



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA

MARIZE MOREIRA GIBRAIL

DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA ARBOVIRUS EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, GOIÁS

Goiânia
2015



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):		Marize Moreira Gibrail	
CPF:	765.880.926-87	E-mail:	marizebio@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim	☐ Não
Vínculo Empregatício do autor:	Bolsista Capes/CNPq		
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO
CNPJ:	33.654.831/0001-36		
Título:	Detecção de Anticorpos para Arbovírus em Primatas Não Humanos no Município De Goiânia, Goiás		
Palavras-chave:	Primatas Não Humanos – Arbovírus – Anticorpo – Soroneutralização – Inibição da Hemaglutinação.		
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:			
Área de concentração:	Microbiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/06/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador(a):	Profª. Drª. Divina das Dôres de Paula Cardoso		
CPF:	091.724.751-53	E-mail:	dcardoso@ufg.br
Co-orientador(a):			
CPF:		E-mail:	

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do(a) autor(a)

Data: 14/08/2015

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MARIZE MOREIRA GIBRAIL

DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA ARBOVIRUS EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, GOIÁS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título
de Mestre em Medicina Tropical e Saúde
Pública

Orientador: Prof^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Gibrail, Marize Moreira

Deteção de Anticorpos para Arbovirus em Primatas Não Humanos no
Município de Goiânia, Goiás [manuscrito] / Marize Moreira Gibrail. -
2015.

ix, 64 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Primatas Não Humanos. 2. Arbovirus. 3. Anticorpo. 4.
Soroneutralização. 5. Inibição da Hemaglutinação. I. Cardoso, Divina das
Dôres de Paula, orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Marize Moreira Gibrail

Orientador: Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

2. Prof^a. Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori

3. Prof^a. Dr^a. Márcia Alves Dias de Matos

Data: 29/06/2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, que me sustentou nos momentos de êxito e de dificuldades. Aos meus filhos Felipe, Rafael e Maria Eugênia, dos quais privei de importantes momentos do convívio para dedicar-me aos estudos;

Aos meus irmãos e mamãe, ao meu pai, que mesmo não estando aqui, vive no meu pensamento, na minha força e na minha realização. Em espírito agradeço pelo seu amor e ensinamentos. Não me esqueço de quando criança me chamava das brincadeiras no quintal, onde me escondia, observando as formigas... A pergunta: “Tudo bem cientista maluca?”... Quanta saudade!

Ao companheiro de jornada Sócrates Randal, nas dificuldades e nos momentos de tranquilidade;

Aos amigos do Laboratório de Virologia, sem os quais este trabalho não teria se realizado, a vocês Teresinha Sousa, Tâmera Almeida, Kareem Badr, Ana Carla Guissoni, Greyciele Almeida e a nossa querida Shirley, cuidando sempre com carinho do nosso ambiente;

Às professoras Menira Souza, Fabíola Fiaccadori, Keili e a cada aluno do Laboratório de Virologia, obrigada! Aprendi a cada dia com vocês;

Aos professores do IPTSP, em especial José Clecildo Bezerra, Megmar Carneiro, Milton Oliveira, Adelair Santos, Evandro, Mariane Stefani, Maria Cláudia André, Carla Bittencourt, Marília Turch e André Kipnis;

À direção do Instituto, nas pessoas das professoras Doutoras Ana Paula Kipnis e Flávia Oliveira. Aos queridos servidores Sr. Fernando Koslowski, Valéria Maria e Divina Rezende, ao Zezinho e Kariny Soares;

Ao Instituto Evandro Chagas/MS/PA, pelos valiosos ensinamentos e oportunidade, no Laboratório de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Aos Professores Doutores Pedro Vasconcelos, Jannifer Chiang, Livia Martins, Sueli Guerreiro Rodrigues, Milene Silveira e aos servidores Basílio e Liliane Chagas;

Ao Centro Nacional de Primatas – CENP/IEC/MS, na pessoa do Dr. José Augusto Muniz;

À AMMA à Equipe de Fauna, Laura Wiederhecker, Ygor Carvalho, Wanessa Castro e Carlos Eduardo Barbosa;

Aos amigos apoiadores da idéia da pesquisa com os animais silvestres, Íris Rezende Machado, Clarismino Luiz Pereira Junior e Ronaldo Vieira;

Ao CETAS/IBAMA, parceiros Léo Caetano e Luiz Alfredo;

À Professora Divina Cardoso, pela oportunidade do aprendizado.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	vi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Arbovírus Considerados de Grande Interesse Humano no Brasil	4
1.2.1. Família <i>Flaviviridae</i>	4
1.2.1.1. Vírus da Febre Amarela (FAV).....	5
1.2.1.2. Vírus Dengue	7
1.2.1.3. Vírus Bussuquara.....	10
1.2.1.3. Vírus Cacipacore	11
1.2.2. Família <i>Bunyaviridae</i>	11
1.2.2.1. Vírus Oropouche.....	12
1.2.3. Família <i>Togaviridae</i>	13
1.2.3.1. Vírus Mayaro.....	15
1.2.3.2. Vírus Chikungunya.....	16
1.3. Primatas Não Humanos	18
1.3.1. PNHs habitantes de parques do município de Goiânia.....	19
1.3.1.1. <i>Callithrix penicillata</i>	19
1.3.1.2. <i>Cebus libidinosus</i>	20
1.3.1.3. <i>Alouatta caraya</i>	21
1.4. Diagnóstico laboratorial para arbovírus	22
1.4.1. Isolamento viral.....	22
1.4.2. Detecção do antígeno viral	24
1.4.3. Detecção do genoma viral	24
1.4.4. Determinação dos anticorpos	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26

3. OBJETIVO	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos específicos	27
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 28
4.1. Delineamento e áreas de estudo	28
4.1.1. Descrição das áreas de estudo	28
4.1.1.1. CETAS/IBAMA	28
4.1.1.2. Parque Areião (Setor Pedro Ludovico)	29
4.1.1.3. Jardim Botânico (Vila Redenção)	29
4.1.1.4. Jardim Botânico (Setor Pedro Ludovico)	29
4.2. População de estudo	29
4.3. Metodologia.....	29
4.3.1. Captura dos PNHs	30
4.3.2. Processamento das amostras de sangue.....	31
4.3.3. Análise das amostras de soro.....	31
4.3.3.1. Ensaio de Inibição de Hemaglutinação (IH)	32
a) Triagem das amostras de soro por IH.....	32
b) Titulação das amostras de soro positivos por IH no Ensaio de Triagem	32
4.3.3.2. Ensaio de Soroneutralização (SN).....	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Reação de Inibição da Hemaglutinação	35
5.2. Reação de Soroneutralização.....	35
 6. DISCUSSÃO	 37
 7. CONCLUSÕES.....	 44
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 45
 ANEXOS.....	 60

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Ciclos epidemiológicos de arbovírus	03
Figura 2. Representação esquemática de uma partícula viral do gênero <i>Flavivirus</i>	04
Figura 3. Diagrama esquemático da estrutura genômica de uma partícula viral do Gênero <i>Flavivirus</i> , família <i>Flaviviridae</i>	05
Figura 4. Representação Esquemática de uma partícula viral da família <i>Bunyaviridae</i> gênero <i>Orthobunyavirus</i>	12
Figura 5. Diagrama esquemático da estrutura genômica de uma partícula viral do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	12
Figura 6. Representação esquemática do genoma de uma partícula viral do gênero <i>Alphavirus</i> família <i>Togaviridae</i>	14
Figura 7. Representação esquemática de uma partícula viral do gênero <i>Alphavirus</i> , Família <i>Togaviridae</i>	14
Figura 8. Imagem do PNH <i>Callithrix penicillata</i>	20
Figura 9. Imagem do PNH <i>Cebus libidinosus</i>	21
Figura 10. Imagem do PNH <i>Alouatta caraya</i>	22
Figura 11. Fluxograma da coleta até o processamento das amostras de soro dos 50 PNHs estudados.	30
Figura 12. Armadilha tipo “Tomahawk” utilizada para captura dos PNHs	30
Figura 13. Condicionamento (ceva) dos animais dentro da gaiola para a captura	31
Quadro 1. Características gerais dos principais arbovírus de interesse humano ou veterinário	2
Quadro 2. Distribuição dos PNHs estudados considerando os locais e datas da amostragem e respectivas espécies	28
Quadro 3 Positividade para arbovírus em PNHs do município de Goiânia pelo ensaio de Inibição da Hemaglutinação (IH), considerando a espécie, o título de anticorpos e o local onde se procedeu a coleta	35
Quadro 4. Positividade pelo teste de Soroneutralização (SN) para arbovírus, observada em PNHs do município de Goiânia, Goiás, por espécie animal	36
Anexo I. Parecer do COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA	61
Anexo II. Autorização do SISBIO/IBAMA	63
Anexo III. Artigo. TITLE: Detection of antibodies to Oropouche vírus in non-human primates at Goiânia city, Goiás.....	67

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
MS	Ministério da Saúde
ORO	Oropouche
OROV	Vírus Oropouche
MAY	Mayaro
MAYV	Vírus Mayaro
DENV	Vírus Dengue
BSQ	Bussuquara
BSQV	Vírus Bussuquara
CPC	Cacipacore
CPCV	Vírus Cacipacore
FA	Febre Amarela
FAV	Vírus da Febre Amarela
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
SCD	Síndrome do Choque do Dengue
WHO	<i>World Health Organization</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
IH	Inibição da Hemaglutinação
SN	Soroneutralização

RESUMO

Os arbovírus são vírus que se mantêm na natureza através da transmissão por um artrópode vetor a um vertebrado suscetível sendo o primata não humano (PNH), hospedeiro importante, principalmente no ambiente silvestre. Este estudo teve como objetivo identificar anticorpos para arbovírus em PNHs habitantes de três Parques Urbanos da cidade de Goiânia, bem como de PNHs ambientados no Centro de Triagem de Animais Silvestres - CETAS-IBAMA, do município de Goiânia. O procedimento se deu a partir da captura e coleta de amostras de sangue de 50 animais das espécies *Cebus libidinosus* (n=42), *Alouatta caraya* (n=5) e *Callithrix penicillata* (n=3). Todas as amostras de soro foram inicialmente submetidas ao ensaio de Inibição da Hemaglutinação (IH) frente a antígenos específicos de 23 tipos de arbovírus que circulam na região Amazônica brasileira tendo como sistema de revelação hemácias de ganso. Foi observado positividade em amostras de soro de seis PNHs sendo três deles da espécie *Cebus libidinosus* (animais 02, 10 e 11), dois da espécie *Alouatta caraya* (animais 12 e 20) e o outro da espécie *Callithrix penicillata* (animal 23). Destes seis animais, quatro se mostraram soropositivos para mais de um tipo de arbovírus: animal 02 (vírus Cacipacore e Dengue-1); animal 11 (vírus Mayaro, Oropouche, Cacipacore, Bussuquara e Dengue-1, 3 e 4); animal 12 (vírus Oropouche, Bussuquara e Cacipacore); e animal 23 (vírus Dengue- 1, 3 e 4). Os outros dois PNHs, espécies *Cebus libidinosus* (animal 10) e *Alouatta caraya* (animal 20) foram soropositivos para apenas um tipo de arbovírus: Bussuquara e Oropouche, respectivamente. Considerando a titulação de anticorpos por IH, foi observado título igual ou maior que 1:40 para os vírus Cacipacore e Dengue-1 (animal 02), Bussuquara (animal 10) e Oropouche (animais 11, 12 e 20), totalizando cinco amostras de soro. Destas, quatro foram testadas pelo ensaio de soroneutralização (SN) *in vivo* utilizando camundongo suíço de 1 a 3 dias de nascido: amostra do animal 02, positiva para o vírus Cacipacore e amostras dos animais 11, 12 e 20, positivas para o vírus Oropouche. Foi observado que duas destas amostras confirmaram positividade para o vírus Oropouche (animais 12 e 20), ambos da espécie *Alouatta caraya*, os quais eram ambientados do CETAS-IBAMA. No conjunto o estudo mostrou soropositividade para sete tipos de arbovírus nas três espécies de PNHs estudadas as quais possuem registro no Bioma Cerrado: *Cebus libidinosus*, *Alouatta caraya* e *Callithrix penicillata*.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses that maintained in nature by passing through an arthropod vector to a susceptible vertebrate and non-human primate (NHP), an important host, mainly in wild environment. This study aimed to identify antibodies for arboviruses in NHPs inhabitants of three urban parks of Goiania city, as well as NHPs acclimatized the Wild Animal Screening Center - CETAS-IBAMA, Goiania city. The procedure took place from the capture and collection of blood samples from 50 animals of species *Cebus libidinosus* (n = 42), *Alouatta caraya* (n = 5) and *Callithrix penicillata* (n = 3). All serum samples were first subjected to hemagglutination inhibition assay (HI) against specific antigens of 23 types of arboviruses circulating in the Brazilian Amazon region having as revelation goose red blood cell system. It was observed a positivity in serum samples of six NHPs, three of them being of the species *Cebus libidinosus* (animals 02, 10 and 11), two of *Alouatta caraya* species (animal 12 and 20) and the others for *Callithrix penicillata* species (animal 23) These six animals, four of them showed seropositive for more than one type of arboviruses: Animal 02 (Cacipacore virus and Dengue-1); Animal 11 (Mayaro virus, Oropouche, Cacipacore, Bussuquara and Dengue-1, 3 e 4); Animal 12 (Oropouche virus, Bussuquara and Cacipacore); and animal 23 (Dengue- 1, 3 and 4). The other two NHPs, species *Cebus libidinosus* (animal 10) and *Alouatta caraya* (animal 20) were seropositive for only one type of arbovirus: Bussuquara and Oropouche, respectively. Considering antibody titration by HI, it was observed a titer of equal or greater than 1:40 for Cacipacore virus and Dengue-1 (animal 02), Bussuquara (animal 10) and Oropouche (animals 11, 12 and 20), in total of five serum samples. Of these, four were tested for serum neutralization test (SNT) in vivo using Swiss mice of 1-3 days old: sample of animal 02, was positive for the virus Cacipacore and samples of animals 11, 12 and 20 were positive for Oropouche virus. It was noted that two of these samples was confirmed as positive for Oropouche virus from animals 12 and 20, both of *Alouatta caraya* species, which were acclimatized at CETAS-IBAMA. Generally, the study showed seropositivity for seven types of arboviruses in the three species studied NHPs which are registered in the Cerrado: *Cebus libidinosus*, *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata*.

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Introdução

O termo arbovírus refere-se a uma classificação ecológica de vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997) que têm como característica a necessidade de dois componentes essenciais para se manterem na natureza: um artrópode vetor, mosquito ou carrapato e um animal vertebrado, de diferentes gêneros e espécies (KUNO; CHANG, 2005; BRASIL, 2005).

Nesta definição incluem-se 537 agentes virais (CDC, 2015), sendo que no Brasil têm sido identificados 210 tipos sendo 196 destes, isolados primeiramente na região amazônica brasileira das quais 34 espécies têm sido associadas a enfermidades em humanos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; MARTINS et al., 2007; CASSEB et al., 2013).

Em termos de classificação viral, os arbovírus se distribuem em sete famílias, seis delas compostas por agentes que têm como genoma RNA (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*) e apenas uma família de vírus DNA (*Asfarviridae*) (CALISHER; KARABATSOS, 1988; LABUDA; NUTTALL, 2004; HOLLIDGE et al., 2010; WEAVER; REISEN, 2010). O quadro 1 sumariza as principais características biológicas das diferentes famílias de vírus que contam com gêneros e espécies de arbovírus, sendo listadas algumas espécies de importância para humanos e animais domésticos.

O habitat natural destes vírus são regiões de matas e florestas, com exceção dos vírus Oropouche e Dengue, que estão associados com registros de epidemias em humanos em regiões urbanas (VASCONCELOS et al., 1998). Têm como ciclo de vida a circulação entre animais silvestres onde podem levar a doença, ou não, e que ainda proporciona a possibilidade de transmissão para o humano e outros animais, incluindo os domésticos. Em geral, a infecção para o homem é acidental e muitas vezes este, e animais domésticos se constituem em hospedeiros finais, quando o vírus se encontra fora do seu habitat natural (CASSEB, 2013).

Quadro 1. Características gerais dos principais arbovírus de interesse humano ou veterinário.

Família	Gênero	Vírus	Genoma*	Simetria	Envelope
<i>Asfarviridae</i>	<i>Asfarvirus</i>	Febre Suína Africana	dsDNA linear	Icosaédrica	Sim
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Mayaro, Encefalite equina do leste, oeste e venezuelana, Mucambo, Chikungunya	ssRNA(+) linear	Icosaédrica	Sim
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche, Caraparu, Catu, Guaroa, Maguari, Tacaiuma, Belém	ssRNA(-) segmentado	Helicoidal	Sim
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Febre Amarela, Ilhéus, Saint Louis, Rocio, Dengue, Bussuquara, Cacipacore, Oeste do Nilo	ssRNA (+) linear	Icosaédrica	Sim
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	Língua Azul	dsRNA segmentado	Icosaédrica	Não
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i>	Estomatite Vesicular	ssRNA(-) linear	Helicoidal	Sim
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	Thogotovirus	ssRNA(-) segmentado	Helicoidal	Sim

*ds: fita dupla (*double strand*); ss: fita simples (*single strand*).

Fonte: CALISHER; KARABATSOS, 1988; LABUDA; NUTTALL, 2004; HOLLIDGE et al., 2010; WEAVER; REISEN, 2010.

