPORT

This study received support from the Coordination of Training of Higher Education Graduate Foundation [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)], Fundação Araucária and the Pharmaceutical Sciences graduate program – Universidade Federal do Paraná.

## REFERENCES

1. Kowalewski MM, Salzer JS, Deutsch JC, Raño M, Kuhlenschmidt MS, Gillespie TR. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *Am J Primatol* 2011; 73:75-83.
2. Svoboda WK. Vigilância de epizootias em primatas não-humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em saúde pública. 136 p. (Doctors Thesis). Universidade Estadual de Londrina; 2007 Londrina.
3. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing link? *Emerg Infect Dis* 1998; 4:149-158.
4. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:109-121.
5. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 951:13-24.
6. Vasconcelos PF, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cad Saude Publica* 2001; 17:155-164.
7. Blair CD, Adelman ZN, Olson K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:651-661.
8. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:224-229.
9. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* 2012; 55:289-295.
10. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley M, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1996. p. 961-1032.
11. Figueiredo LTM. The Brazilian Flaviviruses. *Microbes Infect* 2000; 2:1643-1649.
12. Ministério da Saúde. Casos de Dengue, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2014a). Online at: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/Casos-e-incid-dengue-ate-2013.pdf>.
13. Ministério da Saúde. Óbitos por febre hemorrágica da Dengue, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2013. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2014b). Online at: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/obitos-dengue-ate-2013.pdf>.
14. Ministério da Saúde. Casos de Febre Amarela, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2010. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2011). Online at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_1\\_fa2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_1_fa2010.pdf).
15. Maher-Sturgess SL, Forrester NL, Wayper PJ, Gould EA, Hall RA, Barnard RT, et al. Universal primers that amplify RNA from all three Flavivirus subgroups. *Virol J* 2008; 5:1-10.
16. Souza FM. Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos em localidades do sul do Brasil. 132 p. (Masters Thesis). Universidade Federal do Paraná; 2011 Curitiba.
17. Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1326-1329.
18. Torres MAN, Santos E, Almeida MAB, Cruz LL, Sperb AF. Vigilância da febre amarela silvestre no Rio Grande do Sul. In: *Boletim Epidemiológico da SESA-RS do Estado do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, 2003, vol 6.
19. Almeida MAB, Santos E, Cardoso JC, Fonseca DF, Torres MAN, Cardoso LL. Vigilância da Febre Amarela e outras arboviroses através do monitoramento de primatas não humanos de vida

- livre no Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41 (supl I):173.
20. Batista PM, Andreotti R, Chiang JO, Ferreira MS, Vasconcelos PF. Seroepidemiological monitoring in sentinela animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45:168-173.
  21. Batista PM. Arboviroses em primatas não humanos capturados em Mato Grosso do Sul. 89 p. (Masters Thesis). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2011 Campo Grande.
  22. Batista PM, Andreotti R, Almeida OS, Marques AC, Rodrigues SG, Chiang JO, et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.: *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46:684-686.

### 5. 3 Artigo 3 - Enviado para Journal of Environmental Analytical Chemistry

#### **Serosurvey of arbovirus in free-living Non-human Primates (*Cebus* spp.) in Brazil.**

Paulo Mira Batista<sup>1,2/+</sup>, Renato Andreotti<sup>3</sup>, Tatiana Carneiro da Rocha<sup>4</sup>, Eliane Carneiro Gomes<sup>4</sup>, Mário Antônio Navarro da Silva<sup>4</sup>, Walfrido Kühn Svoboda<sup>5</sup>, João Nascimento<sup>6</sup>, Sueli Guerreiro Rodrigues<sup>6</sup>, Jannifer Oliveira Chiang<sup>6</sup>, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>5</sup>Universidade Federal da Integração Latino Americana, Foz do Iguaçu, PR, Brasil

<sup>6</sup>Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Ananindeua, PA, Brasil

+ Corresponding author: paulomirabatista@gmail.com. Address: Avenida do Poeta, Bloco 7, Jardim Veraneio, Parque dos Poderes, 79.031-902, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

## ABSTRACT

This is a descriptive study of type survey in order to investigate the presence of arboviruses that could potentially cause outbreaks and epidemics and negatively affect public health, in free-living non-human primates (NHP) from municipalities of Mato Grosso do Sul. In the present study, was conducted seroepidemiological surveys in non-human primates captured in forests regions of the municipalities of Bodoquena (3), Coxim (8), Jardim (10) and Mundo Novo (22), on the border between Brazil and Paraguay and border with the state of Paraná. All samples used in this study were analyzed by hemagglutination inhibition test for detection of arbovirus antibodies and the samples from Mundo Novo and Bodoquena municipalities were analyzed by molecular biology technique for detection of *Flavivirus* genome. Mayaro virus antibodies were detected in samples of primates from municipality of Coxim (2) and the municipality of Jardim (1). Arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* was detected in primates captured in the municipality of Coxim (4) and Mundo Novo (22). Arbovirus belonging to the genus *Alphavirus* was detected in primates captured in the municipality of Jardim (1). All samples tested from Bodoquena and Mundo Novo municipalities (25) were negative for detection of *Flavivirus* genome. Results of this study have shown that animals were infected by the arbovirus belonging to the *Flavivirus* genus and to the *Alphavirus* genus, in addition to the virus Mayaro at some point in their lives, suggesting the arboviroses circulation in the regions studied. The negative results by the molecular biology technique indicated that animals were not infected at the time of collection. This kind of studies, using molecular biologic tests, shows the requirement of a continuous surveillance of the activities of arboviruses, identifying the transmission risk areas that human populations are exposed, preventing infections and avoiding negative impacts to public health.

Key words: public health - non-human primates - arbovirus infection - molecular biology

## INTRODUCTION

Arboviruses are classified according to their antigenic properties. Recently, they have been classified into the following five families, based on their physicochemical characteristics: *Bunyaviridae*; *Flaviviridae*; *Reoviridae*; *Rhabdoviridae* and *Togaviridae*<sup>1</sup>. All viruses of the families exhibit a genome composed of ribonucleic acid (RNA), which may or may not be segmented<sup>2</sup>.

Viruses belonging to the family *Flaviviridae* and the genus *Flavivirus* are the most relevant for public health. This genus is composed of approximately 70 viruses, which exhibit cross-reactivity. The Yellow Fever Virus (YFV), the Dengue Virus (DENV), the Japanese Encephalitis Virus (JEV) and the Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV) are the most common arboviruses that affect humans worldwide<sup>3</sup>. These viruses can cause fever, encephalitis, hemorrhages and liver disease among vertebrates and present high morbidity and mortality rates<sup>4</sup>.

Most of the arboviruses in Brazil are found in the Amazon region and are maintained in nature through wild zoonotic cycles, which involve haematophagous vectors and wild host reservoirs<sup>1</sup>. Humans who live in close contact with the wild environment, where the ecological niche of arboviruses can be found, are more commonly infected<sup>5</sup>.

Interestingly, the interface of tropical forests, which involves wide biodiversity, farming communities, high human population density, domestic animals and agriculture, has been associated with the increase of arbovirus transmission in several areas (e.g. the Amazon region)<sup>6</sup>. In general, free-living NHP are found in several natural habitats and share similar physiological and genetic characteristics with humans. Therefore, they are susceptible to several common pathogens and are considered important wild hosts of arboviruses. These animals can act as models for studies on the dynamics of the natural transmission of pathogens, serving as sentinels for the surveillance of emerging viruses<sup>7</sup>. Furthermore, the presence of high titers of antibodies and persistent viremia, sufficient to infect vector species, is one of the most important factors to determine the effectiveness of an animal as a reservoir, host and disseminator of arboviruses<sup>8</sup>.

Recently, due to the expansion of ecotourism and the invasion of forests, the interaction between NHP and humans has increased, leading to an increase in the risk of transmission of the virus by vectors<sup>7</sup>. Other factors such as ecological changes

resulting from economic development, agriculture, population growth, international travel, trade of wild animals, microbial adaptation and the inefficiency of disease control programs could also contribute to the increase in the transmission of these emergent viruses<sup>2</sup>.

Emerging arboviruses could potentially cause significant disease and greatly impact public health services. Surveillance of these arboviruses could enable the early detection of cases and the prevention of large outbreaks. Laboratory tests to diagnose these infections are of great importance given that the diagnosis based on clinical evidence is not easy, especially during the initial phase of the disease when the symptoms are non-specific<sup>8</sup>.