Os arbovírus mantêm-se na natureza envolvidos em diferentes tipos de transmissão: 1- Biológica: Tem como característica principal a transmissão do vírus através do vetor hematófago competente, decorrido um período de incubação extrínseco, esta se dá a partir da saliva, via picada, resultante da infecção do trato alimentar do vetor para o hospedeiro vertebrado suscetível. (DEGALLIER et al., 2001; VASCONCELOS, 2002; CASSEB et al., 2013; ROCHA et al., 2014); 2- Mecânica: esta se dá em função da interrupção da alimentação, através do repasto sanguíneo do vetor em um hospedeiro que apresente altos títulos do vírus. Ainda, de forma imediata se alimente em outro hospedeiro suscetível que esteja próximo, sem que tenha havido multiplicação do agente no vetor (PARANÁ, 2015). 3- Direta: é admitida ocorrer via aerossol, havendo também necessidade de alta concentração viral em espécimes, com destaque para urina ou fezes, pele e pelo contaminados. É inquestionável a importância desse meio de transmissão, sendo compartilhado por todos os grupos de vírus animais (KUNO; CHANG, 2005).

Em qualquer modalidade estes agentes podem ser admitidos como possuindo dois ciclos ecológicos, denominados silvestre e urbano. Em adição tem-se também a possibilidade da ocorrência dos agentes em áreas de vegetação preservada, urbana ou periurbana. O ciclo silvestre é caracterizado pela transmissão viral, através de artrópodes para vertebrados, com destaque para primatas não humanos e aves e o ciclo urbano conta com o humano como hospedeiro vertebrado (VASCONCELOS et al., 1998; BATISTA et. al., 2011) (Figura 1).

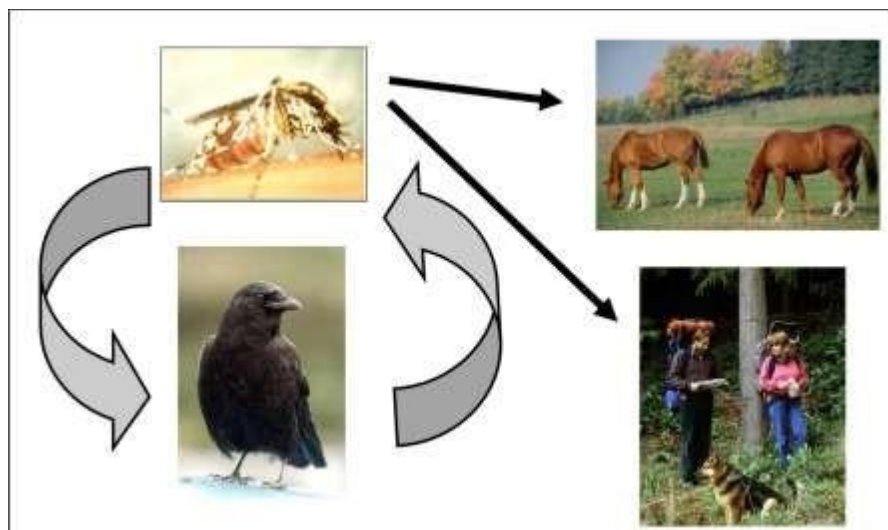


Figura 1. Ciclos epidemiológicos de arbovírus.
Fonte: (CASSEB et al., 2013).

1.2. Arbovírus Considerados de Importância em Saúde Pública

Dentre os arbovírus que levam a doenças em humanos destacam-se os vírus das famílias *Flaviviridae* (V. Febre Amarela, Dengue, Bussuquara e Cacipacore), *Bunyaviridae* (V. Oropouche) e *Togaviridae* (V. Mayaro e Chikungunya) (FIGUEIREDO, 2010; CASSEB et al., 2013).

1.2.1. Família *Flaviviridae*:

A família *Flaviviridae* é composta por mais de 60 tipos de vírus distribuídos em quatro gêneros, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus*, este último sendo recentemente proposto (ICTV 2015). O gênero *Flavivirus* contém agentes considerados como arbovírus, tendo sido até o momento constituído por 53 tipos de vírus. O gênero inclui os vírus da Febre amarela (FAV), Dengue (DENV), Bussuquara (BSQV) e Cacipacore (CPCV) (ICTV, 2015).

Os vírus desta família são envelopados, têm simetria icosaédrica e diâmetro em torno de 40 a 60 nanômetros (nm). O genoma consiste de RNA fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 11.000 pares de bases (pb), contendo uma estrutura CAP na porção final 5' e sendo não poliadenilado na porção final 3'. Apresentam uma única região de leitura aberta (RLA) flanqueada pelas regiões não traduzíveis 5' e 3' (RNT). A RLA codifica uma poliproteína que é processada por proteases do vírus e da célula hospedeira gerando três proteínas estruturais, C, pré-M/M e E, e sete não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS et al., 1990; WANG et al., 1996; BALEOTTI, 2002; BRASIL, 2005; VON LINDERN et al., 2006; GAMARNIK, 2010; BRONZONI et al., 2011) (Figuras 2 e 3).

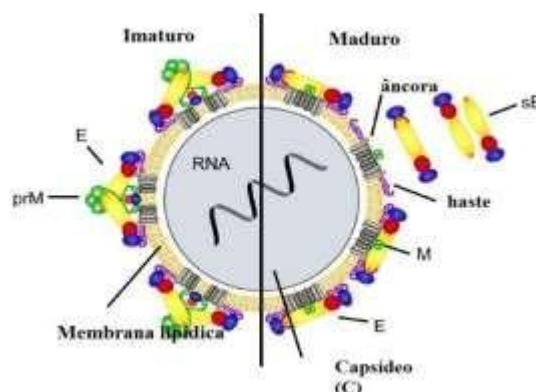


Figura 2. Representação esquemática de uma partícula viral do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*: O genoma de fita RNA única, sentido positivo, protegida pelo capsídeo (C), proteínas M e E, inseridas na bicamada lipídica (modificado).

Fonte: (VRATISKIKH et al., 2013).

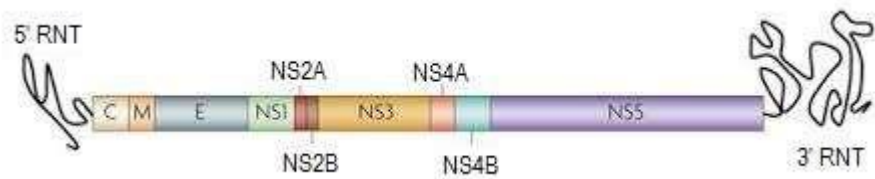


Figura 3. Diagrama esquemático da estrutura genômica de uma partícula viral do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (modificado).

Fonte: (GUZMAN et al., 2010).

1.2.1.1. Vírus da Febre Amarela (FAV)

O vírus da Febre Amarela tem grande importância para a saúde pública em função da gravidade da doença clínica resultante. O vírus é o agente protótipo da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (CHAMBERS et al., 1990; VON LINDERN et al., 2006). Tem sido reconhecido apenas um sorotipo do vírus mas pequenas alterações genômicas entre isolados da América levou ao reconhecimento de dois genótipos e entre amostras da África, cinco genótipos (VON LINDERN et al., 2006).

FAV apresenta na natureza os dois ciclos de transmissão: silvestre e urbano. Estes dois padrões epidemiológicos são admitidos ocorrerem em função dos elementos que formam o ciclo de manutenção do agente na natureza, ou seja, o tipo de hospedeiro e as espécies de vetores envolvidos na transmissão (BRASIL, 2005).

Nas Américas, o ciclo urbano é caracterizado pela transmissão do vírus ao homem suscetível a partir da picada pelo *Aedes aegypti* infectado. O ciclo silvestre se dá pela picada de mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* sendo os principais hospedeiros primatas não humanos (PNHs), muito embora o homem também possa se infectar por se introduzir em habitat silvestre ou por habitar em ambiente rural (DÉGALLIER et al., 1992 apud BRASIL, 2005). Na África, espécies do gênero *Aedes* são os transmissores, tanto no meio urbano quanto silvestre (VASCONCELOS, 2003).

Atualmente, no Brasil, o vírus da FA se mantém em natureza mediante ciclo silvestre, representado pela circulação do vírus de mosquitos para primatas não humanos com eventual participação de humanos não vacinados que adentram as matas e se infectam ao serem picados por mosquito vetor infectado (ALMEIDA, 2005). Apesar da existência de uma vacina formulada a partir de vírus vivos atenuados da FA (cepa 17D), que confere imunidade eficaz e duradoura, existe o risco da ocorrência de eventuais surtos urbanos no Brasil, entre humanos susceptíveis, principalmente em regiões onde o vírus circula entre os PNHs em áreas próximas a cidades, ou em locais de matas com potencial

turístico (MONDET et al., 1996), ou ainda devido a alterações ambientais naturais como as climáticas (VASCONCELOS et al., 2001a) ou induzidas pelo homem (VASCONCELOS et al., 2001b).

Em termos da patogenia tem-se registro de dois padrões para o vírus, sendo um o viscerotropismo, e outro, o neurotropismo, observado a partir de experimentos com animais de laboratório. Em humanos e primatas não humanos, o padrão observado é o de viscerotropismo com lesões múltiplas no fígado, baço e rins (HUDSON, 1928; VASCONCELOS 2002).

Neste padrão de viscerotropismo, o quadro clínico da Febre Amarela em humanos é caracterizado por sinais com envolvimento sistêmico agudo, afetando principalmente o fígado, mas alterações renais e cardíacas podem ocorrer e levar à fatalidade (MONATH, 2001; MONATH; BARRETT, 2003; VASCONCELOS, 2003). O curso da infecção pelo vírus da Febre Amarela tanto no humano quanto em PNHs, pode resultar em morte ou cura, com imunidade duradoura (VASCONCELOS, 2002).

Dados mostram que FAV afeta mais de 200.000 pessoas anualmente, a maioria na África e América do Sul, com aproximadamente 30.000 mortes, muito embora se admita a ocorrência da subnotificação da doença (QUARESMA et al., 2006; QUARESMA et al., 2013). Na América do Sul, muito embora a infecção pelo vírus seja considerada zoonose, uma recente epidemia no Paraguai, tendo como possível reservatório o humano, em área urbana, tem levado a sugestão da necessidade de manutenção dos programas de vacinação em regiões enzoóticas (WEAVER; REISEN, 2010).

No Brasil a infecção por FAV se destacou como de grande importância no século 20, com o surto principal ocorrendo na década de 1940 (BEP, 2009). No entanto, casos em humanos de febre amarela silvestre ainda ocorrem em áreas consideradas de risco em diversos estados brasileiros, a saber, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais e São Paulo, além de algumas áreas dos estados da região Sul (BRASIL, 2005; MENEZES et al., 2008).

No estado de Goiás entre 2007 e 2008 foram notificadas epizootias de primatas não humanos e casos de óbitos confirmados de humanos. O que foi observado no país em outros estados da Federação, no mesmo período, com o registro de 75 casos suspeitos de febre amarela silvestre. Destes, 45 foram confirmados, dos quais vinte e cinco evoluíram para óbito. Os registros foram provenientes, além do estado de Goiás, dos estados de Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Pará e Minas Gerais (BRASIL, 2008).

A infecção pelo vírus tem caráter sazonal, ocorrendo principalmente entre os meses de janeiro a abril, se admitindo que fatores ambientais propiciem o aumento da densidade vetorial e assim aumentando a possibilidade de transmissão (BRASIL, 2005; MENEZES et al., 2008).

O Ministério da Saúde brasileiro determina que, em período de ocorrência da doença, com caso de epizootia confirmado para um PNH, macacos sintomáticos ou no caso de óbito, devem ser incluídos nas notificações para Febre Amarela e que as medidas preconizadas para saúde pública sejam adotadas (BRASIL, 2005).

1.2.1.2. Vírus Dengue (DENV)

Objeto de vigilância ambiental tem-se de grande importância a infecção pelos vírus Dengue que circulam em mais de 100 países. Estes compreendem quatro sorotipos: DENV 1-4 (GUBLER, 1998). Os diferentes sorotipos apresentam variação genômica de modo a constituir-se em genótipos e dentre estes maiores variações levam à determinação de diferentes espécies (RICO-HESSE, 1990; THU et al., 2005; LINDENBACH et al., 2007).

Admite-se que os diferentes sorotipos virais sejam originários de florestas da Ásia e África (WANG et al., 2000; WEAVER; VASILAKIS, 2009) e apesar de apresentarem epidemiologia similar, possuem características genéticas e antigênicas distintas de modo que a imunidade homóloga é de longo prazo o que não ocorre com a imunidade heteróloga (WANG et al., 2000). Os vírus Dengue, no contexto urbano, têm como principal agente vetor o mosquito *Ae. Aegypti* e embora o vírus seja considerado nas Américas principalmente de circulação urbana, tem sido admitido a possibilidade do ciclo silvestre, do que já se tem registro na Ásia (RUDNICK, 1965; WANG et al., 2000; CARDOSA et al., 2009; VASILAKIS et al., 2012; HANLEY et al., 2013;) bem como na África (FAGBAMI et al., 1977; RICO-HESSE, 1980; ROBIN et al., 1980; CORDELLIER et al., 1983; ROCHE et al., 1983; SALUZZO et al., 1986; RODHAIN, 1991; DIALLO et al., 2003). Na África, região do Senegal, foi ainda observado que amplificações epizoóticas ocorrem com intervalo de oito anos, marcadas por períodos de silêncio sem isolamento do vírus embora haja vigilância constante (WANG et al., 2000).

Embora os vetores responsáveis pela transmissão silvestre, na África e Ásia, não sejam na maioria das vezes definidos, durante um surto na Nigéria estudos de susceptibilidade (DIALLO et al., 2005) bem como isolamento do vírus a partir de *Ae. Furcifer* (DIALLO et al., 2003) e estudos ecológicos (DIALLO et al., 2012) sugeriram

que esta espécie pode ser um vetor silvestre e que também pode servir como vetor ponte para humanos em aldeias próximas a matas. Tem sido admitido por outro lado que *Ae. aegypti* não é vetor importante no Senegal oriental porque a forma ancestral de floresta do mosquito, *Ae. aegypti formosus*, é relativamente refratária à infecção pelo vírus e a forma doméstica mais suscetível, *Ae. aegypti aegypti*, não ocorre naquela área (DIALLO et al., 2005).

O ciclo silvestre de DENV poderia não ocorrer nas Américas se mosquitos associados (que alimentam sobre) a potenciais primatas hospedeiros não fossem vetores competentes para o vírus. Essa assertiva é reforçada pelo fato de que pouco se sabe sobre a habilidade de espécies de mosquitos do novo mundo para serem infectados e/ou transmissores tanto para DENV humano ou silvestre. Não obstante, tem sido visto que outras espécies de *Aedes* parecem ser vetores capazes para infecção por DENV nas Américas, como *Ae. mediovittatus* para DENV-1 e 2 (GUBLER et al., 1985) bem como o *Ae. mediovittatus*. *Oc. japonicus*, uma espécie originária da Ásia e que invadiu a América do Norte. Ainda, *Ae. triseriatus*, *Ae. brelandi*, *Ae. Hendersoni* e *Ae. zoosophus* têm sido vistos serem suscetíveis à infecção por DENV-1 (FREIER; GRIMSTAD, 1983). Também nas Américas Central e do Sul, o que incluiu o Brasil, foi visto que *Hg. equinus* pode ser infectado por DENV-1 (LOPES, et al., 2014) implicando esta espécie como vetor potencial para DENV. Assim a sugestão de que a ausência de DENV silvestre nas Américas não pode ser atribuível à falta de vetor competente mesmo porque o *Hg. leucocelanus*, mosquito largamente distribuído, primatófilico, é vetor do FAV silvestre e assim poderia sustentar o ciclo selvagem do DENV (BRASIL, 2005).

Considerando o potencial de hospedeiros vertebrados para DENV nas Américas, tem sido visto que PNHs, de diferentes espécies, são animais que têm sido utilizados para varias abordagens de estudo o que inclui avaliação vacinal e de drogas, estudos de replicação, dinâmica da infecção e imunogenicidade dos quatro sorotipos do vírus. Por outro lado estes estudos utilizam amostras de DENV derivadas de ciclo de transmissão humano, o que implica que a dinâmica da infecção de DENV silvestre não tem sido avaliada. Não obstante, se admite similaridade no perfil de replicação de amostras silvestre e de ciclo humano, tendo como parâmetro o perfil de similaridade destas amostras em modelos de cultura de tecido (VASILAKIS et al., 2007; VASILAKIS et al., 2008; VASILAKIS et al., 2012) e a habilidade do DENV selvagem para gerar doença severa em humanos (CARDOSA et al., 2009; FRANCO et al., 2011).

Em termos do ciclo urbano, a disseminação destes agentes está relacionada à distribuição geográfica e densidade do vetor, o que é considerado importante critério para previsão de epidemias. Das espécies vetores do vírus, o *Aedes aegypti*, nas Américas, é o vetor principal e o secundário é o *Aedes albopictus* (BACK; LUNDVISK, 2013). Observa-se que em países com epidemia por dengue, há precedência da infestação pelo mosquito *Aedes aegypti* e muito embora não se conheça a causa real do porque da magnitude da disseminação do vírus, alguns fatores têm sido atribuídos como o alto crescimento demográfico e ocupações humanas sem planejamento e de forma descontrolada em especial, nos países tropicais em desenvolvimento (GUBLER, 2006; MACIEL et al., 2008).

A gravidade da infecção pelo DENV tem sido relacionada tanto a fatores virais quanto do hospedeiro. No primeiro caso tem-se admitido a virulência específica do isolado o que em algumas situações tem sido atribuído a determinado sorotipo. Em relação ao hospedeiro uma das importantes hipóteses é a da resposta imune exacerbada. Esta ocorre seja em função de um determinado sorotipo em uma infecção primária ou quando de uma infecção secundária ou mesmo através de imunidade passiva, considerando a presença de anticorpos heterólogos ao sorotipo infectante (GÚZMAN et al., 2002; BACK; LUNDVISK, 2013).

Na condição de doença sintomática em geral há requerimento da hospitalização o que pode resultar em uma taxa de mortalidade de até 2,5%. Por outro lado, quando não há o atendimento hospitalar a taxa de mortalidade pode atingir cerca de 20% (GUZMAN et al., 2002; BACK; LUNDKVIST, 2013).