The aim of the present study was to investigate the presence of arboviruses in asymptomatic NHP living in the municipalities of Bodoquena, Coxim and Jardim in the municipality of Mundo Novo, on the borders with the state of Paraná and Paraguay, both in the state of Mato Grosso do Sul. In addition, the epidemiological consequences of this study were discussed, providing important data that could lead to better prevention and control of these zoonoses.

## MATERIALS AND METHODS

*Study area* - The present study was conducted during November 2012 in two locations of the municipality of Mundo Novo, during October 2013 in the municipality of Bodoquena and Jardim and during April 2014 in the municipalities of Coxim, Both in the state of Mato Grosso do Sul (Figure 1).

The municipality of Mundo Novo is located in the southern Midwest region of Brazil, specifically in the Southwest of the state of Mato Grosso do Sul, close to the border towns of Guaíra (state of Paraná) and Salto del Guairá (Paraguay). The former area is a fragment of forest near the BR 163 highway (23°54'15.7"S and 54°18'9.4"W). This highway links the municipality of Santarém (state of Pará) to Tenente Portela (state of Rio Grande do Sul). Truckers from many locations use this highway and may come into contact with animals and increase the risk of viral transmission. The latter site is situated in a fragment of forest in the center of Mundo Novo (23°56'16.3"S and 54°17'8.9"W), where free-living NHP are adapted to living in close contact with humans (Figure 1). In the municipality of Mundo Novo, there is a predominance of the *Cerrado* ecosystem, which is characterized by low, sloping and twisted trees. The *Cerrado* has well-defined climatic seasons: a rainy season during the summer (from October to April) and a dry season in the winter (from June to August).

The Bodoquena municipality is located in the Southwest region of the State of Mato Grosso do Sul (20°32'19" S, 56°42'54" W) within the Pantanal region, which is a seasonal tropical wetland with an area of approximately 140,000km<sup>2</sup>. This area is considered to be one of the largest freshwater ecosystems in the world.

Jardim municipality is located in the southwest of the state (21°28'49"S and 56°08'17"W). It has a territorial extension of 2,207.6km<sup>2</sup>, with a humid subtropical climate and temperatures of 15-39°C.

The fourth study area comprised a fragment of forest in the Coxim municipality. It is located in the North of Mato Grosso do Sul (18°30'25"S and 54°45'36"W) and at the confluence of the Coxim and Taquarí rivers. Its economy is based on tourism, fishing and animal husbandry.



Figura 1 - Map of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil , with the municipalities of Bodoquena, Coxim, Jardim e Mundo Novo highlighted (study area).



*Sample collection* - Blood samples (43) were collected from free-living NHP (*Sapajus* spp.). The animals were captured using Tomahawk traps<sup>9</sup>. They were anesthetized (chlorhydrate tiletamine plus zolazepam)<sup>10</sup> and the intramuscular dose was adjusted based on the weight of the animal. The blood samples were frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -70 °C until processing. All procedures were performed by a team of biologists and veterinarians, and were authorized by the *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (IBAMA) under protocol number 21808-1.

*Serological test* - Serum samples were analyzed in the Hemagglutination Inhibition Test (HIT), using a panel containing 19 different arboviruses, distributed as follows: *Alphavirus* (WDDD, VWEЕ, VMAY and Mucambo virus), *Flavivirus* (VFA, Ilheus virus, SLEV, Cacipacoré virus VROC and Bussuquara virus), *Orthobunyavirus* (Guaroа virus, Maguari virus, Tacaiuma virus, Utinga virus, Bethlehem virus, Caraparu virus, VORO and Catu virus) and *Phlebovirus* (Icoaraci virus). The HIT used herein was standardized in the section of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers

(SAARB) of the *Instituto Evandro Chagas* (IEC)<sup>11</sup>, according to the protocol adapted for micro-plates<sup>12</sup>.

*RT-PCR* - The samples from Mundo Novo and Bodoquena municipalities were analyzed through RT-PCR in order to identify the arboviruses. A protocol previously described, with some modifications, was followed<sup>13</sup>. In particular, the primers were replaced by degenerated primers for the *Flavivirus* genus (FG1 and FG2), which amplify the NS5 genomic region<sup>14</sup>.

The viral RNA was extracted using a commercial kit (QIAmp Viral Mini kit, Qiagen, USA), following the manufacturer's instructions. The reverse transcription to obtain the cDNA was conducted using 2000 ng of viral RNA and 1 µL of primer (FG1), before placing the material in a thermocycler for 5 min at 70 °C. Subsequently, 5 µL of 5x buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3); KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM], 0.5 µL of dNTPs and 20 U of AMV reverse transcriptase enzyme (Promega, USA) were added. Finally, samples were put in a thermocycler for 90 min at 42 °C and for 15 min at 70 °C.

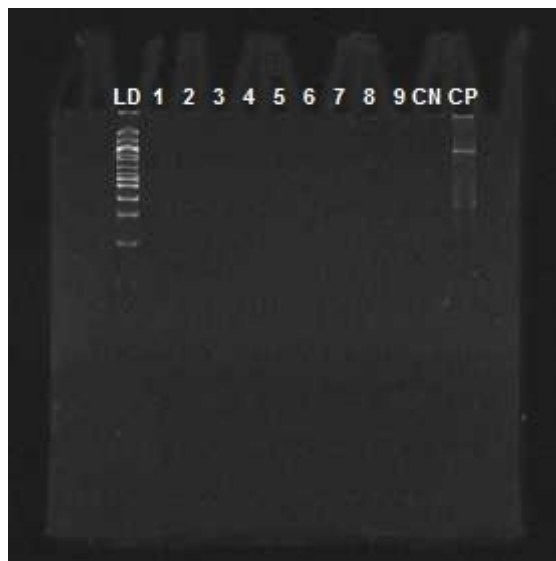
The amplification reaction was conducted using 3 µl of cDNA, 2.5 µl of 10x buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4); 500 mM KCl], 1 µl of each primer (FG1 and FG2), 1.5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl of dNTPs and 3 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA). Finally, the samples were amplified in a thermocycler for 35 cycles: 30 sec at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C. A positive (Yellow Fever virus, 17D strain) and negative control were used in all reactions.

The amplicons were subjected to electrophoresis, using a horizontal polyacrylamide gel (10%), and then visualized under an ultraviolet light device. All molecular biology tests were carried out in partnership with the Laboratory of Medical and Veterinary Entomology - Department of Biological Sciences, *Universidade Federal do Paraná*.

## RESULTS

Figures 2, 3 and 4 showed that none of the samples exhibited typical bands related to the *Flavivirus* in the electrophoresis with 10% polyacrylamide gel. Therefore, these samples were considered negative for the presence of arboviruses of this genus.

Figura 2- Amostras (1-9) de PNH provenientes do município de Mundo Novo, Mato Grosso do Sul



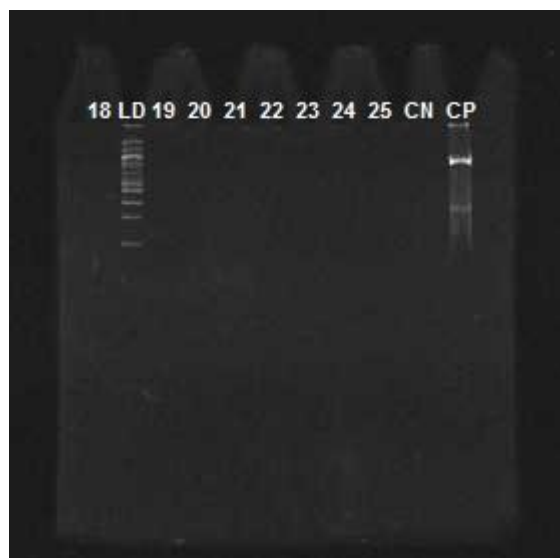
Nota: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

Figura 3- Amostras (10-17) de PNH provenientes do município de Mundo Novo, Mato Grosso do Sul



Nota: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

Figura 4- Amostras (10-17) de PNH provenientes dos municípios de Mundo Novo e Bodoquena, Mato Grosso do Sul



Nota: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

In all of the free-living NHP assessed from Mundo Novo (22), antibodies against viruses belonging to the genus *Flavivirus* were detected, with antibody titers ranging from 20 to 40.