A classificação da forma e da gravidade da doença pelos vírus Dengue tem sofrido alterações ao longo do tempo e atualmente a seguinte classificação é normatizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO), e que é adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil: 1- Dengue clássica – Febre entre dois a sete dias, além de náusea, vômito, dor retro-orbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia; 2 - Dengue com sinais de alerta: Além dos sinais anteriores, dor abdominal intensa e contínua ou dor à apalpação do abdome, vômitos persistentes, aumento progressivo do hematócrito, dentre outros; e 3 – Dengue Grave: Extravasamento grave de plasma que pode ser evidenciado por taquicardia, extremidades frias, pulso débil ou indetectável, hemorragias e outros sinais como alterações bioquímicas (WHO, 2009; BRASIL, 2015a).

Como já referido, a infecção pelos vírus Dengue leva a importante impacto na saúde pública, com estimativas de até 100 milhões de casos anuais ocorrendo em mais de

100 países, na região tropical e 500.000 pessoas exigindo hospitalização. Admite-se ainda que 50% da população mundial esteja sob o risco de se infectar (FALZARANO; FELDEMANN, 2013).

Estudo considerando 96 milhões de infecções sintomáticas pelos vírus Dengue em todo o mundo tendo como base o número populacional em 2010, estima que as Américas contribuam com 13 milhões das infecções, representando 14% do total global populacional sendo que destas, mais de 50% ocorreram no Brasil e no México (BHATT et al., 2013). Dados do Ministério da Saúde brasileiro apontam que até o final do primeiro trimestre deste ano de 2015 houve o registro de 460.502 novos casos da doença (BRASIL, 2015b).

Considerando as regiões brasileiras, a Sudeste apresenta até a presente data o maior número de notificações (304.251 casos/66,1%), seguido pelas regiões Centro-Oeste (59.855 casos/13%), Nordeste (51.221 casos/11,1%), Norte (19.402/4,2%) e Sul (25.773 casos/5,6%) (BRASIL, 2015b).

Em termos de gravidade, até o final do terceiro trimestre de 2015, houve confirmação de 235 casos de dengue grave e 2.967 casos de dengue com alarme, contra 169 casos graves e 1.605 casos de dengue com sinais de alarme no mesmo período do ano de 2014 (BRASIL, 2015a). Este dado reforça ser o País como de grande risco para a infecção (BATH et al., 2013) considerando ainda o aspecto da hiperendemicidade dada a ocorrência dos quatro sorotipos virais (GUBLER, 2012; GUIMARÃES, 2014).

1.2.1.3. Vírus Bussuquara (BSQV)

Como anteriormente referido, BSQV também pertence à família *Flaviviridae* e juntamente ao vírus Cacipacore, é agrupado filogeneticamente dentro do mesmo ramo, e separados do ramo dos vírus da Febre Amarela e Dengue (FIGUEIREDO, 2010). Até o momento conta-se com apenas um sorotipo do vírus.

BSQV foi isolado primeiramente no Brasil em 1956 em Belém-PA no Instituto Evandro Chagas/MS, a partir do hospedeiro sentinela, macaco bugio, *Alouatta beelzebul* (GOMES; CAUSEY, 1959). Em adição este foi também isolado a partir de roedor silvestre da espécie *Proechimys guyannensis* na Amazônia brasileira (VASCONCELOS, 1998) havendo ainda registros de sua ocorrência em outros países da América Central e do Sul: Panamá, Caribe e Colômbia (LOPES et al., 2014; CDC, 2015).

O vírus é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Culex* sendo os roedores os hospedeiros vertebrados principais, embora os PNHs também sejam

considerados hospedeiros importantes (LOPES et al., 2014). Ainda, o vírus tem também sido isolado na região amazônica em animais sentinelas e silvestres (FIGUEIREDO, 2007; LOPES et al., 2014; CDC, 2015).

Apesar de não se conhecer registros de epidemias em humanos por este vírus, este já foi isolado de um paciente no estado do Pará, em 1996, que apresentava quadro semelhante ao da infecção pelos vírus Dengue: febre, anorexia, cefaleia e artralgia (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO, 2007; LOPES et al., 2014).

1.2.1.4. Vírus Cacipacore (CPCV)

O isolamento inicial do vírus Cacipacore se deu também no Brasil, município de Oriximiná, Pará, em 1997, a partir de uma ave (*Formicarius analis*) (CDC, 2015). Subsequentemente, no Brasil, o vírus tem sido isolado, além de aves silvestres de roedores, morcegos, PNHs, marsupiais, ungulados, desdentados e de répteis. Admite-se que diferentes espécies de vetores possam transmitir o vírus os quais pertencem aos gêneros *Sabethes* e *Culex*. (LOPES et al., 2014).

Em 2011 foi registrado o primeiro caso em humano em um paciente no estado de Rondônia, admitido em tratamento intensivo num hospital da região, com sintomas semelhantes à leptospirose e febre amarela (BATISTA et al., 2011).

Não se conhece até o momento sorotipos diferentes do vírus e estudos sorológicos desenvolvidos no Brasil apontam similaridade do agente com os vírus do complexo da Encefalite Japonesa e Oeste do Nilo (BATISTA et al., 2001; BALEOTTI, 2002; BALEOTTI et al., 2003; FIGUEIREDO, 2010).

1.2.2. Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae*, contempla em torno de 100 tipos de vírus e compreende os gêneros *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Tospovirus* e *Orthobunyavirus*. O gênero *Orthobunyavirus* inclui cerca de 48 vírus considerados arbovirus, com destaque para os vírus Oropouche (OROV), Caraparu (CARV), Catu (CATUV), Guaroa (GROV), Maguari (MAGV), Tacaiuma (TCMV) e Belem (BLMV) (CDC, 2015; ICTV 2015).

Estes vírus mostram entre si variados graus de reatividade cruzada por testes sorológicos (BISHOP; SHOPE, 1979). A partícula viral mede cerca de 80 a 110 nm de diâmetro e possuem simetria helicoidal. O genoma é composto por três segmentos de RNA de fita simples, polaridade negativa, denominados Pequeno (PRNA), Médio (MRNA) e Grande (GRNA) responsáveis pela formação das proteínas estruturais do

nucleocapsídeo (N) e proteínas de superfície (Gn e Gc) e das não estruturais NSs, NSm e L, com função de RNA polimerase (GONZALEZ-SCARANO et al., 1996; SAEED et al., 2001; AQUINO; FIGUEIREDO et al., 2004) (Figuras 4 e 5).

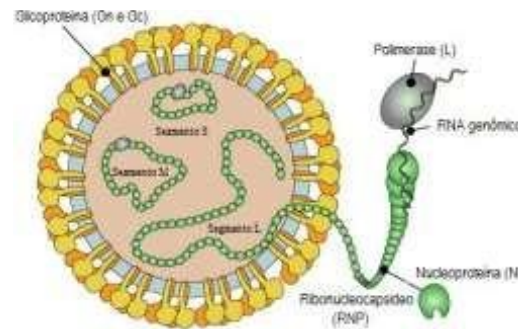


Figura 4. Representação esquemática de uma partícula viral do gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*: genoma tri-segmentado, glicoproteínas de superfície, GN e GC, ribonucleocapsídeo (RNP), nucleoproteínas (N) e RNA-polimerase (L). (Modificado).
Fonte: <http://viralzone.expasy.org>

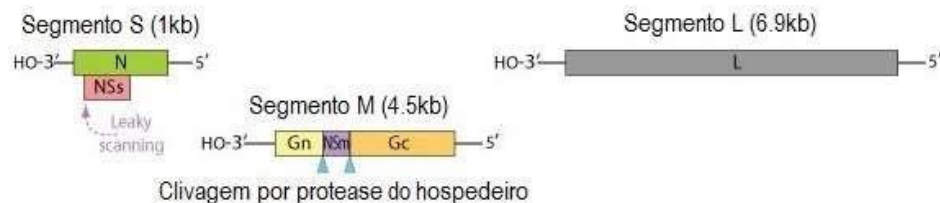


Figura 5. Diagrama esquemático da estrutura genômica de uma partícula viral do gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*: Segmento S (NS5); segmento M (Gn, NSm e Gc); Segmento L (RNA polimerase).
Fonte: <http://viralzone.expasy.org>

1.2.2.1. Vírus Oropouche (OROV)

Por análise filogenética do segmento do gene do nucleocapsídeo de OROV, tem sido identificado três distintos genótipos do vírus: I, II e III. Estes têm sido detectados nas Américas do Sul e Central, sendo que no Brasil os genótipos I e II têm sido isolados de humanos na Bacia Amazônica (SAEED et al., 2000) e o III na região sudeste, na cidade de Arinos-MG, de um macaco de vida livre do gênero *Callithrix* (NUNES et al., 2005).

O primeiro isolamento de OROV ocorreu em Trinidad, num vilarejo com o nome de Vega do Oropouche, a partir de um trabalhador rural e de um pool de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (ANDERSON et al., 1961). No Brasil o vírus foi isolado pela

primeira vez em 1960, a partir de amostras de um bicho preguiça (*Bradypus tridactylus*) e de mosquitos da espécie *Aedes serratus*, quando da construção da rodovia Belém-Brasília (PINHEIRO et al., 1962; PINHEIRO et al., 2004; NUNES et al., 2005; NUNES et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009).

Desde 1960 têm-se registros do vírus a partir de diferentes estados da região amazônica o que inclui além do estado do Pará, Acre, Amazonas, Amapá, Tocantins e Rondônia. Ainda, fora da região amazônica o vírus tem sido registrado na região nordeste do Brasil, estado do Maranhão, e em outros países da América do Sul, como o Peru e Panamá (PINHEIRO, 1962; WATTS et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011).

OROV é considerado importante arbovirose no Brasil em função da sua capacidade de levar a epidemias explosivas caracterizadas por doença febril aguda, bastante comum em cidades e vilarejos da região amazônica. No contexto, estima-se que mais de 500.000 casos de doença pelo agente tenham ocorrido desde a primeira epidemia reconhecida, em 1960 (MOURÃO et al., 2009; TERZIAN, 2009; VASCONCELOS et al., 2009).

Além da doença febril aguda tem sido observado que os pacientes também podem desenvolver fenômenos hemorrágicos espontâneos (petéquias, epistaxe e sangramento gengival) (MOURÃO et al. 2009). Tem sido admitido que estes vírus podem levar a uma doença sistêmica com viremia que pode durar até o quinto dia da infecção. Em adição, o agente já foi isolado de líquido cefalorraquidiano de um paciente com meningite asséptica o que levou à admissão de que o vírus poder atravessar a barreira hemato-meningoencefálica (PINHEIRO et al. 1997; BASTOS et al., 2012).

OROV, assim como o vírus da Febre Amarela, apresentam dois ciclos epidemiológicos: silvestre e urbano. Em áreas urbanas, o inseto *Culicoides paraensis* (família *Ceratopogonidae*) tem grande importância, e sobre os vetores silvestres, o que se sabe é que o *Aedes serratus* tem sido envolvido em epidemias na região central do País (FIGUEIREDO, 2007; CDC, 2015). Em relação ao ciclo silvestre, há evidências de que entre os vertebrados, além de preguiças, PNHs e algumas espécies de aves podem hospedar o vírus (PINHEIRO et al., 1997; NUNES et al., 2005).

1.2.3. Família *Togaviridae*

A família *Togaviridae* compreende os gêneros *Rubivirus*, que contempla o vírus da Rubéola e *Alphavirus* o qual compreende 31 espécies de arbovírus dentre os quais os

vírus Mayaro (MAYV), Encefalite Equina do Leste (EEEV), Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Encefalite Equina Venezuela (EEVV), Mucambo (MUCV) e Chikungunya (CHIKV) (FLORES, 2007; ICTV, 2015).

Os *Alphavirus* são vírus envelopados, têm simetria icosaédrica, possuem genoma RNA de fita simples, polaridade positiva com cerca de 11.000 pb e medem de 60 a 70 nm. O genoma conta com duas RLAs e duas regiões não codificantes nos terminais 5' e 3'. A RLA próxima ao terminal 5' codifica para uma poliproteína que após clivagem gera as proteínas não estruturais (NSP1-4). A RLA próxima ao terminal 3' codifica para outra poliproteína que é clivada para gerar as proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C) e glicoproteínas de superfície, E1, E2 e E3 além de uma pequena proteína de 6K. E1 e E2, têm papel representativo na indução de produção de anticorpos neutralizantes sendo que E2 também possui atividade hemaglutinante (ICTV, 2005; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014) (Figuras 6 e 7).



Figura 6. Representação esquemática do genoma de uma partícula viral do gênero *Alphavirus* família *Togaviridae* (POWERS, 2006. Modificado)

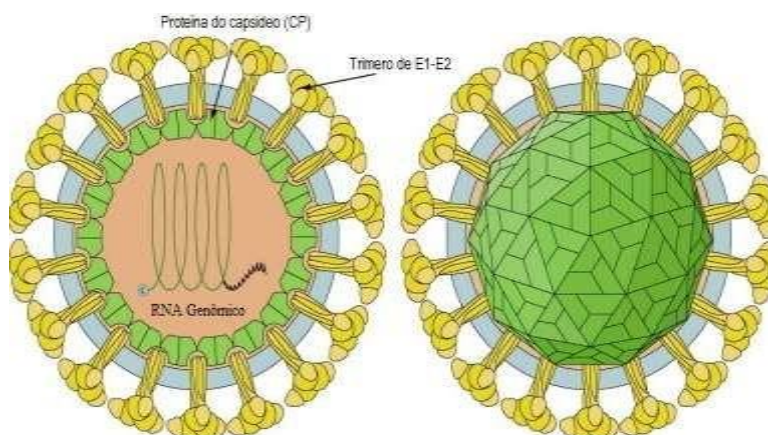


Figura 7. Representação esquemática de uma partícula viral do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (ZHANG et al., 2003. Modificado).

1.2.3.1. Vírus Mayaro (MAYV)

O vírus Mayaro apresenta, por análise filogenética, dois genótipos: D e L (POWERS, 2006; AZEVEDO et al., 2009). O primeiro isolamento do vírus se deu em 1954, também em Trinidad, a partir de amostras de sangue de trabalhadores de áreas de floresta (ANDERSON et al., 1957). No Brasil o vírus é endêmico na região amazônica e registros pontuais da doença, fora dessa região, têm sido associados a viagens para a região endêmica (MOURÃO et al., 2012; NEUMAYR et al., 2012). Não obstante, os vírus têm sido isolados de pessoas infectadas que residem em outras regiões da América do Sul bem como da América Central, o que inclui além de Trinidad, o Suriname, a Bolívia, a Guiana Francesa, o Peru e a Colômbia (PINHEIRO et al., 1981; AZEVEDO et al., 2009).

Tem sido observado que estes vírus podem desencadear infecção com dois padrões diferentes de evolução da doença: Encefalite com quadro de desmielinização ou não e doença febril com artralgia persistente (POWERS et al., 2006).

Como característica clínica comum da doença por Mayaro tem sido observada uma doença febril aguda, comumente acompanhada de cefaleia e fotofobia, mialgia e calafrios, artralgia que compromete principalmente punhos e tornozelos, dedos das mãos e dos pés, além de erupção cutânea. Ocasionalmente, pode haver edema acompanhado de dor nas articulações que pode persistir por um período de mais de um ano (PINHEIRO et al., 1981, POWERS et al., 2006). Desta forma, MAYV, similar aos vírus Dengue e Febre Amarela, são considerados importantes para a saúde pública em função da sua morbidade, que, conforme referido, podem levar a quadro de encefalite o que pode evoluir para curso fatal (CRUZ; VASCONCELOS, 2008).

Os vírus se mantêm na natureza num ciclo enzoótico tendo como hospedeiros vertebrados os primatas não humanos e como invertebrados, mosquitos do gênero *Haemagogus*, no seu ciclo silvestre. As aves também podem ser hospedeiras e apresentam papel importante na disseminação do vírus (VASCONCELOS; NUNES, 2012). Tem sido visto ainda que estes agentes podem se manter na natureza num ciclo silvestre envolvendo também bichos-preguiça (COIMBRA et al., 2007; FIGUEIREDO, 2007). Em geral, o homem se infecta com o vírus quando invade espaços de floresta ou sua proximidade (NEUMAYR et al., 2012).

Neste contexto, pequenas epidemias de doença febril exantemática têm sido associadas ao MAYV, transmitida pela espécie de mosquito *Haemagogus janthinomys* na população de zona rural da Região Amazônica (PINHEIRO et al., 1981; PINHEIRO;

LEDUC, 1986; VASCONCELOS et al., 1992; VASCONCELOS et al., 2001a; VASCONCELOS et al., 2001b; VASCONCELOS et al., 2001c). Também o vírus tem sido registrado em outro estado da região norte, Tocantins, cidade de Peixe. Em Goiás, cidade de Itarumã, já foi observado positividade ao vírus em humanos em um surto de doença supostamente associada aos vírus dengue (PINHEIRO et al., 1981; COIMBRA et al., 2007; AZEVEDO et al., 2009; NUNES et al., 2009; ZUCHI et al., 2014).

1.2.3.2. Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus Chikungunya é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. O nome do vírus deriva da língua Bantu do Makonde, que faz referência à postura curvada que o infectado adota, causada pelas dores articulares quando da infecção pelo vírus (ROBINSON, 1955; ENSERINK, 2007). Seu primeiro isolamento ocorreu em 1952 na Tanzânia na África Oriental, a partir do sangue de um humano infectado que apresentava quadro febril (ROBINSON, 1955; THIBERVILLE et al., 2013) o que foi seguido de sua identificação como patógeno humano em outros países da África e da Ásia (ROBINSON, 1955; JUPP; MCINTOSH, 1988 apud STAPLES et al., 2009).

Admite-se que CHIKV tenha se originado a partir da África, com posterior disseminação pela Ásia (HALSTEAD, 1992 apud SAM et al., 2006). Estudos de filogenia mostram a existência de três genótipos do vírus: 1- genótipo asiático; 2 – genótipo das regiões central e do leste da África; e 3 – genótipo da região oeste africana. (HASEBE et al., 2002; SAM et al., 2006). Neste contexto, há a admissão de que dois principais genótipos circulem e causem epidemias geograficamente localizadas: Nas Américas (Caribe e América Central) o genótipo asiático e no Velho Mundo, o genótipo centro africano (VASCONCELOS, 2014).