Of the 8 non-humans primates assessed from Coxim municipality, four (50%) exhibited antibodies to viruses belonging to the genus *Flavivirus* (titers from 20 to 640) and two (25%) exhibited a monotypic reaction to Mayaro virus (titers 80 to 160). Of the 10 non-humans primates assessed from Jardim municipality, one (10%) exhibited antibodies to viruses belonging to the genus *Alphavirus* (titer 320), one (10%) exhibited a monotypic reaction to Mayaro virus (titer 160 ) (Table 1).

Table 1 – Arbovirus identified in samples from forty-three non-human primates by capturing municipality, Mato Grosso do Sul, Brazil.

| Arbovírus         | Location of captur |    |                |    |                      |     |                    |   |
|-------------------|--------------------|----|----------------|----|----------------------|-----|--------------------|---|
|                   | Jardim<br>(n=10)   |    | Coxim<br>(n=8) |    | Mundo Novo<br>(n=22) |     | Bodoquena<br>(n=3) |   |
|                   | Nº                 | %  | Nº             | %  | Nº                   | %   | Nº                 | % |
| <i>Flavivirus</i> | -                  | -  | 4              | 50 | 22                   | 100 | -                  | - |
| <i>Alphavirus</i> | 1                  | 10 | -              | -  | -                    | -   | -                  | - |
| Mayaro            | 1                  | 10 | 2              | 25 | -                    | -   | -                  | - |
| Total             | 2                  | 20 | 6              | 75 | 22                   | 100 | -                  | - |

## DISCUSSION

The presence of antibodies against *Flavivirus* and *Alphavirus* indicates the circulation of these viruses among the wild NHP investigated herein<sup>14</sup>. This result demonstrates a cross-reaction between the viruses belonging to the genus *Flavivirus* and *Alphavirus*, although it was difficult to identify the virus species and the precise time of infection.

In these studies, the detection of antibodies against *Flavivirus*, *Alphavirus* and *Mayaro* virus in sentinel animals could indicate virus circulation. For example, antibodies against arboviruses have been detected in Spider monkeys (*Ateles geoffroyi*)<sup>15</sup> and in *Callithrix argentata*<sup>16</sup>. Similar findings were reported in a sero-epidemiological survey with 150 sentinel primates in French Guiana, indicating that this species of primate was the main amplifying host of MAYV during an outbreak in that country<sup>17</sup>, and a sero-epidemiological survey primates in the state of Mato Grosso do Sul. These studies confirmed the circulation of the following arboviruses: Mayaro (MAY); Oropouche (ORO); Cacipacoré and other *Flavivirus*<sup>18,19</sup>.

Epidemiological studies conducted in other regions of Brazil suggest the involvement of free-living NHP in the maintenance of viruses in nature. Indeed, an investigation with 133 NHP, carried out from June 2004 to December 2005 on the border between of the states of Paraná and Mato Grosso do Sul, reported the presence of 21 animals that were positive for SLEV, an agent of neurological diseases in humans<sup>20</sup>. A similar study was carried out in Northern Argentina, where four samples were positive for SLEV<sup>21</sup>. In addition, during active surveillance of YFV in the state of Rio Grande do Sul, 181 NHP were analyzed and antibodies against OROV virus and SLEV were detected in one and 16 animals, respectively<sup>22</sup>.

Curiously, an animal in Canada (*Macaca sylvanus*) which exhibited clinical neurological signs was positive for West Nile Virus (WNV) in the RT-PCR, HIT, virus isolation and immunohistochemistry. This case was diagnosed during the same period in which an epidemic of encephalitis and meningitis occurred in Canada. In the same area, out of another 33 NHP tested, three were positive for WNV in the HIT and two of these three were also positive in the serum neutralization (SN) technique<sup>23</sup>.

It is known that the occurrence of arboviruses in humans is associated with its occurrence in NHP. Therefore, since 1999, new measures of virus surveillance

have been adopted in Brazil. For example, during the re-emergence of YFV between the years 2007-2009, 1,971 cases of the disease were reported, with 209 confirmed cases of YF in NHP in 19 states of the country<sup>24</sup>. After the occurrence of two fatal human cases of YF in the state of São Paulo in the same period, 108 samples of NHP were analyzed, resulting in four positive animals in the virus isolation and RT-PCR<sup>25</sup>.

Although the HIT is frequently used in serological surveys because it can detect antibodies for a long period after the natural infection, it is common to observe the occurrence of cross-reactivity with related viruses<sup>1</sup>. The positivity in this test indicates the exposure of the host to a number of arboviruses and the production of antibodies against them<sup>26</sup>. Therefore, it is a good method of detecting antibodies in animals caught in their natural habitat<sup>27</sup>.

A study was conducted in Mato Grosso do Sul to detect arboviruses using the HIT test and serum-reduction by neutralization in plate (SRNP). The results suggest that horses can serve as sentinel animals to indicate the circulation of arboviruses. In this study, animals were positive for SLEV, the Ilheus virus (ILHV) and the Rocio virus (ROCV)<sup>28</sup>. Other serological surveys conducted in the same area (the Pantanal in Mato Grosso do Sul) used SN and found three animals positive for Cacipacoré virus, five for WNV, nine for SLEV and 18 for ILHV<sup>29</sup>, thereby demonstrating the virus circulation in this area<sup>30</sup>.

The negative results in the viral isolation and RT-PCR indicate that recent infections in NHP had not been observed during the study period.

The detection of viral genomes by RT-PCR could confirm the presence of the virus in the animal at the time of collection. This finding would provide evidence of the enzootic activity of the arbovirus in that area, as well as the risk of transmission to humans. However, based on the negativity in the RT-PCR and the positivity in the HIT of 22 animals, the municipality of Mundo Novo can be considered as an area of silent activity for *Flavivirus*. Similar findings have been reported in another study conducted in the Nhecolândia region (Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil). In this study, 135 horses were tested by viral isolation, RT-PCR and SN, exhibiting positive results in the HIT and negative results in the RT-PCR. However, in the same area a high positivity was observed for the Eastern (VEEL) and Western Equine Encephalitis (VEEW) viruses in the SN, demonstrating that the sub-region of the Pantanal is an important silent area for these arboviruses<sup>31</sup>.



From December 2003 to June 2004, in a study performed in Colombia, the viral genome YFV was detected by RT-PCR in liver samples of NHP. The results confirmed the presence of the virus at the time of collection of dead animals, representing a risk of transmission to humans<sup>32</sup>.

Sero-epidemiological studies of wild animals conducted through cross-sectional surveys can indicate whether the host was exposed to the antigen and can be considered a sentinel for the active surveillance of arboviruses of public health interest. In general, animal infection precedes human infection. Therefore, these data could be useful in terms of preventing the occurrence of epidemics and reducing the negative impacts on health, tourism and trade in the regions affected<sup>33,20</sup>.

In conclusion, although all samples were negative in the RT-PCR, the positive serological results suggest that arboviruses of the genus *Flavivirus* are present in the region studied. Further studies to monitor viral activity are essential in order to prevent infection in humans, especially considering those locations exhibits favorable conditions for the occurrence of arbovirus outbreaks. These studies will be of great importance, especially for public health policies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to the *Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul* for its logistic support and for the material provided and to the FUNDECT and CAPES for its financial supports.

## REFERENCES

1. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa APA, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos-da-Rosa ES (2003) Arboviroses. Cimerman & Cimerman Atheneu.
2. Morse, SS (1995) Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Disease* 1: 7-15.
3. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.
4. Monath TP, Heinz FX (1996) Flaviviruses. Lippincott & Raven CRC Press.
5. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa APA, Pinheiro FP, Travassos-da-Rosa JFS (2005). Arboviroses. Focaccia Atheneu.
6. Gubler DJ (2001) Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 951: 13-24.
7. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, et al. (1998) Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. *Emerging Infectious Disease* 4: 149-58.
8. Calisher C (1994) Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clinical Microbiol* 7: 89-116.
9. Aguiar LM, Ludwig G, Svoboda WK, Teixeira GM, Hilst CLS, et al. (2007) Use of traps to capture Black and gold Howlers (*Alouatta caraya*) on the islands of the upper Paraná river, Southern Brazil. *American Journal of Primatology* 69: 241-247.

10. Santos FGA, Salas ER, Marques JCB, Marques CC, Farias EMP (1999) Cloridrato de tiletamina associado com cloridrato de zolazepam na tranquilização e anestesia de calitriquídeos (Mammalia, Primates). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51: 539-545.
11. Clarke DH, Casals J (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *American Journal of Tropical Hygiene* 7: 561-573.
12. Shope RE (1963) The use of a micro hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Annals of Microbiology* 1: 167-171.
13. Bona ACD, Twerdochlid AL, Navarro-Silva MA (2012) Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in state of Paraná, Brazil based on a fragment of the capsid/premembrane junction. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45: 297-300.
14. Cruz AC, Prazeres AS, Gama EC, Lima MF, Azevedo RS, et al. (2009) Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. *Caderno de Saude Publica* 25: 2517-2523.
15. Tigor GH, Price HW (1971) Antibody response in spider monkeys following single and double infections with group b arboviruses. *American Journal of Epidemiology* 94: 386-396.
16. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa JFS, Travassos-da-Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, et al. (1991) Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33: 465-476.
17. Talarmin A, Chandler LJ, Kaznji M, Thoisy B, Debon F, et al. (1998) Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification e seroprevalence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 452-456.

18. Batista PM, Andreotti R, Chiang JO, Ferreira MSF, Vasconcelos PFC (2012) Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45: 168-173.
19. Batista PM, Andreotti R, Almeida PS, Marques AC, Rodrigues SG, et al. (2013) Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46: 684-690.
20. Svoboda WK, Martins LC, Molanski LS, Shiozawa MM, Spohr KAH, et al. (2014) Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 47: 280-286.
21. Bonttinelli O, Paz V, Enria D, Marta S, Gustavo S, et al (2002) Infecciones por flavivirus y alphavirus em monos *Alouatta caraya* del Nordeste Argentino, año 2001. Epub.
22. Almeida MAB, Santos E, Cardoso JC, Fonseca DF, Torres MAN, et al (2008) Vigilância da febre amarela e outras arboviroses através do monitoramento de primatas não humanos de vida livre no Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 173.
23. Olberg RA, Barker IK, Craeshaw GJ, Bertelsen MF, Drebot MA, et al. (2004) West Nile Virus Encephalitis in a Barbary Macaque (*Macaca sylvanus*). *Emerging Infectious Disease* 10: 712-714.
24. Araujo FAA, Ramos DG, Santos AL, Passos PHO, Elkhoury ANSM, et al. (2011) Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 20: 527-536.

25. Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, et al. (2011) Reemergence of Yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44: 290-296.
26. Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M (2003) Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerging Infectious Disease* 9: 1326-1329.
27. Casals J, Brown M (1954) Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *The Journal of Experimental Medicine* 99: 429-449.
28. Rodrigues GR, Nunes MRT, Casseb SMM, Prazeres ASC, Rodrigues DSG, et al. (2010) Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *Journal of General Virology* 91: 2420-2427.
29. Corrêa AP, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Lima DC, et al (2011) Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 467-474.
30. Melandri V, Guimarães AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, et al (2012) Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 1073-1075.
31. Corrêa AP, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, et al (2010) Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105: 829-833.
32. Méndez JA, Parra E, Neira M, Rey GJ (2007) Detección por reacción en cadena de La polimerasa de transcriptasa inversa Del virus de la fiebre amarilla en monos silvestres: una herramienta sensible para la vigilancia epidemiológica. *Biomedical* 27: 51-60.

33. Figueiredo LTM (2007) Arboviroses emergentes no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 224-229.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Magnitude e importância dos arbovírus

Os arbovírus no Brasil podem causar surtos, epidemias e grande impacto na saúde pública, além de serem considerados endêmicos em algumas regiões do país. As síndromes clínicas causadas pelos arbovírus variam de acordo com a família, gênero e espécie infectante, que possuem características antigênicas e físicas químicas semelhantes, e são caracterizadas por quadros de doença febril agudo inespecífica, cefaléias e artralgias severas, como ocorre com o vírus Chikungunya, vírus Mayaro e o vírus Oropouche, febre exantemáticas e/ou hemorrágicas, como no caso do vírus da Dengue e da febre amarela. Outras espécies de arbovírus causam quadros de encefalites assépticas e meningites, como no caso do vírus da encefalite de Saint Louis, vírus do Nilo Ocidental e outros vírus pertencentes ao mesmo gênero.

A grande maioria dos arbovírus é transmitido em regiões silvestres e nesse ambiente a propagação do vírus ocorre num ciclo de transmissão entre animais e mosquitos, onde os vertebrados e insetos vetores são considerados hospedeiros, reservatórios amplificadores e disseminadores viral. O homem se torna susceptível quando entra em contato com o ciclo de transmissão da doença e pode se tornar reservatório quando está em fase virêmica, transmitindo o vírus para vetores potenciais.

Vários fatores são responsáveis pela disseminação dos arbovírus, tais como, os relacionados ao aumento da atividade turística nas localidades onde os vírus circulam, os relacionados com as alterações ambientais e mudanças climáticas produzidas pelo homem, além de deslocamentos de hospedeiros infectados de regiões com circulação de arbovírus para regiões urbanizadas.

### 6.2 Inquéritos sorológicos em animais sentinela

Os primatas não humanos são considerados os principais vertebrados responsáveis pela disseminação de arbovírus em regiões de matas. Esses animais são infectados, produzem viremia e anticorpos contra o vírus infectante, podem adoecer e morrer por arboviroses. Como esses animais participam de *habitats* com

uma grande diversidade biológica e do ciclo de transmissão de diversas zoonoses, sendo considerados sentinelas naturais para vigilância, serviram como modelo de estudo para esta pesquisa.

As pesquisas em arbovirologia envolve estudos em virologia, entomologia, sorologia, ecologia e zoologia e se propõem a descobrir medidas para impedir a disseminação destes agentes patogênicos entre populações sensíveis. A realização de inquéritos sorológicos em animais sentinelas para detecção de arbovírus, como parte da pesquisa em ecologia, envolve o conhecimento dos hospedeiros naturais e pode definir os locais com ciclos prováveis de transmissão. Este modelo de estudo ocorre em outras regiões do Brasil, nas Américas e em outras partes do mundo e pode ser realizado utilizando outras espécies de animais sentinelas, como os equinos.

### **6.3 Detecção de soropositividade e de títulos de anticorpos em animais sentinela**

O diagnóstico laboratorial é de extrema importância para confirmar o agente causador da doença em regiões onde circulam várias espécies de arbovírus, principalmente pelos sinais clínicos inespecíficos causados por eles. A vigilância laboratorial também é utilizada para monitoramento das arboviroses e detecção de vírus em determinadas regiões. No presente estudo, foram utilizados as técnicas de diagnóstico sorológicas de Inibição de hemaglutinação, técnicas virológicas de isolamento viral e técnicas de biologia molecular para detecção da circulação de arbovírus em regiões de importância epidemiológica, como os municípios de Aquidauana, Coxim e Miranda, pela importância das atividades de pesca, Bodoquena e Jardim, pela importância no turismo ecológico, Campo Grande, pelo importante número de casos de viroses inespecíficas, além do município de Mundo Novo, que faz fronteira com o Paraguai e divisa com o estado do Paraná, e o município de Corumbá, que faz fronteira com a Bolívia.

Durante a pesquisa foram detectados anticorpos inibidores de hemaglutinação para o vírus Mayaro em amostras de primatas do município de Coxim e Jardim, anticorpos para o vírus Cacipacoré do município de Aquidauana e para o vírus Oropouche do município de Miranda, evidenciando, mediante imunidade

específica, a circulação desses vírus nas áreas de estudo. Os resultados positivos na técnica sorológica utilizada é um indicador da circulação de arbovírus.

Foram detectados anticorpos pertencentes ao gênero *Flavivirus* em primatas capturados no município de Coxim, Campo Grande, Jardim, Mundo Novo e vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* no município de Jardim, não sendo possível determinar a espécie de vírus nem quando os animais foram infectados, por ser uma técnica que detecta anticorpos totais por um longo período. Na sorologia por inibição de hemaglutinação é comum observar reação cruzada entre os vírus pertencentes aos mesmos gêneros, apesar de ser uma técnica sensível, precisa e bastante utilizada em inquéritos sorológicos em ambientes naturais.