Em termos de ciclo epidemiológico de transmissão para CHIKV tem sido visto que na África ocorre tanto o ciclo silvestre quanto o urbano enquanto que na Ásia e regiões do Oceano Índico e Europa, tem sido observado o ciclo urbano (THIBERVILLE et al., 2013). Na África, o vírus é mantido no ciclo silvestre tendo como vertebrados primatas não humanos e como vetor mosquitos da espécie *Aedes luteocephalus*, *Ae. furcifer* ou *Ae. taylori*. Na Ásia, o vírus é transmitido do humano para o humano via *Ae. Aegypti*, e com menor frequência pelo *Ae. Albopictus* no ciclo de transmissão urbano (SCHUFFENECKER et al., 2006).

Importantes epidemias pelo vírus têm sido reportadas. A febre do Chikungunya é considerada uma doença reemergente de importância em saúde pública na África e

sudeste asiático. Os primeiros registros de epidemia ocorreram na República Democrática do Congo, Indonésia, Malásia e no Senegal (RUDNICK; LIM, 1986; THONNON et al., 1999; LAM et al., 2001; PASTORINO et al., 2004; LARAS et al., 2005). Duas epidemias são consideradas marcadamente mais importantes devido ao número de infectados: A primeira data de 2004 e foi registrada como tendo início na África, costa do Quênia com espalhamento para ilha de Comoros e após para outras ilhas no oceano Índico onde na ilha La Reunion levou a infecção de mais de 300.000 pessoas com uma taxa de ataque de cerca de 35% (ROBIN et al., 2008; WEAVER; REISEN, 2010). A segunda epidemia ocorreu em 2006 onde se observou a introdução de uma amostra na Índia a partir do leste da África, o que levou à ocorrência de mais de um milhão de casos. Epidemias têm sido associadas com infecção pelo CHIKV, com registro de excesso de morte, o que sugere que o vírus pode tornar-se mais virulento para humanos. Neste período observou-se complicações neurológicas, as quais não têm sido associadas com infecção secundária ou doença de base (REZZA et al., 2007; MAVALANKAR et al., 2008; WEAVER; REISEN, 2010).

O vírus continuou sua disseminação por outras partes do mundo e em 2007 registrou-se um caso importado de infecção pelo CHIKV na Europa, causando uma importante epidemia na Itália (REZZA et al., 2007; STAPLES et al., 2009).

Em 2013 foram detectados na América os primeiros casos autóctones de infecção pelos vírus, ocorrendo inicialmente na Martinica e Guadalupe (região do Caribe) com espalhamento viral de forma explosiva, sendo registrado um total de 585.000 casos suspeitos e destes, 4.356 foram confirmados laboratorialmente, com desfecho de 37 mortes pelo vírus (VASCONCELOS, 2014).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde brasileiro, em 2014, foram notificados 3.657 casos autóctones suspeitos de febre por Chikungunya, dos quais 2.772 foram confirmados, sendo 140 por diagnóstico laboratorial e 2.632, por critérios clínico-epidemiológicos, conforme orientação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015b). Dados de 2015, até a Semana Epidemiológica 12, mostraram notificação de 2.552 casos autóctones suspeitos dos quais 1.513 foram confirmados, sendo três destes por diagnóstico laboratorial e os demais por critérios clínico-epidemiológicos. Ainda, além dos casos autóctones, somam-se 100 casos importados notificados, que vão desde a Semana Epidemiológica 37 de 2014 até a Semana 12 de 2015, todos confirmados laboratorialmente. As Unidades da Federação onde foram feitos os registros são: Goiás,

Pará, Roraima, Maranhão, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2015b).

Alguns fatores têm sido associados à emergência do vírus Chikungunya na população humana, o que inclui: habilidade para infectar humanos os quais podem ser reservatório/amplificador único; envolvimento do *Ae. Aegypti* e em menor extensão do *Ae. Albopictus* como vetores para endemia e epidemia; dispersão do vírus através de pessoas infectadas para outras regiões; e alterações genéticas do vírus o que tem sido admitido resultar em habilidade aumentada para infecção do vetor (LANCIOTTI et al., 2007; KNUDSEN, 1995; ECDC, 2008).

Quando da infecção, uma minoria dos indivíduos permanece assintomático enquanto que a maioria desenvolve poliartralgia e mialgia, com importante comprometimento da qualidade de vida e necessitando de atendimento hospitalar. É característico uma recaída onde o infectado apresenta importante quadro de dores articulares. A idade avançada e pacientes pediátricos constituem-se em grupo de risco para doença severa (THIBERVILLE et al., 2013).

1.3. Primatas não Humanos

Mundialmente, existem 496 espécies de primatas não humanos (PNHs) registrados. Estão distribuídos na região equatorial de três continentes: Na América, região denominada Neotropical, que compreendem as florestas desde a região sul do México à região norte da Argentina. Na Ásia, pelo arquipélago da Indonésia, até as montanhas do sudoeste da China. No Continente Africano, nas regiões secas Sub-Saarianas, para as Savanas na Bacia do Rio Congo, e na África do Sul, presentes em região de vegetação típica de Fynbos (PRIMATE-SG, 2015). Na ordem Primates, existem 11 famílias e 60 gêneros de PNHs. Estes são divididos em dois grupos: Macacos do Velho Mundo (sub-ordem Catarrhini) e Macacos do Novo Mundo (sub-ordem Platyrrhini) com distribuição geográfica pela África, Ásia, Europa e pelas Américas, respectivamente. Os PNHs da sub-ordem Platyrrhini, são também denominados de primatas neotropicais (NOWAK, 1999).

O Brasil é o país com o maior número de primatas reconhecidos, estão registrados 140 táxons (espécies e subespécies) distribuídos em cinco famílias e 19 gêneros, sendo 83 endêmicos, e cerca de 40% das espécies encontram-se ameaçadas de extinção (OLIVEIRA et al., 2009; SBP, 2015). Estes animais apresentam uma proximidade

evolutiva com humanos, a partir de semelhanças biológica e comportamental (DEFLER, 2003).

Os PNHs neotropicais são classificados em cinco famílias: Atelidae, Cebidae, Callitrichidae, Aotidae e Pitheciidae (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009). A família Atelidae engloba a espécie *Alouatta caraya*, a família Cebidae a espécie *Cebus libidinosus* e a Callitrichidae a espécie *Callithrix penicillata*, (OLIVEIRA et.al., 2009). Os gêneros de PNHs neotropicais são suscetíveis a arbovírus e ocupam o mesmo espaço de insetos que podem ser vetores para estes vírus (BRASIL, 2005).

1.3.1. PNHs habitantes de parques do município de Goiânia

Os PNHs registrados nos parques e áreas verdes de Goiânia, Goiás, compõem as espécies classificadas dentro dos gêneros daqueles que têm sido associados com frequência na ocorrência de epizootias no Brasil (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014), que são: *Alouatta caraya*, *Cebus libidinosus* e *Callithrix penicillata*.

1.3.1.1. *Callithrix penicillata*

Os PNHs desta espécie são de pequeno porte e conhecidos popularmente como saguis. O peso oscila entre 350 a 450 gramas, possui o corpo fusiforme, a pelagem varia de uma coloração do cinza ao marrom e na região pré-auricular estão dispostos tufo de pelo enegrecido. Ademais, apresentam uma mancha branca na região frontal. Não possuem cauda preênsil. Possuem hábito diurno, formam grupos estáveis com dois machos, fêmeas e filhotes. Alimentam-se de seiva, flores e resinas e são arborícolas, dificilmente descem ao solo. Essa espécie não apresenta estação reprodutiva definida, a fêmea geralmente gesta dois filhotes (AZEVEDO; LEMOS, 2012) (Figura 8).



Figura 8. *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812).
Fonte: Laura Wiederhecker.

1.3.1.2. *Cebus libidinosus*

Conhecidos como macacos-prego, são de porte médio com peso em torno de 3 kg na fase adulta. O corpo também é comprido como o do *Callithrix*, porém a cabeça é grande e possui um topete característico. A coloração da pelagem varia de castanho avermelhado ao castanho claro, possuem orelhas semelhantes a da espécie humana. Os pés e mãos são nus e escuros e possuem cauda semi-preênsil o que ajuda no transporte de pequenos alimentos. Sua alimentação é generalista aprecia pequenos vertebrados, flores e resinas. Ocupa todos os estratos arbóreos. Não apresenta período reprodutivo definido, entretanto, a gestação parece ser sincronizada com a época de maior disponibilidade de alimento. Merece destaque, que dentre os macacos neotropicais, é o único que usa ferramentas para obtenção de alimentos (NOWAK, 1999; AZEVEDO; LEMOS, 2012) (Figura 9).



Figura 9. *Cebus libidinosus* (Spix, 1823)
Fonte: Marize Gibrail

1.3.1.3. *Alouatta caraya*

Os PNHs desta espécie são também conhecidos como bugios ou macacos guariba e são considerados de porte grande quando comparado às outras duas espécies citadas. O adulto pode atingir até 8 kg de peso, há dimorfismo de sexo sendo a fêmea ligeiramente menor e de pelagem castanho amarelada enquanto o macho possui maior porte e de cor negra. Os machos possuem uma barba que cobre o pescoço e parte da face. Estes animais são arborícolas, vivem em pequenos grupos sendo a dieta principalmente vegetariana. Não apresentam período reprodutivo definido, a gestação dura em torno de 190 dias e no geral com nascimento de apenas um filhote. A maturidade sexual para o macho é em torno dos sete anos de idade e para a fêmea cinco anos (AURICCHIO, 1995; REIS et al., 2005) (Figura 10).



Figura 10. *Alouatta caraya* (Humbolt, 1812).
Fonte: Marize Gibrail.

1.4. Diagnóstico laboratorial para arbovirus

Os arbovírus podem ser diagnosticados por diferentes procedimentos: Isolamento viral, Detecção de antígenos, Determinação de anticorpos específicos e do genoma viral a partir de espécimes de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), vísceras e órgãos, quando da espécie humana ou outros vertebrados, ou a partir de macerados de vetores invertebrados (BRASIL, 1998).

1.4.1. Isolamento Viral

O isolamento pode ser feito *in vivo* e *in vitro*. No primeiro caso podem ser utilizados diferentes animais de experimentação como os de pequeno porte com destaque para camundongos recém-nascidos, em geral de até três dias, bem como outros animais como hamsters, sendo o procedimento de inoculação do material suspeito por via

intracerebral (IC), intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) ou intramuscular (IM). Adicionalmente, embora, com maior raridade, podem ser utilizados animais de maior porte como os PNHs. Em todo caso, os experimentos são sempre feitos em duplicatas utilizando diluições seriadas da amostra teste e soros com anticorpos específicos para o vírus suspeito. Após inoculação, os animais são observados diariamente, durante duas a três semanas sendo procedida à definição da positividade considerando o status físico apresentado pelo animal ou pela presença de anticorpos específicos desenvolvido pelo animal, medidos por técnica sorológica (FENNER et al., 1974; PEREIRA et al., 2001).

O isolamento viral *in vitro* é feito a partir de culturas celulares que podem ser provenientes de vertebrados ou invertebrados. No primeiro caso têm-se as de maior aplicação as linhagens: VERO (de origem de rim de macaco verde africano), BHK-21 (origem de rim de hamster recém-nascido) e a LI-C-MK2 (de origem de rim de macaco Rhesus). Considerando as culturas celulares provenientes de invertebrados tem sido largamente utilizada: AP61, C6/36 e a TRA284, proveniente dos mosquitos *Ae. pseudoscutellaris*, *Ae. albopictus* e do mosquito *Toxorhynchites amboinensis*, respectivamente. No procedimento são inoculados material suspeito e observados microscopicamente diariamente visando observação de efeito citopático, sendo a definição da etiologia feita por provas de identificação (FENNER et al., 1974).

A identificação do isolado pode ser feita por diferentes métodos. Em geral, inicialmente, procede-se a uma identificação do grupo sorológico para o qual o vírus presumivelmente se enquadra o que é feito pelo teste de fixação de complemento (FC), usando soros hiperimunes contra os grupos de vírus mais comuns na área sob estudo. A identificação precisa da espécie viral é feita com soros imunes específicos usando como fonte de antígeno suspensões de cérebro e/ou fígado de camundongos infectados (controle positivo) e um soro heterólogo (controle negativo) (FENNER et al., 1974; FIGUEIREDO, 1986).

Outros testes que podem ser utilizados são os de Inibição da Hemaglutinação (IH), Soroneutralização (SN) e Imunofluorescência (IF) que pode ser direta ou indireta (FIGUEIREDO, 1990). No método direto, as células infectadas fixadas em lâmina são cobertas com soro contendo anticorpos marcados com o isotiocianato de fluoresceína (conjugado) e havendo especificidade, observa-se fluorescência. No método indireto, utiliza-se anticorpos monoclonais sendo que inicialmente as células infectadas são fixadas na lâmina e então se adiciona anticorpo específico e após o anti-anticorpo marcado com

isotiocianato de fluoresceína o que permite a formação do complexo fluorescente (FIGUEIREDO et al., 1986).

1.4.2. Detecção de antígeno viral

A detecção de antígeno de arbovirus pode ser feita por diferentes metodologias mas é comumente feita por IF tanto no formato direto quanto indireto utilizando fragmentos de órgãos criopreservados. Outra metodologia utilizada é a Imunohistoquímica onde se utiliza cortes de tecidos fixados em formol os quais são emblocados em parafina quando se adiciona uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) marcada com anticorpo específico (FENNER et al., 1974; HALL et al., 1991).

1.4.3. Detecção do genoma viral

Também diferentes procedimentos podem ser feitos para detecção do genoma de arbovírus. Um destes procedimentos é a Hibridização *in situ*, onde se utiliza membranas de nylon ou nitrocelulose onde o genoma viral, após extração, é marcado e visualizado a partir da hibridização a sondas as quais podem ser radioativas (radioisótopos) ou não radioativas (enzimas) (FARRELL, JR. 1993).

Um outro procedimento bastante utilizado é o da Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR), onde se obtém inicialmente o DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa (DNA-Polimerase-RNA-Dependente), quando então este é amplificado pela DNA polimerase-DNA dependente tendo como suporte iniciadores específicos ou randômicos. Esta metodologia pode ser complementada pela definição do genótipo infectante o que pode ser dar por um nova reação utilizando iniciadores internos ao primeiro produto da reação (nested PCR) ou por seqüenciamento genômico. O produto amplificado é visualizado a partir de gel pela adição de brometo de etídeo e os fragmentos analisadas pela comparação a um peso molecular padrão (STORCH; WANG, 2013).

1.4.4. Determinação de anticorpos

A determinação de anticorpos para arbovírus pode ser feita por diferentes metodologias tendo como finalidade a detecção de anticorpos totais ou da fração IgM. Neste sentido diferentes ensaios são utilizados como o ensaio imunoenzimático (EIE), a Inibição da Hemaglutinação (IH), a IF, a FC e a Soroneutralização (SN).

O EIE se baseia na formação de complexo antígeno-anticorpo, com posterior detecção destes complexos pela adição de um segundo anticorpo marcado com enzima. Após adição do substrato da enzima se observa a formação de cor o que é medido por espectrômetro em comprimentos de onda específicos (MAUÉS et al., 2003).

A reação de fixação do complemento se baseia no fato do complemento ter a capacidade de se fixar a complexos antígeno-anticorpo. Esta é realizada em duas etapas onde inicialmente o antígeno viral conhecido adicionado do soro teste é adicionado do Complemento. Se houver fixação deste ao complexo antígeno-anticorpo, após adição do complexo hemácia mais anticorpo anti-hemácia (hemolisina), não haverá lise das hemácias o que se revela em reação positiva para o soro teste. A reação de FC é considerada menos sensível do que a de IH, no entanto, mais específica. Os anticorpos FC aparecem após duas semanas do início da infecção e podem permanecer por até dois anos (FENNER et al., 1974).

O ensaio de IH é bastante utilizado principalmente em termos de triagem na rotina laboratorial bem como para estudos soropidemiológicos, uma vez que anticorpos IH são de longa duração. O ensaio possui boa sensibilidade e se fundamenta na capacidade da proteína E de arbovírus em aglutinar hemácias de ganso e assim anticorpos específicos do soro teste são capazes de inibir essa hemaglutinação. (FENNER et al., 1974; BRASIL, 1998).

O ensaio de soroneutralização se fundamenta na habilidade de anticorpo específico a um determinado vírus de neutralizar sua ação em um sistema vivo. Como acima referido, o ensaio pode ser feito tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O teste possui grau considerável de especificidade e é considerado como padrão ouro quando comparado a outros procedimentos sorológicos.

Os resultados são expressos baseados na diluição do soro que protege 50% dos animais ou da cultura de células contra uma quantidade definida de vírus (LD₅₀ ou TCID₅₀), ou redução do número de placas por uma porcentagem específica, quando se usa um determinado número de unidades formadoras de placas (PFU) (FENNER et al., 1974).

Adicionalmente, em se tratando dos vírus Dengue, principalmente em situações de epidemia, tem sido bastante utilizado os denominados ensaios rápidos que têm como princípio a imunocromatografia, que possibilita a detecção ao mesmo tempo de anticorpos IgM e IgG e do antígeno NS1 (KUNO et al., 1987; GUZMAN et al., 2010; GUIMARÃES, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

As arboviroses são relevantes em saúde pública considerando o potencial para infecção da população humana. Diferentes regiões do Brasil têm registros de epidemias causadas por esses vírus, apesar de ser a região Amazônica a maior fonte de infecção por arbovírus endêmicos. Os vírus Dengue, Mayaro, Oropouche, Febre Amarela e Rocio são exemplos de causas de epidemias em zonas rurais ou urbanas envolvendo importante número de registros em humanos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

Os Primatas não Humanos se revestem de grande importância para a sobrevivência de arbovírus na natureza podendo se constituir em amplificadores para a infecção de vetores durante o período virêmico, e assim elementos ponte para a transmissão para o humano e outros animais (BRASIL, 2007).

Áreas de vegetação remanescentes em geral são habitats de PNHs, além de artrópodes vetores. O município de Goiânia conta com várias destas áreas de vegetação que se apresentam em formatos de Parques Urbanos distribuídos homogeneamente. Ademais, o município conta com o Centro de Triagem de Animais -CETAS que além de apresentar parte de sua área coberta por áreas de vegetação, recebe animais silvestres, incluindo PNHs que ficam ali ambientados por tempo indeterminado.

Estes locais, Parques e o CETAS, contam com uma população importante de PNHs com destaque para os das espécies *Cebus libidinosus*, *Callithrix penicillata* e *Alouatta caraya*, além de possuírem vetores competentes para transmissão de diferentes arbovírus (NAVES et al., 1996). Em adição, principalmente os Parques Urbanos, são locais de participação de humanos acrescido da grande interação destes com a população de PNHs.

O presente estudo teve como foco investigar a presença de anticorpos para arbovírus em PNHs do município de Goiânia tendo como justificativa a inexistência de estudos prévios e o fato do risco residual de propagação destes vírus para a população humana (MONDET et al., 1996; BRASIL, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. . OBJETIVO GERAL

-Investigar o *status* sorológico para arbovírus em população de primatas não humanos das espécies *Alouatta caraya*, *Cebus libidinosus* e *Callithrix penicillata* no município de Goiânia, Goiás.

3.2. . OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Detectar anticorpos específicos para arbovírus em população de PNHs no município de Goiânia-Goiás;

-Determinar a soroprevalência da infecção por arbovírus na população estudada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento e áreas de estudo

No período de junho de 2011 a setembro de 2014, foram coletadas amostras de sangue de PNHs presentes em três Parques Urbanos, caracterizados como unidades de conservação municipal, e em um Centro de Triagem de Animais Silvestres/CETAS/IBAMA. A escolha dos locais para a coleta deveu ao fato dos animais habitantes dos três parques possuírem população estabelecida e por serem monitorados pela equipe técnica responsável pela fauna silvestre no município de Goiânia, além de oferecer estrutura física de apoio ao presente trabalho. As coletas foram feitas a partir de cinco investidas de campo conforme o Quadro 2.

Quadro 2. Distribuição dos PNHs estudados considerando os locais e datas da amostragem e respectivas espécies.

Local de coleta	Espécie de PNH	Número	Data coleta
CETAS	<i>Alouatta caraya</i>	05	Junho de 2011 e fevereiro de 2013
	<i>Cebus libidinosus</i>	15	
	<i>Callithrix penicillata</i>	03	
Parque Areião/Setor Pedro Ludovico	<i>Cebus libidinosus</i>	11	Agosto de 2014
Parque Jardim Botânico/Vila Redenção	<i>Cebus libidinosus</i>	07	Agosto de 2014
Parque Jardim Botânico/Setor Pedro Ludovico	<i>Cebus libidinosus</i>	09	Setembro de 2014
Total		50	

4.1.1. Descrição das áreas de estudo

4.1.1.1. CETAS/IBAMA

Localizado no Km 08 da BR-153, conta com uma área de 80.000m² em zona rural do município de Goiânia. Contava à ocasião da coleta com 24 PNHs ambientados (Informação pessoal)¹.

¹ Informações fornecidas pelos Analistas Ambientais/CETAS/IBAMA – Luiz Alfredo e Léo Caetano, em 11/03/2015.

4.1.1.2. Parque Areião/Setor Pedro Ludovico

Situado na região sul da cidade, com área total de 228.019,64 m², sendo 87.770,27 m² de cobertura vegetal (AMMA, 2015). Contava à época da coleta com 40 PNHs.

4.1.1.3. Jardim Botânico/Vila Redenção

Localizado na região sul, possui uma área de 542.425,03 m² com cobertura vegetal de mata ciliar e parte desta alterada pelas ocupações humanas (AMMA, 2015). Contava à época da coleta com 30 PNHs.

4.1.1.4. Jardim Botânico/Pedro Ludovico

Localizado na região sul, com área de 421.806,37 m² de cobertura vegetal (AMMA, 2015). Contava à época da coleta com 40 PNHs.

4.2. População de estudo

A investigação foi realizada utilizando 50 PNHs, sendo pertencentes à espécie *Cebus libidinosus*, dos quais 27 são habitantes de três parques urbanos da cidade de Goiânia e 15 são ambientados no CETAS-IBAMA. Os outros oito PNHs também são ambientados no CETAS-IBAMA, sendo cinco deles da espécie *Alouatta caraya* e três da espécie *Callithrix penicillata*.

O número de animais amostrados correspondeu a 37,3% (50/134) da população total sendo que para os animais dos Parques Urbanos este foi de 24,5% (27/110) e para o CETAS foi de 95,8% (23/24). O número reduzido de animais estudados nos três Parques se deu pela dificuldade de captura.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da UFG (processo no. 32/2014) (Anexo I), bem como Sistema de Informação em Biodiversidade-SISBIO (no. 24629) (Anexo II).

4.3. Metodologia

A metodologia utilizada no presente estudo é sumarizada na figura abaixo (Figura 11).

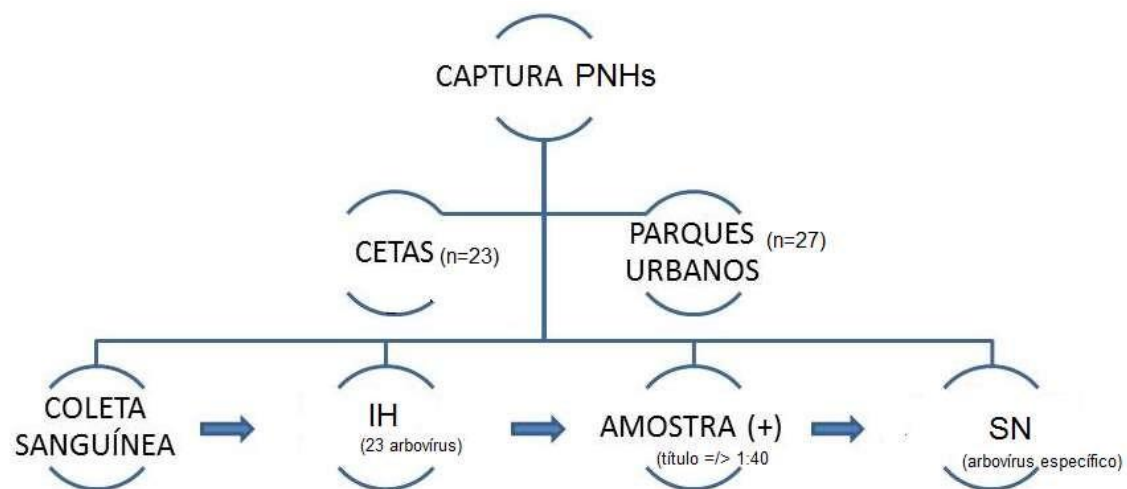


Figura 11. Fluxograma da coleta até o processamento das amostras de soro dos 50 PNHs estudados.

Fonte: Laboratório de Virologia / 2015.

4.3.1. Captura dos PNHs

O procedimento de captura e subsequente coleta do espécime clínico, foi realizado seguindo preconização do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005) com ligeira modificação. No contexto, de todos os animais foram coletados de 3 a 10 mL de sangue, dependendo da espécie de PNH, por punção venosa femoral ou braquial, após sedação prévia e sempre assistido por profissional médico-veterinário.

A captura dos animais foi feita por meio de atração para armadilha do tipo “Tomahawk”, com dimensão de 1,5m x 2,0m (Figura 12) tendo como estratégia o oferecimento de alimentação no interior da armadilha (Figura 13).



Figura 12. Armadilha tipo “Tomahawk” utilizada para captura dos PNHs.
Foto: GEFAU/AMMA/2014.



Figura 13. Condicionamento (ceva) dos animais dentro da armadilha de captura.
Fonte: GEFAU/AMMA/2014.

Após captura, os animais foram submetidos à contenção química pela administração intramuscular de 2,0 mg/Kg da associação de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil 50®). Parâmetros fisiológicos como frequência respiratória e cardíaca, reflexos oculares e temperatura foram monitorados durante todo o tempo, até o término da sedação. A captura de cada animal foi feita apenas uma vez, garantido pela aplicação de um microchip após a sua apreensão.

4.3.2. Processamento das amostras de sangue

Após coleta, as amostras foram enviadas, sob refrigeração, ao IPTSP/UFG, onde foram centrifugadas (5 minutos a 3.000 rpm) para obtenção do soro, acondicionadas em duas alíquotas e estocadas a -70°C.

4.3.3. Análise das amostras de soro

As amostras de soro, devidamente acondicionadas, foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas-IEC em Belém-PA para os procedimentos laboratoriais. Estes foram realizados no Laboratório de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, referência nacional e internacional para arbovírus, o qual possui condições de trabalho com nível de biossegurança 3, NB- 3 (FIOCRUZ, 2015).

No IEC todas as amostras foram inicialmente submetidas ao ensaio de IH, sendo testadas para 23 arbovírus circulantes na região amazônica: vírus da Encefalite Equina do Leste, Encefalite Equina do Oeste, Mayaro, Mucambo, Febre amarela, Bussuquara,

Cacipacore, Ilheus, Encefalite Saint Louis, Naranjal, Rocio, Caraparu, Catu, Guaroa, Maguari, Oropouche, Tacaiuma, Belem e Icoaraci além dos vírus Dengue-1-4. Os respectivos antígenos foram preparados a partir de inoculação intracerebral (IC) em camundongos recém-nascidos.

4.3.3.1. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (IH)

O ensaio de IH foi feito conforme o protocolo descrito por Clarke; Casals (1958) e adaptada para microplacas por Shope (1963), utilizando placas de 96 orifícios, fundo em U. Inicialmente as amostras de soro foram triadas frente aos 23 antígenos virais e em seguida procedeu-se à titulação daquelas que se apresentaram positivas no ensaio de triagem.

Para a realização do ensaio, as amostras de soro foram primeiramente tratadas com acetona 100% e Cloreto de Sódio a 0,85% e após secagem em bomba de vácuo, foram hidratadas com Solução Salina Borato pH 9,0 e então adsorvidas com hemácias de ganso (*Anser cinerius*) em solução albumina bovina 0,4% pH 9,0. Após incubação, 30 minutos a 4°C, os soros foram centrifugados (2.000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante foi estocado a 4°C até o uso.

a) Triagem das amostras de soro por IH

No procedimento de triagem, as amostras tratadas foram diluídas a 1:20 e cada uma, como acima referido, foi testada frente aos 23 antígenos específicos com 4 UH (unidades hemaglutinantes), previamente determinada. Após incubação a 4°C por 12 horas foi acrescentada a solução de hemácias de ganso (*Anser cinerius*) na diluição 1:5 em DGV (Dextrose, Gelatina, Veronal) pH 6-7. Após incubação por 30 minutos a 37°C, ou temperatura ambiente (apropriada para cada vírus), as placas foram novamente incubadas a 4°C por 4 horas quando então se procedia à leitura visual da reação. A reação foi considerada positiva quando o soro teste inibia a hemaglutinação das hemácias ao antígeno específico.

b) Titulação das amostras de soro positivas por IH no ensaio de triagem

Para o procedimento de titulação das amostras de soro, procedeu-se inicialmente à diluição seriada das mesmas (1:20 até 1:640) em solução albumina bovina 0,4% pH 9,0. A seguir a cada orifício foi adicionado o antígeno específico (4UH) para o qual a amostra foi positiva no teste de triagem. A seguir as amostras foram incubadas a 4°C por 12 horas

quando então foi adicionada a solução de hemácias de ganso nas mesmas condições prévias. Após nova incubação por 30 minutos em temperatura adequada ao vírus (temperatura ambiente ou a 37°C), foi feita a leitura da reação sendo o título considerado como a recíproca da mais alta diluição com inibição da hemaglutinação completa. Para cada reação foi assegurado um controle de hemácias, de antígeno e do soro teste.

4.3.3.2. Ensaio de Soroneutralização (SN)

Foram testadas por SN amostras de soro que apresentaram positividade pelo IH com título igual ou maior que 1:40. O ensaio foi feito como descrito por Beaty et al (1989) e modificado por VASCONCELOS e colaboradores (2001a, c) utilizando camundongos recém-nascidos (1 a 3 dias). No procedimento, para cada diluição da amostra de soro foi utilizado um total de 06 camundongos, considerando três diluições de cada antígeno. Inicialmente, cada amostra de soro foi dividida em três alíquotas, as quais foram então diluídas a 1:5 em PBS (solução salina fosfato) pH 7,2 quando se acrescentou a cada alíquota, uma das três diluições do antígeno específico (positivo pelo teste de IH). As diluições dos diferentes antígenos foram definidas em função da titulação original do antígeno, sendo uma delas de diluição menor, a outra correspondente ao título inicial e a terceira na diluição maior, em relação à inicial. Estas diluições também foram feitas em PBS e ao final a mistura soro e antígeno resultou em uma diluição de 1:10 (Figura 14).

A mistura foi incubada por 60 minutos a 37° C e após banho de gelo procedeu-se à inoculação dos camundongos o que foi feito pela via intracerebral em um volume de 20µL para cada animal. Para cada reação foi incluído um soro controle negativo e um soro controle positivo. Os camundongos foram observados diariamente por até 21 dias, e para cada grupo de animais infectados era anotado em um cartão de inoculação qualquer alteração eventualmente observada.

A leitura e interpretação do ensaio foi feita mediante o cálculo obtido individualmente por grupo inoculado sendo considerado o índice logarítmico de neutralização de cada soro usado no teste (grupo de 6 camundongos/diluição) pela subtração da sua dose letal para 50% dos animais inoculados (LD₅₀) do título médio obtido nas titulações. O cálculo do título de LD₅₀ foi feito pelo método de REED; MÜENCH (1938). Os resultados foram expressos como índice de neutralização (IN), log 10, sendo um soro com um $IN \geq 1,7$, considerado como positivo.

5. RESULTADOS

5.1. Reação de Inibição da Hemaglutinação:

Do total de PNHs estudados (n=50), seis (12%) apresentaram soropositividade para arbovírus sendo um destes animais habitante do Parque Areião, espécie *Cebus libidinosus*, e os demais ambientados no CETAS-IBAMA, espécies *Cebus libidinosus* (n=2), *Alouatta caraya* (n=2) e *Callithrix penicillata* (n=1). Quatro dos seis animais apresentaram positividade para mais de um tipo de arbovírus, conforme quadro a seguir (Quadro 3).

Quadro 3. Positividade para arbovírus em PNHs do município de Goiânia pelo ensaio de Inibição da Hemaglutinação (IH), considerando a espécie, o título de anticorpos e o local onde se procedeu a coleta.

Local	Nº Animal	Espécie	Vírus	IH - Título
Parque Areião	02	<i>Cebus libidinosus</i>	Cacipacore Dengue -1	1:40 1:40
CETAS	10	<i>Cebus libidinosus</i>	Bussuquara	1:40
	11	<i>Cebus libidinosus</i>	Mayaro Oropouche Cacipacore Bussuquara Dengue-1, 3 e 4	1:20 1:640 1:20 1:20 1:20
	12	<i>Alouatta caraya</i>	Oropouche Bussuquara Cacipacore	1:320 1:20 1:20
	20	<i>Alouatta caraya</i>	Oropouche	1:320
	23	<i>Callithrix penicillata</i>	Dengue -1, 3 e 4	1:20

5.2. Reação de Soroneutralização:

Do total de amostras de soro positivas pela reação de IH, cinco apresentavam títulos igual ou maior que 1:40 para diferentes arbovírus). Quatro destas amostras foram testadas pelo ensaio de Soroneutralização: para o vírus Cacipacore (título 1:40- animal 02) e as outras três para o vírus Oropouche (animal 11- título 1:640; animal 12- título 1:320; e animal 20- título 1:320). Foi observada confirmação da positividade apenas para duas amostras de soro, ambas para o vírus Oropouche, animais 12 e 20 (espécie *Alouatta*

caraya), ambientados no CETAS-IBAMA, com IN de 2,9 e 2,8 respectivamente (Quadro 4). Considerando que do total de amostras estudadas (n=50), duas confirmaram positividade para arbovírus, tem-se um percentual de 4,0% de animais soropositivos.

Quadro 4. Positividade pelo teste de Soroneutralização (SN) para arbovírus, observada em PNHs do município de Goiânia, Goiás, por espécie animal.

Espécie	No. Animal	IN	Vírus	Resultado
<i>Cebus libidinosus</i>	02	0,4	Cacipacore	Negativo
<i>Cebus libidinosus</i>	11	0	Oropouche	Negativo
<i>Allouatta caraya</i>	12	2,9	Oropouche	Positivo
<i>Allouatta caraya</i>	20	2,8	Oropouche	Positivo

6. DISCUSSÃO

As arboviroses são doenças associadas a vírus com características do ponto de vista ecológico bem definidas. Têm distribuição geográfica que abrange todos os continentes, excetuando-se os países de clima temperado onde a relação de vetores com os hospedeiros vertebrados é interrompida (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997). O Brasil possui características geográficas que favorecem a disseminação dos arbovírus por possuir um terço do seu território ocupado por formações florestais, tendo como característica marcante alta densidade de ciclos que envolvem vetores e hospedeiros vertebrados em áreas urbanas e periurbanas (CALISHER; KARABATSOS, 1988; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; FIGUEIREDO, 2007; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014).

Em 2008, dados do Ministério da Saúde confirmaram 25 óbitos de humanos causados por um dos mais importantes arbovírus para a saúde pública no Brasil, o vírus da Febre Amarela (BRASIL, 2008). Em Goiás, Goiânia, este evento foi precedido de epizootia em primatas não humanos (BRASIL, 2007; BRASIL, 2008).

Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a soroprevalência para arbovírus em PNHs do município de Goiânia considerando a importância destes animais como possíveis reservatórios para estes vírus na natureza e na possibilidade de propagação para o ambiente urbano. Em assim sendo, a presente investigação utilizou como parâmetro a detecção de anticorpos específicos para arbovírus tendo como ferramenta de triagem o teste sorológico de Inibição da Hemaglutinação e como confirmatório a Soroneutralização.

O ensaio de IH é considerado adequado para a detecção de anticorpos para arbovírus a partir de diferentes hospedeiros incluindo os PNHs, desde que o teste é considerado sensível, de fácil execução e requer equipamentos simples (CASSEB et al., 2014). Desta forma esta tem sido a metodologia utilizada em diferentes estudos realizados também com PNHs e recentemente com búfalos no estado do Pará (TIGNOR; PRICE, 1971; VASCONCELOS et al., 1991; TALARMIN et al., 1998; BATISTA et al., 2013; CASSEB et al., 2014).

Em assim sendo, no presente estudo, das 50 amostras de soro analisadas pelo teste de IH, foi observado positividade de anticorpos em amostras de seis animais, considerando a titulação mínima de 1:20 o que resultou em uma soroprevalência de

anticorpos para arbovírus de 12%. Ao se comparar este dado com outros da literatura observa-se que este percentual é inferior ao de um estudo realizado na região Centro-Oeste do Brasil, Mato Grosso do Sul, onde foi observado o percentual de 31,2%, obtido de cinco de 16 animais estudados (BATISTA et. al., 2013). Esse fato, talvez possa estar relacionado à condição ambiental dos PNHs do município de Goiânia, que apesar de serem de vida livre, os parques urbanos onde estão estabelecidos, apresentam-se como remanescentes de vegetação circundados por áreas antropizadas que impedem o fluxo contínuo de vetores e hospedeiros, sem excluir a possibilidade de detecção desses agentes, quando se compara ao tipo de ambiente de mata contínua no estudo de BATISTA et al (2013), tendo portanto, uma maior probabilidade de infecção de hospedeiros vertebrados, como os PNHs naquele estudo. Há que se lembrar, que exceto as infecções por OROV e DENV os arbovírus ocorrem naturalmente em ambientes silvestres, envolvendo vetores infectados competentes e hospedeiros vertebrados suscetíveis (CASSEB et al., 2013).

A soropositividade por IH foi observada para os vírus Cacipacore, Bussuquara, Dengue, sorotipos 1, 3 e 4, Oropouche e Mayaro sendo que dos seis animais soropositivos, quatro apresentaram anticorpos para mais de um tipo de vírus. Esta condição foi também observada no estudo realizado na região Centro Oeste onde se observou positividade para agentes dos gêneros *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (vírus Cacipacore), *Alphavirus*, família *Togaviridae* (vírus Mayaro) e *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae* (vírus Oropouche) (BATISTA, et al., 2013). Considerando resultados não monotípicos, também estudo realizado na região Centro Oeste, Mato Grosso do Sul, mostrou positividade por IH para mais de um tipo de arbovírus em um mesmo animal (BATISTA, et al., 2012) mantendo-se o que se observa naturalmente em resultados de vigilância sorológica para animais sentinelas, em relação ao *status* sorológico dos animais silvestres (BRASIL, 2014).

Esta situação, anticorpos para mais de um tipo de arbovírus, pode ser admitido como infecção por todos estes agentes ao longo da vida do animal, mas, também, por reatividade cruzada, que pode ocorrer tanto pelo ensaio utilizado quanto pelo relacionamento antigênico entre os vírus (YAMADA et al., 2002; KAO et al., 2005; SILVA, 2008).

Neste sentido, tomando a última assertiva como pressuposto, dos vírus identificados por sorologia de IH três agentes pertencem a família *Flaviviridae*: vírus Cacipacore, Bussuquara e Dengue. É de conhecimento que vírus desta família mostram

reatividade antigênica cruzada em maior ou menor grau (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; CDC, 2015). Desta forma, os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* contam também com uma classificação antigênica de forma a agrupá-los em complexos e subcomplexos antigênicos (CALISHER, 1988; SIMMONDS et al., 2011 apud GO et al., 2014) com base principal no relacionamento sorológico (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; GUBLER et al., 2007) genético e etiológico. Existem três complexos de Flavivírus, os quais incluem importantes agentes patogênicos para humanos, e são didaticamente subdivididos a partir do artrópode vetor, carrapato, mosquito, ou vetor desconhecido (KUNO et al., 1998; GO et al., 2014). Considerações por análise filogenética para os flavivírus brasileiros, transmitidos por mosquitos, tem-se o grupo antigênico dos vírus Dengue e da febre amarela, além dos vírus integrantes do complexo da Encefalite Japonesa, onde se inclui os vírus Cacipacore e Bussuquara, (BALEOTTI et al., 2003). Em assim sendo estes dois últimos vírus não pertencem ao complexo dos vírus Dengue ou da Febre Amarela e desta forma poderiam estar significando infecções múltiplas no mesmo PNH: animais 02 e 11, ambos da espécie *Cebus libidinosus*. Similar sugestão poderia ser dada para o animal 12, que embora positivo para os vírus Cacipacore e Bussuquara também mostrou positividade para o vírus Oropouche o qual pertence à família *Bunyaviridae* cujos representantes não mostram reatividade cruzada com flavivirus. Esta mesma sugestão não pode ser aplicada ao animal 23, que se mostrou positivo para três sorotipos do vírus Dengue.

Como anteriormente referido, o ensaio de IH é bastante adequado para se investigar a presença de anticorpos para arbovírus uma vez que permite ao mesmo tempo que um grande número de amostras seja testada contra uma diversidade de arbovírus (RODRIGUES et al., 2010). Não obstante, embora seja dotado de boa sensibilidade, possui menor especificidade que outros testes sorológicos como, por exemplo, a soroneutralização, o que poderia refletir numa falsa identificação de anticorpo para mais de um tipo de arbovírus em um mesmo animal, considerando reatividade cruzada. Em adição deve ser levado em conta que anticorpos contra grande número dos agentes foram identificados com título menor que 1:40, excetuando-se os vírus Dengue – 1 (animal – 2), Bussuquara (animal – 10), Cacipacore (animal – 02) e Oropouche (animais 11, 12 e 20) o que poderia estar mais uma vez refletindo as características do ensaio.

O teste de Soroneutralização foi realizado para amostras de soro positivas para os vírus Cacipacore e Oropouche com título igual ou maior que 1:40 tendo havido

confirmação de resultados de duas amostras para o vírus Oropouche, animais 12 e 20, ambos da espécie *Alouatta caraya*, os quais eram ambientados no CETAS-IBAMA.

Considerando as amostras de soro com título 1:40, para Bussuquara e Dengue-1, para as quais não foram realizados a confirmação por SN, tem-se a impossibilidade de definição real do quadro. Entretanto, o resultado obtido por IH sugere a possibilidade de infecção de PNHs por estes vírus. Neste sentido, em contraste ao vírus da Febre Amarela, a infecção por DENV em PNHs do velho e do novo mundo são em geral assintomáticas ou brandas com baixa viremia e de breve duração, mas com desenvolvimento de anticorpos neutralizantes em resposta à infecção (SCHLESINGER et al., 1986; RHODAIN, 1991). Por outro lado, PNHs infectados com DENV humano são capazes de transmitir o vírus para mosquitos mesmo em situação de viremia indetectável (SCOTT et al., 1980; WATTS et al., 1987) o que poderia facilitar a transmissão para o homem.

Ademais, admitida a similaridade de susceptibilidade para DENV humano entre primatas existe a sugestão de que DENV humano possa se espalhar para PNHs em áreas onde não existe o ciclo silvestre com possibilidade de estabelecer o ciclo, similar ao ocorrido com o vírus da Febre Amarela nas Américas (VASILAKIS et al., 2008; BRASIL, 2005). Admite-se que se assim vier a ocorrer, estabelecimento do ciclo silvestre para DENV, impossível se torna a sua erradicação e neste sentido, a estratégia principal para prevenir o evento se daria pela combinação de rigorosa vigilância de arbovírus em populações de PNHs em áreas onde atividade humana e de macacos intersectam, acoplado com estudos experimentais da dinâmica da infecção e manifestações clínicas do DENV silvestre em ambas as linhagens de primatas (VASILAKIS et al., 2008).

Como já referido, o Brasil é considerando um dos países com maior disseminação pelos vírus Dengue respondendo por aproximadamente 70% dos casos notificados da doença nas Américas (SIQUEIRA JR et al., 2005; MACIEL et al., 2008). Goiânia se inclui entre os estados principais da Federação onde a endemicidade para os quatro sorotipos está bem estabelecida com surtos epidêmicos anuais (GUBLER, 2012; GUIMARÃES, 2014).

Desta forma, muito embora anticorpos para DENV só tenham sido identificados por IH, consideramos que este resultado não pode ser desprezado em função até da possibilidade de extravasamento do vírus a partir do ciclo humano. Esta especulação, consideramos, pode ter suporte no fato da importante interação humana – PNH que ocorre nos Parques Urbanos de Goiânia.

Similar ao ocorrido para o vírus Dengue-1, o vírus Bussuquara foi identificado por IH com título de 1:40 em um animal ambientado no CETAS-IBAMA e que apresentou soropositividade para apenas este agente. Este vírus tem história importante na Amazônia brasileira, tendo sido isolado pela primeira vez na região em 1956 a partir de PNHs sentinelas da espécie *Alouatta beelzebul* (GOMES; CAUSEY, 1959; CDC, 2015). Em adição, embora não se tenha registro de epidemias por este vírus na população humana, tem sido observado que este infecta humanos (GUBLER et al., 2007) e que quando da infecção este apresenta sintomatologia importante caracterizada por febre, dores articulares e cefaléia. Neste contexto a importância do agente para a população humana tendo ainda como indicador não só o fato do seu potencial para infectar PNHs e roedores (GUBLER, 2002; LOPES et al., 2014) mas, também, em função da infecção de mosquitos do gênero *Culex*, vetor também encontrado nas áreas estudadas (NAVES et al., 1996). Dessa forma, entendemos que não terem sido confirmados a especificidade dos anticorpos por SN, fica caracterizada uma das limitações desse estudo, permanecendo a necessidade da confirmação.

Neste sentido, o achado do presente estudo pode ser considerado de alerta, pois, embora não se tenha registros prévios da infecção em humano no estado de Goiás, o fato de existir nas áreas do estudo o mosquito vetor para o agente, reforça a preocupação sobre a possibilidade do extravasamento do vírus para a população humana na região.

Como referido, no presente estudo, uma amostra de soro foi positiva para o vírus Cacipacore com título de 1:40 pela IH embora não confirmado pelo ensaio de soroneutralização. Não obstante, considerando a validade do teste de IH, consideramos de importância lembrar que este vírus tem sido isolado no Brasil a partir de diferentes tipos de animais silvestres (morcegos, edentados, marsupiais, ungulados, roedores, primatas e répteis) (FIGUEREDO, 2000; LOPES et al., 2014; CDC, 2015) desde o seu primeiro isolamento, no Brasil, a partir de aves da espécie *Formicarius analis*, em 1977 (KARABATSOS, 1985). Em adição, diferentes vetores são admitidos para transmissão do vírus que inclui além de mosquitos do gênero *Culex*, mosquitos do gênero *Sabethes* o qual também é encontrado nas áreas de estudo desta investigação (NAVES et al., 1996). No estado de Goiás, similar à epidemiologia para o vírus Bussuquara, não se tem informações sobre a infecção por estes vírus em humanos. Não obstante esta já foi vista na região Norte do Brasil, onde o vírus foi isolado de um paciente que apresentava sintomatologia similar à Leptospirose e Febre Amarela (BATISTA et al., 2011). Ressalta-se que este paciente era habitante de área rural e desta forma a possibilidade de se infectar

com arbovírus silvestre, seja pela sua introdução na região de mata seja pela possibilidade de o vírus ter adentrado a área rural via um animal silvestre ou por mosquito vetor.

Em assim sendo, e embora não se tenha relatos de epidemias devidas a este vírus na população humana bem como, repetimos, da ocorrência deste em humanos no estado de Goiás, consideramos que a positividade no referido PNH também pode servir de alerta no sentido da possibilidade do extravasamento para a população urbana do município de Goiânia, considerando ainda o forte contato de humanos com a população de PNHs nos Parques Urbanos.

Dados da literatura mostram que o vírus Oropouche é transmitido no ciclo silvestre pelo *Ae. serratus* e no ambiente urbano pelo *Culicoides paraensis* e pode provocar no humano, doença febril podendo evoluir para meningite asséptica (PINHEIRO et al., 1997).

Ademais, têm-se relatos de epidemias pelo agente em cidades e vilarejos da região amazônica desde 1960 (PINHEIRO et al., 1962; TERZIAN et al, 2009; MOURÃO et al., 2009; VASCONCELOS, 2009). E ainda, na região Sudeste do Brasil, tem sido visto casos de doença pelo vírus em humanos (FIGUEIREDO et al., 1986; RODRIGUES, 2007) bem como em PNHs (NUNES et al. 2005).

Neste contexto, tendo como parâmetro a grande possibilidade de epidemias pelo vírus Oropouche, este tem sido considerado uma das principais ameaças em Saúde Pública em áreas tropicais e subtropicais das Américas do Sul e Central (NUNES et al., 2005). Em assim sendo, muito embora a não existência de dados referentes à infecção de humano no estado de Goiás, o fato da detecção de anticorpos contra este agente ter sido observado em PNHs deve ser considerado de grande relevância pois potencialmente poderia facilitar a entrada do mesmo em população humana, com o potencial para episódio epidêmico. Destaca-se ademais que muito embora não se tenha registro do mosquito vetor *Culicoides paraensis* na área urbana de Goiânia o município conta com outras espécies de culicoides que potencialmente podem ser vetores do vírus (NUNES et al., 2008).

Finalmente, consideramos de relevância os resultados do presente estudo onde se observou positividade de anticorpos para sete tipos de arbovírus, em seis PNHs do município de Goiânia, dos quais quatro vírus, em cinco amostras de soro, tinham pelo ensaio de IH título igual ou maior que 1:40. Ainda, embora apenas dois destes quatro vírus, totalizando quatro amostras de soro, tenham sido testados por Soroneutralização, com confirmação para apenas o vírus Oropouche em amostras de soro de dois PNHs,

consideramos que os dados, resultantes do primeiro estudo realizado com este tipo populacional no estado de Goiás, devam ser tomados como sinal de alerta no sentido da possibilidade da entrada destes agentes para a população humana do município de Goiânia.

Esta sugestão, reiteramos, tem suporte no fato da importante interação humana – PNH que ocorre nos Parques Urbanos de Goiânia e que se extrapola para o CETAS-IBAMA uma vez que, em geral, os animais que ali se encontram ambientados são oriundos de áreas de preservação.

Ademais consideramos que outros estudos devam ser realizados ainda com a perspectiva de monitoramento continuado tendo como suporte animais sentinela.

7. CONCLUSÕES

- As espécies de primatas não humanos *Alouatta caraya*, *Cebus libidinosus* e *Callithrix penicillata* apresentaram positividade de anticorpos frente a sete tipos de arbovírus das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae*.
- Por IH, os anticorpos detectados eram dirigidos para os vírus Cacipacore, Bussuquara e Dengue - 1, 3 e 4 (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), vírus Mayaro (gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) e Oropouche (gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*).
- Por SN, houve confirmação de anticorpos específicos contra o vírus Oropouche nas amostras de soro de dois PNHs da espécie *Alouatta caraya*.
- Considerando a soroprevalência de anticorpos para arbovírus, observou-se que por IH esta foi de 12% (6/50) e por SN de 4% (2/50).
- Este foi o primeiro registro de evidência da circulação do vírus Oropouche para a espécie *Alouatta caraya* no estado de Goiás, pelas técnicas de IH e SN e reforça a importância da vigilância soropidemiológica em primatas não humanos como animais “sentinelas naturais” visando detecção precoce de agente patogênico com potencial epidêmico explosivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMA, Agência Municipal de Meio do Meio Ambiente – Goiânia. Disponível em: <<http://www.goiania.go.gov.br/html/amma/index.htm>>. Acessado em: 11 de mar de 2015.
- ANDERSON, C. R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, [S.l.], v.10, p. 574-578, 1961.
- ANDERSON, C.R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. v. 6, p.1012–1016. 1957.
- AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown dna fragments: complete nucleotide sequence of oropouche virus mRNA segment. *Journal of Virological Methods*. v.115, p51-77. 2004.
- AURICCHIO P. Primatas do Brasil. São Paulo: Terra Brasilis Editora, 168p. 1995.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 13, No. 6, p. 912-915, 2007.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. v. 15, No. 11, nov. 2009. Available: <www.cdc.gov/eid>.
- AZEVEDO, F. C. de; LEMOS, F. G. RASTROS & PISTAS: Guia de mamíferos de médio e grande porte do triângulo Mineiro e Sudeste de Goiás. Fernanda Cavalcanti de Azevedo et al. (organizadores). Uberlândia – GMBC. 118p. 2012.
- BACK, A.T.; LUNDKVIST, A. Dengue virus - an overview. Review article. *Infection Ecology and Epidemiology*. v.3: 19839. 2013.
- BALEOTTI, F. C. Estudo sobre a proteína NS5 de flavivírus brasileiros. Dissertação de mestrado. FAPESP, Ribeirão Preto – 60p. 2002.
- BALEOTTI, F. C.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian *Flavivirus* Phylogeny Based on NS5. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 98, No. 3, p.379-382, April 2003.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*: vol. 496, No. 25, p. 504-507. RESEARCH/Supplementary information 1-92. 2013.
- BATISTA, W. C. Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3'non-coding regions. *Virus Research* 75: 35-42. 2001.

BASTOS, M.S. et al. Short Report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. v. 86, No. 4, p. 732-735, 2012.

BATISTA, W. C. et al. Notification of the first isolation of Cacipacore vírus in a human in the State of Rondônia, Brazil/ Notificação do primeiro isolamento do vírus Cacipacore em um ser humano, no Estado de Rondônia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 44, No. 4, p.528-530, jul-ago, 2011.