#### **6.4 Detecção do genoma viral em animais sentinelas**

Apesar de todas as amostras testadas dos município de Mundo Novo forem negativas para detecção do genoma de *Flavivirus*, elas foram positivas na detecção de anticorpos para *Flavivirus* pela técnica sorológica. Isso indica que durante a coleta das amostras em Mundo Novo não havia infecção recente nos animais, mas indica que as regiões estudadas do município de Mundo Novo são áreas para detecção de atividade de *Flavivirus* no Brasil. Esse tipo de resultado foi semelhante ao encontrado na região do Pantanal em outro estudo realizado utilizando outras espécies de animais.

## 7 CONCLUSÃO

Estudos soro-epidemiológicos dessa natureza, envolvendo investigação em animais sentinela de vida livre, conduzidos através de inquéritos transversais, indicam que o hospedeiro foi exposto ao antígeno e é considerado um método de vigilância ativa para pesquisa de arbovírus de interesse da saúde pública, indicando a presença de arbovírus em localidades de importância epidemiológica e sugerindo o envolvimento dos primatas não humanos na manutenção do vírus na natureza, uma vez que a ocorrência de arbovírus em humanos está associada com a sua ocorrência nesses animais. Portanto, é um bom método de detecção de anticorpos nos animais capturados no seu *habitat* natural

A presença de anticorpos contra vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* e ao gênero *Flavivirus*, além da presença de anticorpos específicos contra o vírus Cacipacoré, Mayaro e Oropouche nos animais investigados, indica a circulação desses vírus entre os primatas não humanos de vida livre nas localidades estudadas e o risco em que a população humana que entra em contato com o ciclo de transmissão silvestre está sendo exposta.

Apesar dos resultados dos testes sorológicos indicarem reação cruzada entre *Flavivirus* e *Alphavirus*, não foi possível identificar as espécies de vírus pertencentes a estes gêneros e o tempo preciso da infecção dos animais, pois a técnica de diagnóstico sorológico utilizada nesse estudo detecta anticorpos totais por um longo período.

Os resultados negativos no isolamento viral e RT-PCR indicam que não haviam infecções recentes nos animais durante o período do estudo, apesar da positividade para *Flavivirus* no teste de inibição de hemaglutinação dos 22 animais do município de Mundo Novo. Este achado proporciona evidência da atividade enzoótica de arbovírus nessa área, assim como o risco de transmissão para os seres humanos.

As arboviroses representam um relevante problema para a saúde pública do do Mato Grosso do Sul, assim como em outras regiões do Brasil, quando consideramos a ocorrência de vetores potenciais de arbovírus no Estado, a evidência da circulação de arbovírus causadores de surtos e epidemias nos animais capturados dos municípios estudados e as notificações de casos de doença febril

aguda inespecífica, casos de meningites, casos de paralisia flácida aguda, casos de febre amarela e dengue, por ano, sem diagnóstico laboratorial conclusivo.

Esse tipo de pesquisa, utilizando técnicas de diagnóstico sorológico, virológico e de detecção de genoma, é necessário para evidenciar a magnitude do problema, intensificar e aprimorar as ações de vigilância das arboviroses com a finalidade de detectar precocemente a circulação viral antes incidir em seres humanos, evitando impactos negativos para a saúde pública, e para caracterizar a importância destes animais nos ciclos de transmissão das doenças.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M.; LUDWIG, G.; SVOBODA, W. K.; TEIXEIRA, G. M.; HILST, C. L. S.; SHIOZAWA, M. M.; MALANSKI, L. S.; MELLO, A. M.; NAVARRO, I. T.; PASSADOS, F. C. Use of traps to capture Black and gold Howlers (*Alouatta caraya*) on the islands of the upper Paraná river, Southern Brazil. **American Journal of Primatology**, v. 69, n. 2, p. 241-247, Feb. 2007
- AGUILAR, P. V.; GREENE, I. P.; COFFEY, L. L.; MEDINA, G.; MONCAYO, A. C.; ANISHCHENKO, M.; LUDWIG, G. V.; TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; LEE, J.; TESH, R. B.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.; HICE, C.; YANOVIK, S.; MORRISON, A. C.; KLEIN, T. A.; DOHM, D. J.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GUEVARA, V.; KOCHER, T.; OLSON, J.; CABEZAS, C. WEAVER, S. C. Endemic Venezuelan Equine encephalitis in Northern Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 880-888, May 2004.
- ALBUQUERQUE, I. G. C.; MARADINO, R.; MENDONÇA, A. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUERRA, L. R. G.; BRANDÃO, B. C.; MENDONÇA, A. P. P.; AGUIAR, G. R.; DE BACCO, P. A. M. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128-129, Jan./Feb. 2012.
- ALHO, C. J. R. The Pantanal. In: FRASER, L. H.; KENDDY, P. A.; (EDs.). **The world's largest wetlands: ecology and conservation**. New York: Cambridge University Press; 2005. p. 203-271.
- ALHO, C. J. R.; LACHER, T. E.; GONÇALVES, H. C. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. **Bioscience**, 38, n. 3, p. 164-171, Mar. 1988.
- 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**, 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: an 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.
- ARAÚJO, F. A. A.; RAMOS, D. G.; SANTOS, A. L.; PASSOS, P. H. O.; ELKHOURY, A. N. S. M.; COSTA, Z. G. A.; LEAL, S. G.; ROMANO, A. P. M. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 527-536, dez. 2011

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 virus, brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830-1832, Nov. 2009.

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**, v. 21, n. 3, p. 308-313, June 2009.

BATISTA, P. M.; ANDREOTTI, R.; ALMEIDA, P. S.; MARQUES, A. C.; RODRIGUES S. G.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684-690, Nov./Dec. 2013.

BATISTA, P. M.; ANDREOTTI, R.; CHIANG, J. O.; FERREIRA, M. S. F.; VASCONCELOS, P. F. C. Seroepidemiological monitoring in sentinela animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p.168-173, 2012.

BATISTA, P. M. **Arboviroses em primatas não humanos capturados em Mato Grosso do Sul**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande, 2011.

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.

BATISTA, W. C.; TAVARES, G. S. B.; VIEIRA, D. S.; HONDA, E. R.; PEREIRA, S. S.; TADA, M. S. Notification of the first isolation of Cacipacore vírus in a human in the state of Rondônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 4, p. 528-530, jul./ago. 2011.

BEATY, B. J.; CALISHER, C. H.; SHOPE, R. E. Arboviruses. In: SCHIMIDT, N. J.; EMMONS, E. W. (Eds.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infeccions**. 6. ed. Washington: American Public Health Association, 1989, p. 797-855.

BHANGOO, S.; CHUA, R; HAMMOND, C.; KIMMEL, Z.; SEMENOV, L.; VIDENOVIC, A.; KESSLER, J. BORSODAY, M. Focal neurological injury caused by West Nile virus infection may occur independent of patient age and premorbid health. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 234, n. 2, p. 93-98, Jul. 2005.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BONA, A. C. D.; TWERDOCHLID, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in state of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 45, p. 297-300, Jun. 2012.

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. **Casos de Dengue, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2014b. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/Casos-e-incid-dengue-ate-2013.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Febre Amarela, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2010**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_1\\_fa2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_1_fa2010.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Óbitos por febre hemorrágica da Dengue, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2013**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2014a. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/obitos-dengu-ate-2013.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos**. 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.

BRÉS, P. Impact of arboviruses on human and animal health. In: MONATH, T P. (Ed.). **The arboviruses: epidemiology and ecology**. v 1. Florida: CRC Press Inc., 1988. p 1-18.



BRONZONI, R. V. M.; 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**, v. 98, n. 8, p. 456-461, Aug. 2004.

BRONZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R. N.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb. 2005.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. (Eds.) **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375-393.

BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662-671, Feb. 2012.

CALISHER, C. H. Medically important arboviruses of the United States and Canada. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89-116, Jan. 1994.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; FOSTER, J. P.; PALLANSCH, M.; ROEHRIG, J. T. Identification of an antigenic subtype of Eastern equine encephalitis virus isolated from a human. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 373-374, Feb. 1990.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRANT, W. E. Antigenic relationships between falviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37-43, Jan. 1989.

CALISHER, C. H.; KARABASTOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: MONATH, T. P. (Ed.). **The Arboviruses: epidemiology and ecology**. v 1. Florida: CRC Press Inc., 1988, p. 19-58.

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, 1975.

CAMPBELL, G. L.; MARFIN, A. A.; LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J. West Nile virus. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 519-529, Sept. 2002.