BATISTA, P. M. et al. Monitoramento soroepidemiológico em animais-sentinela e vetores como parte da vigilância de arbovírus, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 45, No. 2, p.168-173, 2012.

BATISTA, P.M 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 46, no.6 p. 684-690, Nov-Dec, 2013.

BEATY, B.J.; CALISHER, C. H.; SHOPE, R. E. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons EW, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 6th ed. Washington, DC: American Public Health Association. p. 797–855. 1989.

BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista. Febre Amarela: situação epidemiológica e ampliação da área de recomendação de vacina no Estado de São Paulo, v.6, No, 61, 2009.

BISHOP, D. H.L.; SHOPE, R. E. Bunyaviridae. In: FRAENKEL-CONRAT H & WAGNER RR. Eds. *Comprehensive Virology*, v.14, p. 1-156. Plenum Press, New York, USA. 1979.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. FNS, IEC. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. et al. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. Belém,PA. Docto Téc. No. 2, 57 p. 1998.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS. Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos. Brasília: MS. 56 p. 2005.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ocorrência de mortes de macacos (epizootias) no Brasil, 2007.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Balanço Dengue Janeiro a Setembro de 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_dengue_setembro.pdf Acessado em: 31/03/2008.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, MS, SVS. Boletim_SVS_febre_amarela. 2008 Disponível em:<www.saude.gov.br><www.saude.gov.br/svs>Acessado em:17/12/2014.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia de vigilância de epizootias em primatas não-humanos e entomologia aplicada a vigilância da febre amarela, 2 ed – Brasília: MS. 100p. 2014.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nova classificação de caso de dengue. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acessado em 1/02/2015a.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 12, 2015. v. 46, No. 11, p. 1-7, 2015b.

BRONZONI, R. V. M. et al. The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus. *Archives of Virology*. v. 156. No.6, p. 931-938, 2011.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. .In: MONATH, T. P. (ed.). *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Boca Raton, USA: CRC Press, v. 1, p. 19-58, 1988.

CALISHER CH. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virologica*. v. 32, p. 469-78, 32, 1988.

CARDOSA, J. et al. Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic Fever. *PLoS Neglected Tropical Disease*.v.3, No. 4, p. 1-5. 2009.

CASSEB, A. R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. *Veterinária e Zootecnia*. v. 20, No. 03, p. 9-21, 2013.

CASSEB, A.R. et al. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. v. 20, No.9, p.1-3, 2014.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: ARBOVIRUS CATALOG. Available: <<https://wwwn.cdc.gov/arbocat>> Accessed: 01/22/2015

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews of Microbiology* 44:649-488, 1990.

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

COIMBRA, T. L. M.; SANTOS, C.L.; SUZUKI, A et al. Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. No.49, v.4, p.221-224, jul-aug.2007.

CORDELLIER, R. et al. Circulation silvatique du virus Dengue 2 en 1980, dans les savannes sub-soudaniennes du Côte d'Ivoire: Silvian circulation of the Dengue 2 virus in

1980 in the savannahs of Côte d'Ivoire. Cahier ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie, v.21, p.165–172, 1983.

CRUZ, A.C.R.; VASCONCELOS, P.F.C. Abovírus no Brasil: Palestra. Biológico, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, 2008.

DÉGALLIER, N. et al. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. Boletim do Museu Emílio Goeldi. Série Zoológica, v. 8, No. 1, 1992.

DEFLER, T. R. Densidad de especies y organización espacial de una comunidad de primates: Estación Biológica Caparú, Departamento del Vaupés, Colombia. In: Primatología del Nuevo Mundo. F. Nassar; V. Pereira eds, Fundación Araguatos, Santa Fe de Bogotá, p. 21-37, 2003.

DIALLO, M. et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging Infectious Disease*. v. 9, p.362–367, 2003.

DIALLO, M. et al. Potential role of sylvatic and domestic african mosquito species in dengue emergence. *Am J Trop Med Hyg*; 73(2):445–9. 2005.

DIALLO, D. et al. Landscape ecology of sylvatic dengue and chikungunya virus and their mosquito vectors in southeastern Senegal. *PLoS Neglected Tropical Disease*. p. 66, e1649, 2012.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Chikungunya: no longer a third world disease. *Science*. v. 318, p. 1860–1861, 2007.

ECDC – EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Expert meeting on chikungunya modeling. MEETING REPORT. Stockholm, 2008.

FAGBAMI, A.H.; MONATH, T.P.; FABIYI, A. Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 71, p. 60–65, 1977.

FALZARANO, D.; FELDMANN, H. Vaccines for viral hemorrhagic fevers - progress and shortcomings. *Current opinion in virology*. Netherlands, No.3, v. 3, p. 343-351. 2013. Available online at: < <http://www.sciencedirect.com> >

FARREL JR, R.E. RNA Methodologies - A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, cap.11, p. 191-203, 1993.

FENNER, F. J. et al. The Biology of Animal Viruses. Academic Press, New York, United State of America. 2ed, 1974.

FIGUEIREDO, M. L. G.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FIORILLO, A. M. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP. Brasil. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo. v.20, No. 3, p. 204-211, 1986.

FIGUEIREDO, L. T. M. Uso de células de *Aedes Albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 23, No. 1, p. 13-18, 1990.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruse. Microbes and infection. v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, R. M. P. et al. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 37, No. 6, p. 476-479, 2004.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. Arboviroses emergentes no Brasil. Artigo de Opinião/Opinion Article. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.40, No. 2, p. 224-229, Mar-abr., 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G. Identificação de flavivirus infectando culicídeos de 1999 a 2007 no Brasil. (Tese, Doutorado), São Paulo, Departamento de Microbiologia. Universidade de São Paulo. 60p. 2010.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, INSTITUTO EVANDRO CHAGAS SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE MINISTÉRIO DA SAÚDE/SAARB-IEC. Disponível em: < vaccinesnewsdaily.com> Acessado em 15/06/2015.

FLORES, E. F. Classificação e nomenclatura dos vírus. *Virologia Veterinária* – Santa Maria: Ed. UFSM, p.888. 2007.

FRANCO, L. et al. First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. PLoS neglected tropical diseases. 2011.

FREIER, J. E.; GRIMSTAD, P. R. Transmission of dengue virus by orally infected *Aedes triseriatus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 3, p, 1429– 1434, 1983.

GAMARNIK, A. Role of the dengue virus 5' and 3' untranslated regions in viral replication. In: HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. eds. Frontiers in dengue virus research. Norfolk, UK: Caister Academic Press; pp. 55-78, 2010.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, CHONG-KYO. .Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical And Experimental Vaccine Research*. Korean Vaccine Society.2014. Available: < <http://www.ecevr.org/>>.

GOMES, G; CAUSEY, O.R. Bussuquara, a new arthropod-borne virus. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, p. 103-109, 1959.

GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. Bunyaviridae. Fields. Virology, 3rd ed, pp. Edited by B.N. Fields, D. M. Knipe; P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 1473-1504. 1996.

GUBLER, D. J. et al. *Aedes (Gymnometopa) mediovittatus* (Diptera: Culicidae), a potential maintenance vector of dengue viruses in Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology*. v.22, No. 5, p. 469-475. 1985.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. v.11, No.3, p. 480–496. 1998.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation Symposium*, v. 277, p. 3-16. 2006.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARCOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. – *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams; Wilkins 5th, v. 1, p.1154-1158, 2007.

GUBLER, D. J. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg*, 86(5): 743-744, 2012.

GUIMARÃES, V. N. Identificação e caracterização molecular do vírus dengue em indivíduos sintomáticos atendidos na rede pública de saúde de Goiânia – Goiás, durante o período epidêmico 2012-2013. 77f. (Dissertação Mestrado), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2014.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G.; VALDÉS, L.; BRAVO, J.; VÁSQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Revista Panamericana de Salud Publica*. v. 11, No. 4, 2002.

GUZMAN, M.G. et al. Evaluating diagnostics: dengue a continuing global threat. Geneva, Switzerland. *Nature Reviews/Microbiology*. Macmillan Publishers Limited. S7-S16p. 2010. Available: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n12_suppl/pdf/nrmicro2460.pdf. Accessed: 03/12/2015.

HALL, W. C. et al. Demonstration of Yellow Fever and Dengue Antigens in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Human Liver by Immunohistochemical Analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 45, No. 4, p. 408-417, 1991.

HALSTEAD, S. B. Arboviruses of the Pacific and Southeast Asia. In: Feigin RD, Cherry JD Ceds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases* 3rd ed. Philadelphia: WE Saunders, p. 1468-1489, 1992.

HASEBE, F. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*. v. 67, No. 3, p. 373-374, 2002.

HANLEY, K. A. et al. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. v.1, No.20, 2013.

HOLLIDGE, B. S. GONZÁLEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergenci and Pathogenesis. Journal Neuroimmune Phamacology. v. 5, No. 3, p. 428-442, 2010.

HUDSON, N. P. The pathology of experimental yellow fever In the *Macacus rhesus*. The American Journal of Pathology. v. 4, No. 5, p. 395-405, 1928.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virology division – IUMS. Virus taxonomy. Disponivel em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acessado em: 28/01/2015.

JUPP, P.G.; MCINTOSH, B. M. Chikungunya virus disease. In: Monath TP, ed. The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 2, p. 137–157, 1988.

KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. Journal of microbiology, immunology, and infection. No.38, p. 5-16, 2005.

KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, 3rd. ed. Publ. The American Society for Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, p. 1041, 1985.

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. Parassitologia V. 37, No. 2-3, p. 91-97, 1995.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. J. Detecting artificial antidengue IgM complexes using a enzyme-linked immunosorbent assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v.36, p.153–159, 1987.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. Journal of Virology, v. 72, No. 1, 1998.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18.No.4: 608-637. 2005.

LABUDA, M.; NUTTALL, P.A. Tick-borne virus. Parasitology. Cambridge University Press, Printed in the United Kingdom. v. 129, p. 221–245, 2004.

LANCIOTTI, et al. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. Emerging Infectious Diseases v. 13, No. 5, May 2007.

LARAS, K. et al. Tracking the re-emergence of epidemic Chikungunya virus in Indonesia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene No. 99, p. 128–141, 2005.

LAM, S. K. Chikungunya infection—an emerging disease in Malaysia. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. No.32, p.447–451, 2001.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.; RICE, C. M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE DM, HOWLEY PM, editors. *Fields virology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1101-52. 2007.

LOPES, N.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saude*. IEC/PA. v. 5, No.3, p. 55-64. 2014.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. B.; MARTELLI, C. M. T. Atualização, epidemiologia e desafios no controle da dengue. *Revista de Patologia Tropical*. maio-jun. v. 37, No. 2 p. 111-130, 2008.

MARTINS, L. C. et al. Characterization of Minaçu vírus (Reoviridae: Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice. *International Journal of Experimental Pathology*. v. 88, p. 63-73, 2007.

MAUÉS, F. C. J.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T. Estudo comparativo dos resultados obtidos pelos métodos de imunocromatografia e o ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-vírus dengue. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. v. 35, No. 1, p. 5-9, 2003.

MAVALANKAR, D. et al. Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. *Emerging Infectious Diseases*. v. 14, No. 3, p. 412-415, 2008.

MENEZES, T. V. N.; PEREIRA, S. F.; COSTA, Z. G. A. Febre amarela no Brasil: um desafio nos últimos anos. *Hygêia, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*. v. 4, No.7, p. 52-57, 2008.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. *Lancet, Infectious Diseases*. v.1, p. 11– 20. 2001.

MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. Pathogenesis and pathophysiology of Yellow fever. *Advanced in Virus Research*. v. 60 p. 343–395, 2003.

MONDET, B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Les risques d'épidémisation urbaine de la fièvre jaune au Brésil pour le vecteurs *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. v. 89, p.107-114. 1996.

MOURÃO, M. P G. et al. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. *Emerging Infectious Diseases*. v.15, No. 12, December 2009.

MOURÃO, M. P G. et al. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. *Vector-borne and zoonotic diseases*. Mary Ann Liebert, Inc. v. 12, No. 1, 2012.

NAPOLEÃO-PEGO, P. et al. Mayaro Virus Disease. *Journal of Human Virology and Retrovirology*. v.1, No.3, 2014.

NAVES, H. A. M. et al. Espécies de Culicidae de Goiânia-Goiás-Brasil. Revista de Patologia Tropical. v. 1, p. 31-42. Jan-jun. 1996.

NEUMAYR, A. et al. Mayaro Virus Infection in Traveler Returning from Amazon Basin, Northern Peru. Emerging Infectious Diseases. v. 18, No. 4, p. 695-696, apr. 2012.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the world. 6 ed. Baltimore: The Jonhs Hopkins University Press. 836p. 1999.

NUNES, M. R. T. et al. Oropouche vírus isolation, Southeast Brazil. Emerging Infectious Diseases. v. 11, No. 10, October 2005.

NUNES, M. R. T. et al. A febre do oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia Brasileira. Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública. v. 15 No. 3, p. 303-318, 2007.

NUNES, T. C. et al. Vetores de importância médica na área de influência da pequena central hidrelétrica Mosquitão – Goiás. Estudos-Goiânia. v. 35, No. 11/12, p.1085-1105, 2008.

NUNES, M. R. T. et al. Arbovirus eco-epidemiology in the area affected by the Cuiabá-Santarém Highway (BR-163), Pará state, Brazil. Caderno de Saude Publica. No.25, p. 2583-2602, 2009.

OLIVEIRA, L. C. et al. Comunidade de primatas de uma floresta tropical úmida da Floresta Nacional do Saracá-Taquera, Pará, Brasil. Brazilian Journal of Biology. São Carlos v. 69, No. 4, p. 1091-1099, 2009.

PASTORINO, B. et al. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in Democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. Journal of Medical Virology. V. 74, p. 277–282, 2004.

PARANÁ – GOVERNO DO ESTADO – SECRETARIA DA SAÚDE. Dengue características clínicas e epidemiológicas. Disponível em: <WWW.dengue.pr.gov/modules/conteudo/conteúdo.php?conteudo=11> Acessado em 17/05/2015.

PEREIRA, L. E et al. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). Revista de Saúde Pública, Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. v. 35, no. 2, p. 119-123, 2001.

PINHEIRO, F. P. et al. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública, v. 12, p. 15–23, 1962.

PINHEIRO, F.P. Arboviral zoonoses in South America. Oropouche fever . In. STEEL. J.H., BERAN, G.W. Handbook series In Zoonoses. Boca Raton, Flórida: CRC Press Inc. p. 177-181. (Section B: Viral Zoonoses, 1), 1981.

PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W. Mayaro vírus disease In: Monath TP. ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Raton, CRC, v.3, p 137-150. 1986.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P. F. C. Febre por Oropouche. In: Doenças infecciosas e parasitárias – Enfoque amazônico. Belém, ed. CEJUP, UEPA. Instituto Evandro Chagas-PA. Cap. 18, p. 286-298, 1997.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever. In: Feigin RD, editor. *Textbook of pediatric infectious diseases*, Philadelphia: W.B. Saunders Co.; p. 2418–23, 2004.

POWERS, A. M. et al. Genetic relationships among mayaro and una viruses suggest Distinct patterns of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 75, No. 3, p. 461–469, 2006.

PRIMATE – Specialist Group (SG). IUCN/SSC. Disponível em: < http://www.primate-sg.org/primate_diversity_by_region/ > Acessado em: 08/07/2015.

QUARESMA, J .A. S. et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-h, TNF-a and NK cells activity. *Virology*. v. 345, No. 1, p. 22-30, 2006.

QUARESMA, J. A. S. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challegens in the immunophatology of yellow fever. *Reviews in .Medical Virology*, v.23, No.5, p. 305-318, 2013.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. v. 27, No. 3, p. 493-497. 1938.

REIS, N.R. et al. Mamíferos do Brasil. Imprensa da UEL, Londrina. 437p, 2006.

REZZA, G.et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. v. 1, No. 370, p. 1840–1846, 2007.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. v.174, p. 479–493, 1990.

ROBIN, Y. et al. Isolement du virus de la dengue au Senegal. *Annales de l’Institut Pasteur: Virologie*. v. 131, p. 149–154. 1980.

ROBIN, S. et al. Neurologic Manifestations of Pediatric Chikungunya Infection. *Journal of Child Neurology*. v. 23 No. 9, p. 1028-1035, 2008.

ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.49, p. 28–32, 1955.

ROCHA, T.C. SVOBODA, W. K. GOMES, E. C. A importância da investigação de arbovírus em saúde pública: Aspectos gerais e o papel dos primatas não humanos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.15, No.2, 2014.

ROCHE, J.C. et al. Isolement de 96 souches de virus dengue 2 a partir de moustiques captures en Cote d'Ivoire et Haute-Volta. *Annales de l'Institut Pasteur: Virologie*. v. 134, p.233–234, 1983.

RODHAIN, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious e Disease*. v 14, p. 9-19, 1991.

RODRIGUES, A. H.; ARRUDA-NETO, E.; SANTOS, R. I. M. Replicação do vírus Oropouche em macrófagos – Oropouche vírus replication in macrophages. *AMBIÊNCIA. Revista de Ciências Agrárias*. Guarapuava – PR. v.3, n.2, p 201-210. 2007.

RODRIGUES, S. G. et al. Epidemiologia do vírus da encefalite Saint Louis na Amazônia brasileira e no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: elevada prevalência de anticorpos em eqüinos. *Revista Pan-Amazônica*. No. 1, v. 1, p. 81-86, 2010.

RUDNICK, A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. *Journal of medical entomology*. v.2, p. 203–208. 1965.

RUDNICK, A.; LIM, T. W. Dengue fever studies in Malaysia. *Institute for Medical Research. Ministry of Health, Malaysia*. v. 23, No. 1, p. 152. 1986.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The diversity of the New World primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy. In: *South American primates*. Springer New York, Cap. 2, p. 23-54, 2009.

SAEED, M. F et al. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *Journal of General Virology*, v.81 p. 743-748. 2000.