CASALS, J. New developments in the classification of arthropod-borne viruses. **Annals of Microbioloy**, v. 11, n. 13, p. 1-34, 1963.

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

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 5, p. 561-573, Sept. 1958.

CAUSEY, O. R.; MAROJA, O.; AZEVEDO, M. C. Epidemia pelo vírus Mayaro no Estado do Pará. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 152-154, jun. 1958.

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**, v. 49, n. 4, p. 221-224, July/Aug. 2007.

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

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**, v. 52, n. 1, p. 17-23, Jan./Feb. 2010.

CORREA, A. P.; TAVARES, F. N.; COSTA, E. V.; BURLANDY, F. M.; MURTA, M.; PELLEGRIN, A. O.; NOGUEIRA, M. F.; SILVA, E. E. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 829-833, Sept. 2010.

CORRÊA, A. P.; VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 3, p. 463-472, jun. 2008.

CRUZ, A. C.; PRAZERES, A. S.; GAMA, E. C.; LIMA, M. F.; AZEVEDO, R. S.; CASSEB, L. M.; NUNES, N. J. P.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. 2009. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 25, n. 11, p. 2517-2523, nov. 2009

DAM, E. T.; FLINT, M.; RYAN, M. D. Virus-encoded proteinases of the Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 8, p. 1879-1888, Aug. 1999.

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**, v. 31, n. 2, p. 127-129, 1986.

DUQUE, E. F.; ROTUNDO, M. Field Methods for Capturing and Marking Azarai Night Monkeys. **International Journal of Primatology**, v. 24, n. 5, p. 1113-1120, Mar. 2003.

EIDSON, M.; KOMAR, N.; SORHAGE, F.; NELSON, R.; TALBOT, T.; MOSTASHARI, F.; MACLEAN, R. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile Virus in the northeastern United States, 1999. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 615-620, July/ Aug. 2001.

ELLIS, A. E.; MEAD, D. G.; ALLISON, A. B.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, W. E. Pathology and epidemiology of natural West Nile viral infection of raptors in Georgia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 2, p. 214-233, Apr. 2007.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. 1. ed. San Diego: Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2005.

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

FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M.; MARTI, A. T.; SOUZA, L. T. M.; IVERSSON, L. B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination –inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 36, v. 3, p. 265-274, May/June 1994.

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

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes and infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, 1990. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13-18, jan./mar. 1990.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, Nov. 2014.

FULOP, L.; BARRET, A. D.; PHILPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R. W. rapid identification of flavivirus based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179-188, Oct. 1993.

GLUBER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, July/Aug. 2002.

GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 13-24, Dec. 2001.

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**, v. 33, n. 1, p. 95-97, fev. 1999.

GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 109-121, Feb. 2009.

GOULD, E. A.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P. M.; HOLMES, E. C. Origins, evolution, and vector/host co adaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 277-314, 2003.

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

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289-295, Dec. 2012.

HENCHAL, E. A.; GENTRY, M. K.; MCCOWN, J. M.; BRAND, W. E. dengue virus specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **American Journal of Tropical and Hygiene**, v. 31, n. 4, p. 830-836, July 1982.

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**, 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**, v. 30, n. 3, p. 689-698, May 1981.

IVERSSON, L. B.; SILVA, R. A. M. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; BARROS, L. R. S. Circulation of Eastern Equine encephalitis, Western Equine encephalitis, Ilhéus, Manguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 4, p. 335-359, July/ Ago. 2003.

IVERSSON, L. B.; TIRIBA, A.C. Encefalite por arbovírus Rocio. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de Infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap. 16, p. 233-239.

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**, v. 96, n. 6, p. 611-613, Nov. 2002.

JOZAN, M.; EVANS, R.; MCLEAN, R.; HALL, R. TANGREDI, B.; REED, L.; SCOTT, J. Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by Blocking ELISA and Immunohistochemistry. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 3, n. 3, p. 99-110, 2003.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates**. 3. ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine & Hygiene, 1985.

KOWALEWSKI, M. M.; SLAZER, J. S.; DEUTSCH, J. C.; RAÑO, M.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; GILLESPIE, T. R. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 1, p. 75-83, Jan. 2011.

KUMAR, N. P.; SABESAN, S.; KRISHNAMOORTH, K.; JAMBULIGAM, P. Detection of Chikungunya virus in wild populations of *Aedes albopictus* in Kerala state, India. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 10, p. 907-911, Oct. 2012.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-41, May 1998.

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

KUNO, G. Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grown in serum-free medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 851-855, Nov. 1982.

KUNO, G. Replication of dengue, yellow fever, St. Louis encephalitis and vesicular stomatitis viruses in a cell line (TRA-171) derived from *Toxorhynchites amboinensis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal**, v. 17, n. 11, p. 1011-1015, Nov. 1981.

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**, v. 52, n. 1, p. 11-15, Jan./Feb. 2010.

LINDENBACH, J. W.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed). **Fields Virillogy**. 4. ed. New York: Lippincot Williams & Wilkins, 2001. cap. 32, p. 810-851.

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**, v. 59, n. 2, p. 1-17, Apr. 2010.

LÓPEZ, G; CLAVERO, M. A. J.; VAZQUEZ, A.; SORIGUER, R.; TEJEDOR, C. G. ; TENORIO, A.; FOGUEROLA, J. Incidence of West Nile Virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, p. 285-290, Mar. 2011.

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

MAHER-STURGESS, S. L.; FURRESTER, N. L.; WAYPER, P. J.; GOULD, E. A.; HALL, R. A.; BARNARD, R. T. GIBBS, M. J. Universal primers that amplify RNA from all three *Flavivirus* subgroups. **Virology Journal**, v. 5, n. 16, p. 1-10, Jan. 2008.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in southern province, tanganyika territory, in 1952–1953. An additional note on chikungunya virus solations and serum antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238-240, May 1957.

MASSAD, E.; COUTINHO, F. A. B.; BURATTINI, M. N. B.; LOPEZ, L. F. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 370-374, 2001.

MCLEAN, R. G.; SCOTT, T. W. Avian hosts of St. Louis Encephalitis Virus. **Bird Control Seminars Proceedings**, Universidade de Nebraska, Lincoln, p. 143-155, 1979.

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

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. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a semana epidemiológica (SE) 47 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 45, n. 31, p. 1-7, 2014.

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. 2009a.

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

MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. et al. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1996. p. 961-1034.

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 encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 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**, v. 12, n. 1, p. 1559-1561, Oct. 2006.

MORENO, E. S.; ROCCO, I. M.; BERGO, E. S.; BRASIL, R. A.; SICILIANO, M. M. S.; SUZUKI, A.; SILVEIRA, V. R.; BISORDI, I.; SOUZA, R. P. S.; GROUP, Y. F. W. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the state of São Paulo, Brazil, 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 290-296, May/Jun. 2011.

MORSE, S. S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Emerging Infectious Disease**, v. 1, n. 1, p. 7-15, Jan./Mar. 1995

MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. S.; GIMAQUE, J. B. L.; MORA, B. R.; SOUZA, G. S.; GRIMMER, G. H. .N.; GALUSSO, E. S.; ARRUDA, E.; TADEU, L. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 2063-2064, Dec. 2009.

NATAL, D.; UENO, H. M. Vírus do Nilo Ocidental: característica da transmissão e implicações vetorais. **Entomologia y Vectores**, v. 11, n. 3, p. 417-433, jul./sept. 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**, v. 11, n. 10, p. 1610-1613, Oct. 2005.

OLBERG, R. A.; BARKER, L. K. Barker; CRAWSHAW, G. J.; BERTELSEN, M. F.; DREBOT, M. A.; ANDONOVA, M. West Nile virus encephalitis in a Barbary macaque. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 712-714, Apr. 2004.

OLIVEIRA, R. L.; HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ALVES, J. C. R.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 799-800, Sept. 2002.

OLIVEIRA, S. V.; LOPES, J. T. S.; BAIRROS, S. Vigilância da febre amarela em Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: um relato da epizootia 2008-2009. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 181-186, 2010.

PEREIRA, O. A.; NILSSON, M. R.; SUGAY, W.; TRAPP, E. E. Ocorrência de encefalomielite equina em Itaporanga, Estado de São Paulo (Brasil). II. Estudos sorológicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 1, p. 1-4, jan./fev. 1964.

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**, 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**, v. 12, n. 1, p. 15-23, 1962.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. In: VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.156-165.

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

POWERS, A. M.; BRAULT, A. C.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 171-179, Feb. 2000.

RÁCZ, M. L. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 671-678.

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

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

REISEN, W. K.; LOTHROP, H. D.; WHEELER, S. S.; KENNSINGTON, M.; GUTIERREZ, A.; FANG, Y.; GARCIA, S.; LOTHRO, B. Persistent West Nile Virus Transmission and the Apparent Displacement St. Louis Encephalitis Virus in Southeastern California, 2003–2006. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 494-508, May. 2008.

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**, 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**, 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**, v. 1, n. 1, p. 81-86, Mar. 2010.

RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. T. T.; CASSEB, S. M. M.; PRAZERES, A. S. C. RODRIGUES, D. S. G. SILVA, M. O.; CRUZ, A. C. R.; NETO, J. C. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2420-2427, June 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. Estudo de febre amarela 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.

RÚA, A. V.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A. B.; OLIVEIRA, R. L. High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor of the spread of chikungunya. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, June 2014.

SALLIS, E. S. V.; GARMATZ, S. L.; FIGHERA, R. A.; BARROS, V. L. R. S; GRAÇA, D. L. Surto de febre amarela em bugios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 115-117, Aug. 2003.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection and isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 5, p. 615-628, May 2006.

SANTOS, N. S. O.; BENATI, F. J. Diagnóstico laboratorial das viroses. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. (Eds.). **Introdução à virologia humana**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 4, p. 83-116.

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**, v. 51, n. 6, p. 539-545, dez.1999.

SCHUFFENECKER, N. P.; ITEMAN, I.; MICHAULT, A.; MURRI, S.; FRANGEUL, L.; VANEY, M. C.; LAVENIR R.; PARDIGON, N.; REYNES, J. M.; PETTINELLI, L.; BISCORNET, F.; DIANCOURT, L.; MICHEL, S.; DUQUERROY, S.; GUIGON, G.; FRENKIEL, M. P.; BRÉHIN, A. C.; CUBITO, N.; DESPRÈS, P.; KUNST, F.; REY, F. A.; ZELLER, H.; BRISSE, S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **Plos Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058-1070, July 2006.

SILVA, J. R.; ROMEIRO, M. F., WILLIAN, M. S. MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A. B.; CAMPOS, C. H. C.; MACHADO, R. Z.; SILVA, M. L. C. R.; FARIA, J. L. M.; CHÁVES, J. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. A Saint Louis encephalitis and Rocio vírus serosurvey in Brazilian horses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v. 47, n. 4, p. 414-417, July/Aug. 2014.

SHOPE, R. E. The use of a micro hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, v. 11, n. 6, p. 167-169, 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**, v. 158, n. 1-2, p. 165-170, June 2009.

SILVA, J. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; 33, p. 1703-1711, out. 1988.

SILVA, J. R.; MEDEIROS, L. C.; REIS, V. P.; CHAVES, J. H.; MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A. B.; CAMPOS, C. H. C.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D.; SILVA, M. L. C. R.; FARIA, J. L. M.; SILVA, E. E.; FIGUEIREDO, L. T. M. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-923, Nov. 2013.

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**, v. 5, n. 55, p. 12-15, jul. 2008.

SCARAMOZZIO, N.; CRANCE, J. M.; JOUAN, A.; DEBRIEL, D. A.; STOLL, F. S.; GARIN, D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1922-1927, May 2001.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and other emerging flaviviruses. **Journal of Infection**, v. 42, n. 2, p. 104–115, Feb. 2001.

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.

SOPER, F.L. The new epidemiology of yellow fever. **American Journal Public Health**, v. 27, n. 1, p. 1-14, Jan. 1937.

SOUZA, F. M. **Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos em localidades do sul do Brasil**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SOUZA, R. P.; FOSTER, P. G.; SALLUM, M. A. M.; COIMBRA, T. L .M.; MAEDA, A. Y.; SILVEIRA, V. R. ; MORENO, E. S.; SILVA, F. G.; ROCCO, I. M.; FERREIRA, B. F.; SUZUKI, A.; OSHIRO, F. M.; PETRELA, S. M. C. N.; PEREIRA, L. E.; KATZ, G.; TENGAN, C. H.; SICILIANO, M. M.; SANTOS, C. L. S. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American Genotype I in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 1, p. 175-185, Jan. 2010.

SPINSANT, F. L.; 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**, v. 44, n. 2, p. 59-62, Mar./Apr. 2002.

SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D.; JADI, R. S., BASU, A.; MOKASHI, C.; ARANKALLE V. A.; MISHRA, A. C. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal**, v. 45, n. 9, p. 491-495, Oct. 2009.

STURGESS, S. L. M.; FORRESTER, N. L.; WAYPER, P. J.; GOULD, E. A.; HALL, R. A.; BARNARD, R. T.; GIBBS, M. J. Universal primers that amplify from all three flavivirus subgroups. **Virology Journal**, v. 5, n.16, p. 1-10, Jan. 2008.

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.

SVOBODA, W. K.; MARTINS, L. C.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; SPOHR, K. A. H.; HILST, C. L. S.; AGUIAR, L. M.; LUDWIG, G.; PASSOS, F. C.; DA SILVA, L. R.; HEADLEY, S. A.; NAVARRO, I. T. Serological evidence for Saint Louis encephalitis vírus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paran  a River basin region, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 280-286, May/June 2014.

TALARMIM, A.; CHANDLER, L. J.; KAZNJI, 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**, 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**, v. 44, n. 3, p. 555-558, jun. 2010.

TAURO, L.; MARINO, B.; DIAZ, L. A.; LUCCA, E.; GALLOZO, D.; SPINSANTI, L.; CONTIGIANI, M. Serological detection of St. Louis encephalitis vírus and West Nile vírus in equines from Santa Fe, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 553-556, June 2012.

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**, v. 28, n. 1, p. 67-73, Jan. 1999.

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

THOMPSON, N. N.; AUGUSTE, A. J.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; CARRINGTON, C. V. F.; BLITVICH, B. J.; CHADEE, D. D.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C.; ADESIYUN, A. A. Seroepidemiology of selected alphaviruses and flaviviruses in bats in Trinidad. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 1, p. 53-60, Feb. 2015.

TIGOR, G. H.; PRICE, H. W. Antibody response in spider monkeys following single and double infections with group b arboviruses. **American Journal of Epidemiology**, v. 94, n. 4, p. 386-396, Jan. 1971

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**, 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**, v. 5, n. 4, p. 1-7, 2003.

TORRES, L. B.; ARAUJO, B. H. S.; CASTRO, P. H. G.; CABRAL, F. R.; MARRUAZ, K. S.; ARAUJO, M. S.; SILVA, S. G.; MUNIZ, J. A. F. C.; CAVALHEIRO, E. A. The use of new world primates for biomedical research: an overview of the last four decades. **American Journal of Primatology**, v. 72, n. 12, p. 1055-1061, Dec. 2010.

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**, v. 5, n. 4, p. 1-7, 2003.

TRANQUILIN, M. V.; LEHMKUHL, R. C.; MARON, A.; SILVA, L. R.; ZILLOTTO, L.; SEKI, M. C.; SALOMON, G. R.; CARRASCO, A. O. T. First report of yellow fever virus in non-human primates in the state of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 522-524, July/Aug. 2013.

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.

TSETSKARIN, K. A.; VANLANDINGHAM, D. L.; MCGEE, C. E.; HIGGS, S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **Plos Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1-12, Dec. 2007.

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**, v. 42, n. 1, p. 57-62, Jan. 2005.

VASCONCELOS, H. B.; NUNES, M. R. T.; CASSEB, L. M. N.; CARVALHO, V. L.; SILVA, E. V. P.; SILVA, S.; CASSEB, S. M. M.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of oropouche virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, May 2011.

VASCONCELOS, H. B.; AZEVEDO, R. S. S.; CASSEB, S. M. ; NETO, J. P. N.; CHIANG, J. O. ; CANTUÁRIA, P. C.; SEGURA, M. N. O.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, M. H. A. O.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, Feb. 2009.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1144-1149, Dec. 2010.

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.; BRYANT, J. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TESH, R. B.; RODRIGUES, S. G.; BARRET, A. D. T. Genetic divergence and dispersal of yellow fever vírus , Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1578-1584, Sept. 2004.

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

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

VASCONCELOS, P. F. C.; COSTA, Z. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LUNA, E.; RODRIGUES, S. G.; BARROS, V. L. R. S.; DIAS, J. P.; MONTEIRO, H. A. O.; OLIVA, O. F. P.; VASCONCELOS, H. B.; OLIVEIRA, R. C.; SOUSA, M. R. S.; BARBOSA DA SILVA, J.; CRUZ, A. C. R.; MARTINS, E. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Epidemic of jungle yellow fever in brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease Spread. **Journal of Medical Virology**, v. 65, p. 598-604, Nov. 2001.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; DAGALIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque Amazônico**, Belém: CEJUP, 1997. p. 207-225.

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. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 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**, 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**, v. 31, n. 4, p. 271-278, ago. 1989.

WALKER, T.; JEFFRIES, C. L.; MASFIELD, K. L.; JOHNSON, N. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 1-9, Aug. 2014.

WHITE, L. A. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 Cells to Viral Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Atlanta, v. 25, n. 7, p. 1221-1224, July 1987.

WEESE, J. C.; BAIRD, J. D.; DELAY, J.; KENNEY, D. G.; STAEMPFLI, H. R.; VIEL, L.; PARENT, J.; SMITH-MAXIE, L.; POMA, R. West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 44, p.469–473, June 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series 719. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases**. Geneva: 1985.

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**, v. 4, n. 2, p. 149-158, Apr./June 1998.

## ANEXO A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



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

Certificamos que o Protocolo nº 462/2012 do Pesquisador Paulo Mira Batista, referente ao projeto de pesquisa, “Arbovírus em primatas não humanos capturados em Mato Grosso do Sul”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), 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 ordinária do dia 13 de dezembro de 2012.



Joice Stein

Vice-coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 09 de janeiro de 2013.

2ª. via emitida em 17/07/2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
<http://www.propp.ufms.br/ceua>  
[ceua@propp.ufms.br](mailto:ceua@propp.ufms.br)  
fone (67) 3345-7184



## ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DO IBAMA



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: 29430-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Data da Emissão: 13/05/2013 11:00 | Data para Revalidação*: 12/06/2014 |
| * 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, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |                                   |                                    |

#### Dados do titular

|                                                                                        |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Nome: Renato Andreotti e Silva                                                         | CPF: 220.279.471-91      |
| Título do Projeto: Ectoparasitos e sua relação com transmissão de doenças em mamíferos |                          |
| Nome da Instituição : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                      | CNPJ: 00.348.003/0046-12 |

#### Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade                                | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|-------------------------------------------------------|------------------|---------------|
| 1 | Realiza diagnóstico molecular de doenças transmitidas | 10/2011          | 10/2013       |
| 2 | Coleta de ectoparasitos em mamíferos                  | 10/2011          | 10/2013       |

#### 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 passada, 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 pesquisador titular e os membros de 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, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. 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 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.                                                                                                                        |
| 7 | 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. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .                                                                                                             |
| 8 | 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.                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

#### Outras ressalvas

|   |                                                                                                                                                |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | As armadilhas deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido à hipó ou hipertermia |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### Equipe

| # | Nome                        | Função      | CPF            | Doc. Identidade        | Nacionalidade |
|---|-----------------------------|-------------|----------------|------------------------|---------------|
| 1 | Marlon Cezar Cominetti      | Pesquisador | 878.383.111-87 | 54192/01-D CRBIO-01-MS | Brasileira    |
| 2 | Paulo Mira Batista          | Pesquisador | 662.154.801-00 | 000734095 SSP/MS-MS    | Brasileira    |
| 3 | Jaqueline Matias dos Santos | Pesquisador | 025.005.041-23 | 001614079 ssp-MS       | Brasileira    |

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município    | UF | Descrição do local          | Tipo               |
|---|--------------|----|-----------------------------|--------------------|
| 1 | CAMPO GRANDE | MS | Br 262 km 04                | Fora de UC Federal |
| 2 |              | MS | passo do Ionha/ nhecolandia | Fora de 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: 63587287**



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: 29430-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Data da Emissão: 13/05/2013 11:00 | Data para Revalidação*: 12/06/2014 |
| * 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, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |                                   |                                    |

#### Dados do titular

|                                                                                        |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Nome: Renato Andreotti e Silva                                                         | CPF: 220.279.471-91      |
| Título do Projeto: Ectoparasitos e sua relação com transmissão de doenças em mamíferos |                          |
| Nome da Instituição : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                      | CNPJ: 00.348.003/0046-12 |

|   |            |    |                |                    |
|---|------------|----|----------------|--------------------|
| 3 | JARDIM     | MS | Jardim/Bonito  | Fora de UC Federal |
| 4 | AQUIDAUANA | MS | Rio aquidauana | Fora de UC Federal |
| 5 | CORUMBA    | MS | Corumbá        | Fora de UC Federal |
| 6 | MUNDO NOVO | MS | Mundo Novo     | Fora de UC Federal |

#### Atividades X Táxons

| # | Atividade                                                 | Táxons                                                                                                       |
|---|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Captura de animais silvestres in situ                     | Primates, Insecta, Perissodactyla, Chiroptera, Arachnida, Artiodactyla, Rodentia, Xenarthra, Didelphimorphia |
| 2 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ          | Chiroptera, Rodentia, Didelphimorphia, Artiodactyla, Xenarthra, Arachnida, Primates, Perissodactyla, Insecta |
| 3 | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ | Arachnida (*Qtde: 300), Insecta (*Qtde: 300)                                                                 |

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

|   |                                                     |                                                                                            |
|---|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)      | Secreção                                                                                   |
| 2 | Amostras biológicas (Outros mamíferos)              | Ectoparasita                                                                               |
| 3 | Amostras biológicas (Primates)                      | Sangue, Ectoparasita                                                                       |
| 4 | Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres) | Captura manual                                                                             |
| 5 | Método de captura/coleta (Outros mamíferos)         | Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Rede de neblina |
| 6 | Método de captura/coleta (Primates)                 | Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçá            |

#### Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino                          | Tipo Destino |
|---|---------------------------------------------|--------------|
| 1 | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |              |

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: 63587287



Página 2/3



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: 29430-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Data da Emissão: 13/05/2013 11:00 | Data para Revalidação*: 12/06/2014 |
| * 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, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |                                   |                                    |

#### Dados do titular

|                                                                                        |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Nome: Renato Andreotti e Silva                                                         | CPF: 220.279.471-91      |
| Título do Projeto: Ectoparasitos e sua relação com transmissão de doenças em mamíferos |                          |
| Nome da Instituição : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                      | CNPJ: 00.348.003/0046-12 |

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

| Táxon* | Qtde. | Tipo de amostra | Qtde. | Data |
|--------|-------|-----------------|-------|------|
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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: 63587287**



Página 3/3

## ANEXO C – COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO 3

### Chemistry Journals

#### Serosurvey of arbovirus in free-living Non-human Primates (Sapajus spp.) in Brazil.

--Manuscript Draft--

|                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manuscript Number:                            |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Full Title:                                   | Serosurvey of arbovirus in free-living Non-human Primates (Sapajus spp.) in Brazil.                                                                                                                                                                            |
| Short Title:                                  | Arbovirus in primates                                                                                                                                                                                                                                          |
| Article Type:                                 | Research Article                                                                                                                                                                                                                                               |
| Section/Category:                             | Journal of Environmental Analytical Chemistry                                                                                                                                                                                                                  |
| Keywords:                                     | public health - non-human primates - arbovirus infection - molecular biology                                                                                                                                                                                   |
| Corresponding Author:                         | Paulo Mira Batista, M.D.<br>BRAZIL                                                                                                                                                                                                                             |
| Corresponding Author Secondary Information:   |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Corresponding Author's Institution:           |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Corresponding Author's Secondary Institution: |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| First Author:                                 | Paulo Mira Batista                                                                                                                                                                                                                                             |
| First Author Secondary Information:           |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Order of Authors:                             | Paulo Mira Batista<br>Renato Andreotti<br>Tatiana Carneiro Rocha<br>Eliane Carneiro Gomes<br>Mario Antônio Navarro<br>Walfrido Kuhl Svoboda<br>João Nascimento<br>Sueli Guerreiro Rodrigues<br>Jannifer Oliveira Chiang<br>Pedro Fernando da Costa Vasconcelos |
| Order of Authors Secondary Information:       |                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Manuscript Region of Origin:                  | BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                         |