SAEED, M. F et al. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 7, p. 2445-2452, 2001.

SALUZZO, J. F. et al. Isolation of dengue 2 and dengue 4 viruses from patients in Senegal. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 80, No.5, 1986.

SAM, J. I. et al. Chikungunya virus infection. *Medical Journal Malaysia*. v. 61, No. 2, p.264-270, 2006.

SBP – SOCIEDADE BRASILEIRA DE PRIMATOLOGIA. *Primatas brasileiros*. Disponível em: <<http://www.sbprimatologia.org.br/os-primatas/>> Acessado em: 09/07/15.

SCHLESINGER, J. J. et al. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Journal of Virology*. United States. v. 60, p. 1153–1155. 1986.

SCOTT, R. M. et al. Isolation of dengue virus from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*. v. 41, p. 1–6, 1980

SHOPE, R. E. – The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Annual Microbiology*, Rio de Janeiro, v. 11, parte A, p. 167-171, 1963.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLOS MEDICINE*. v. 3, No. 7, p. 1058-1070, 2006.

SILVA, A. M. Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade. Dissertação, Mestrado. Recife. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 156 p. 2008.

SIMMONDS, P et al. Family Flaviviridae. In: KING, A. M. et al. editors. *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.1003-1020, 2011.

SIQUEIRA, JR. Et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. *Emerging Infectious Diseases*. v. 11, No. 1, 2005.

STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*. No. 49, p. 942-948, 2009.

STORCH, G.A.; WANG, D. *Diagnostic Virology*. In: *Fields Virology*. KNIPE, D.M; HOWLEY, P.M. Philadelphia, PA, USA. 6ed, v. 1, p. 1-1282, 2013.

TALARMIN, A. et al. Mayaro Virus Fever in French Guiana: Isolation, Identification, and Seroprevalence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.59, No. 3, p. 452–456, 1998.

TERZIAN, A.C. B. et al. Sporadic oropouche virus infection, Acre, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v.15, p. 348–50, 2009.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. No. 99, p. 345–370, 2013.

THONNON, J. et al. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. v. 92, No. 2, p. 79-82, 1999.

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

THU, H. M. et al. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology*, v. 336, p. 163-172, 2005.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q. *Doenças infecciosas e parasitárias – enfoque amazônico*. Belém: Instituto Evandro Chagas CEJUP; UEPA;. PA, p.207-225. 1997.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*. v 33, p. 465-476, 1991.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura. (J Braz Assoc Advanc Sci)* v. 44, p.117-124, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 57, p. 132-137, 1997.

VASCONCELOS, P. F. C, et al. *Arboviruses pathogenic for man in Brazil*. In: An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. *Instituto Evandro Chagas*, Belém, p.72-99, 1998.

VASCONCELOS, P. F. C. et at. An epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of Medical Virology*. v. 65, p. 598–604, 2001a.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de Saúde Pública, FIOCRUZ*, v. 17 p. 155-164. 2001b

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Yellow fever in Pará State, Amazon region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and Epidemiologic Findings. *Emerging Infectious Diseases*. v. 7, No.3, 2001c.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela, reflexões sobre a doença. *Revista Brasileira de Epidemiologia*.v. 5, No 3, p. 244-258, 2002.

VASCONCELOS, P. FC. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, p. 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. Genetic divergence and dispersal of yelow fever virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 10, n. 9, p. 1578 - 1584. 2004.

VASCONCELOS, H. B. et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. *Journal of Clinical Virology*. v.44, p. 129-133, 2009.

VASCONCELOS, H. B. Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 17, No. 5. p. 800-806, 2011.

VASCONCELOS, P.F.C.; NUNES, M.R.T. Viral Febrile Illnesses: Mayaro virus, p., 318-319. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. 8 th. London, Elsevier-Saunders. Alan J. Magill, David R Hill, Tom Solomon, Edward T Ryan, eds. v. 32, No. 6, 1190p, mar. 2012.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. v. 5, no. 3, p. 9-10, 2014.

VASILAKIS N. et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*. v.358, p.402–412, 2007.

VASILAKIS, N.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. *Emerging infectious diseases*. v.14, p.502–504; 2008.

VASILAKIS, N. et al. Antigenic relationships between sylvatic and endemic dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. v.79, p.128–132, 2009.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Review Microbiology*. v. 9, No. 7, p. 532–541, 2012.

VIRALZONE. ViralZone: Bunyaviridae. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html> Acessado em 15/06/2015.

VON LINDERN, J. J. et al. Genome analysis and phylogenetic relationship between east, central and west African isolates of yellow fever virus. *Journal of General Virology*.v. 87 p. 895-907, 2006.

VRATISKIKH, O. et al. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathogens*. v. 9, No.6, p. 1-11p, 2013.

YAMADA, K.I. et al. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology*. Colorado, v. 24, No. 3, p. 203-209, 2002.

WANG, E. et al. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* v. 225, p. 274-281. 1996.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of Virology*. Colorado, v.74, No.7, p. 3227-3234, 2000.

WATTS, D. M. et al. Oropouche virus transmission in Amazon river basin of Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 56, p.148–152, 1997.

WATTS, D. M. et al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Copyright G 1987 by The American Society of v.3. No. 6, p. 143-152, 1987.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research*. v. 85, No. 2, Feb.2010

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 9, No. 4, p. 523-540, 2009.

WHO - World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, New ed. 2009.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue vírus. Nature Structural and Molecular Biology. v. 10, No. 11, p. 907-912, 2003.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol.109, 6, p.820-823. 2014.

ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Goiânia, 13 de outubro de 2014.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PEDIDO DE EMENDA DO
PROTOCOLO Nº. 032/2014**

I. IDENTIFICAÇÃO:

- 1. Título do projeto:** “DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VIRUS DA FEBRE AMARELA E OUTROS ARBOVIRUS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM TRÊS PARQUES URBANOS DE GOIÂNIA”
- 2. Pesquisador Responsável:** MARIZE MOREIRA GIBRAIL
- 3. Unidade/Órgão do pesquisador:** INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA/UFG
- 4. Pesquisadores Participantes:**
Igor Roberto de Carvalho – AMMA - Procedimentos médico-veterinários: contenção química e punção venosa

Laura Silva Wiederhecker – AMMA - Manejo: captura e manipulação não invasiva animal, ambientação dos animais e soltura.

Fabíola Souza Fiaccadori – IPTSP/UFG – Colaboradora

Keili Maria Cardoso de Souza – IPTSP/UFG - Colaboradora

Menira Borges de Lima Dias e Souza – IPTSP/UFG – Colaboradora

Divina das Dores de Paula Cardoso – IPTSP/UFG - Coordenadora

Pesquisadores incluídos:

- ELISA MACHADO DE ALMEIDA – graduanda em Medicina Veterinária – apoio na coleta sanguínea e monitoramento dos sinais vitais.
- LUCIANA BATALHA DE MIRANDA ARAUJO – gerenciamento da coleta sanguínea
- MARCELO SANTALUCIA – Biólogo – apoio no manejo e coleta sanguínea.

5. Unidade onde será realizado:

A pesquisa será realizada no Laboratório de Virologia Animal – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás – IPTSP/UFG e Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

6. Data de apresentação do protocolo a CEUA: 07/05/2014

7. Data da apresentação do Pedido de Emenda: 02/09/2014

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou o pedido de emenda (inclusão de pesquisadores)** do projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em **30/01/2015**.

III - Data da reunião: 13/10/2014

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24629-4	Data da Emissão: 08/09/2014 19:21	Data para Revalidação*: 08/10/2015
* 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: marize moreira gibrail	CPF: 765.880.926-87
Título do Projeto: detecção de anticorpos para febre amarela e outros arbovirus em primatas não-humanos em três parques urbanos de goiânia-go	
Nome da Instituição : AGÊNCIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE DE GOIÂNIA	CNPJ: 08.931.821/0001-53

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	captura e coleta de animais e materiais biológicos in situ	08/2010	07/2012
2	captura e coleta de animais e materiais biológicos in situ	12/2012	12/2015
3	captura e coleta de animais e materiais biológicos	07/2013	07/2016

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 exime 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 www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
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 www.mma.gov.br/cgen .
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.
9	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Divina das Dôres de Paula Cardoso	Pesquisadora	091.724.751-53	130068 SSP-GO	Brasileira
2	Carlos Eduardo Barbosa	participante	979.185.041-00	3676253 DGPC-GO	Brasileira
3	Luciana Batalha de Miranda Araújo	Gerenciamento da coleta sanguínea	018.512.637-56	6013381 SSP-GO	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	GOIANIA	GO	^parques urbanos de goiânia	Fora de UC Federal
2	GOIANIA	GO	16°42'19.07"S 49°15'15.67"O	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).

Código de autenticação: 65238253





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24629-4	Data da Emissão: 08/09/2014 19:21	Data para Revalidação*: 08/10/2015
* 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: marize moreira gibrail	CPF: 765.880.926-87
Título do Projeto: detecção de anticorpos para febre amarela e outros arbovirus em primatas não-humanos em três parques urbanos de goiânia-go	
Nome da Instituição : AGÊNCIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE DE GOIÂNIA	CNPJ: 08.931.821/0001-53

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cebus

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Outros métodos de captura/coleta (contendo quÃ- mica), Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçã

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS	laboratório de virologia
2	Laboratorial Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysmeiros	Divisão de Biologia Médica
3	Ministério da Saude	Instituto Evandro Chagas - Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

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).

Código de autenticação: 65238253





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24629-4	Data da Emissão: 08/09/2014 19:21	Data para Revalidação*: 08/10/2015
* 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: marize moreira gibrail	CPF: 765.880.926-87
Título do Projeto: detecção de anticorpos para febre amarela e outros arbovirus em primatas não-humanos em três parques urbanos de goiânia-go	
Nome da Instituição : AGÊNCIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE DE GOIÂNIA	CNPJ: 08.931.821/0001-53

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).

Código de autenticação: 65238253



TITLE: Detection of antibodies to Oropouche virus in non-human primates at Goiânia city, Goiás

RUNNING TITLE: Antibodies to Oropouche virus in non-human primates

AUTHORS: Marize Moreira Gibrail^[1], Pedro Fernando da Costa Vasconcelos^[2], Fabíola Souza Fiaccadori^[1], Menira Souza^[1], Tâmera Nunes Vieira Almeida^[1], Kareem Rady Abdelhaleem Badr^[1] and Divina das Dôres de Paula Cardoso^[1]

INFORMATIONS OF THE AUTHORS:

Marize Moreira Gibrail – Graduate: Master

Pedro Fernando da Costa Vasconcelos – Graduate: Doctor

Fabíola Souza Fiaccadori – Graduate: Doctor

Menira Souza – Graduate: Doctor

Tâmera Nunes Vieira Almeida – Graduate: Master

Kareem Rady Abdelhaleem Badr – Graduate: Master

Divina das Dôres de Paula Cardoso – Graduate: Doctor

[1]. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

[2]. Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.

CORRESPONDING AUTHOR: Dr. Divina das Dôres de Paula Cardoso.

ADDRESS: Rua 235 s/n, esquina com 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-050
Goiânia, Goiás, Brasil.

PHONE NUMBER: 55 62 32096244

FAX NUMBER: 55 62 32096363

E-MAIL: dcardoso@ufg.br

ABSTRACT

Introduction: Arboviruses are important diseases for human and non-human primate (NHP) are important host. This study shows detection of antibodies to arboviruses in NHPs inhabitants of three urban parks, and acclimatized at Wild Animal Screening Center in Goiânia city. **Methods:** 50 blood samples were collected from NHPs and analyzed by IH and NT assay. **Results:** Two animals, *Alouatta caraya* species, had positive samples for Oropouche virus by NT assay.

Conclusion: This is the first report about detection of antibody to Oropouche virus at Goiás state and we consider this as warning sign for entry of virus in the human population.

KEYWORDS: NHP, Oropouche virus, Arbovirus.

Oropouche virus (OROV) belongs to genus Orthobunyavirus, family Bunyaviridae, which also comprising genres *Hantavirus*, *Nairovirus* and *Tospovirus*. The Orthobunyavirus are arboviruses that include, among others, the Caraparu, Catu, Guaroa, Maguari, Tacaiuma and Belém viruses⁽¹⁾.

The virus has a diameter of about 100 nm, helical symmetry and simple genome negative RNA tri-segmented strand coding as small (S), medium (M) and large (L), respectively, for the nucleocapsid (N) protein, surface (Gn and Gc) protein and a non-structural (NSs) proteins and viral RNA dependent RNA polymerase activity⁽²⁾. The phylogenetic analysis has been identified three virus genotypes (I, II and III), which also occur in Brazil⁽³⁾.

In Brazil, in terms of the human population, the infection with OROV is considered important. It is characterized by acute febrile illness with the possibility of developing others complications including hemorrhagic phenomena and the virus was identified from cerebrospinal fluid⁽⁴⁾.

In nature, OROV features have two cycles: urban and wild. In urban areas, the mosquito *Culicoides paraensis* has been considered the vector, and in wild areas, has been admitted the *Aedes serratus*⁽⁵⁾. Considering the animal wildlife, it has been seen that sloths, NHPs and some species of birds can be infected with these viruses⁽²⁾.

Worldwide, it records 496 species of NHPs. The NHPs from Brazil belongs to the suborder Platyrrhini that includes five families, and from them the Atelidae family, which includes *Alouatta caraya* species, Cebidae, *Cebus libidinosus* species and Callitrichidae which includes the *Callithrix penicillata* species⁽⁶⁾. These species have been associated with epidemics in Brazil⁽⁷⁾ and are inhabitants in parks and vegetation areas of Goiânia city, Goiás.

In the period of 2007-2008, there was an outbreak of Yellow Fever in NHPs inhabitants at urban parks in Goiânia city, where they were recorded deaths of 61 animals of the following species; *Alouatta caraya*, *Cebus libidinosus* and *Callithrix penicillata*. In addition, it was also registered infection in humans⁽⁸⁾, that leading to a suspicion of an epizootic disease.

This is the first study conducted in the state of Goiás aiming to investigate the occurrence of arboviruses in population of NHPs inhabitants at environmental conservation areas; and it has been observed a seropositivity for OROV in NHPs of *Alouatta caraya* species.

It was studied 50 NHPs and from them, 27 *Cebus libidinosus* species were inhabitants at three urban parks of Goiania. The other 23 animal were acclimatized from Wild Animal Screening Center [*Centro de Triagem de Animais Silvestres/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (CETAS/IBAMA)]: 15 animals were *Cebus libidinosus* species, five were of *Alouatta caraya* species and three of *Callithrix penicillata* species. The samples of the urban parks inhabitant's animals were collected in 2014 and those of acclimated animals CETAS/IBAMA were collected in 2011 and 2013.

The study was approved by the Ethics Committee for Animal Use [*Comissão de Ética no Uso de Animais* (CEUA)] of the Federal University of Goiás (Process 32/2014) and the Information System on Biodiversity [*Sistema de Informação em Biodiversidade* (SISBIO)] (Process 24629).

The capture of the animals was done by attraction to trap/cage "tomahawk" and they chemically restraint by intramuscular administration using 2.0 mg/kg of tiletamine-zolazepam (Zoletil®). Physiological parameters were monitored until the end of

sedation. The capture of each animal was done only one time, achieved on the basis of a microchip. From each animal, it was collected from 3 to 10 ml of blood sample, depending on the species, femoral or brachial venal puncture⁽⁷⁾.

All serum samples were initially screened by Haemagglutination inhibition (HI) assay as described by Clarke and Casals et al.⁽⁹⁾ and adapted to microplate by Shope⁽¹⁰⁾. The positive samples by HI with titer greater than or equal to 1:40, was confirmed by neutralization test (NT) as described by Beaty et al.⁽¹¹⁾ Serological tests were performed in the Reference Laboratory for Arboviruses and Hemorrhagic Fevers at the Evandro Chagas Institute, Belém, Pará [*Laboratório de Referência para Arboviroses e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará*].

For the HI assay, serum samples were treated (100% acetone and 0.85% NaCl), hydrated (Salt solution borate pH 9.0) and adsorbed with goose erythrocytes (*Anser cinerius*). Then, we performed the test with two steps; in the first step, each serum sample (1:20) was tested against 23 viral antigens (4 haemagglutinating units – 4HU), prepared from intracerebral inoculation (IC) in newborn mice: Equine Encephalitis Eastern, Equine Encephalitis West, Mayaro, Mucambo, Yellow Fever, Bussuquara, Cacipacore, Ilheus, Saint Louis Encephalitis, Naranjal, Rocio, Caraparu, Catu, Guaroa, Maguari, Oropouche, Tacaiuma, Belem, Icoaraci, and Dengue 1-4 viruses. After incubation of the serum-virus complex goose erythrocytes were added. The sample was considered positive when the sample serum inhibited the agglutination of erythrocytes by the specific antigen.

In the second stage, the serially diluted samples (1:20-1:640) were added to the specific antigen (4HU) and then the goose erythrocytes were added. The antibody titer was considered as the highest dilution that presents total inhibition of

haemagglutination. For each reaction, controls were used for red blood cells, antigen and serum test.

The NT assay was carried out using newborn mice (1-3 days). For each serum samples it used 18 mice, and three dilutions of each antigen. Thus, serum samples were added to the specific antigen and the mice were inoculated by IC. For each reaction, it was included a negative and a positive control serum. The reading and interpretation of the assay was performed through the calculations obtained by individually inoculated group (6 animals per dilution of antigen) and the antibody titer being considered as the average value of dilutions for each serum sample in which death occurred more than 50% inoculated animals (LD_{50}). The titer was defined as the logarithmic neutralization index (NI), log 10, as described by Reed & Muench⁽¹²⁾. The sample was considered positive when its NI is equal to or greater than 1.7.

Of the total NHPs studied, four animals had antibodies for arboviruses with a titer greater than 1:40 by HI. Three of them were positive for Oropouche virus: one from them was *Cebus libidinosus* species and two were *Alouatta caraya* species. The other animal, *Cebus libidinosus* species, was positive for the Cacipacore virus. For neutralization test, two samples of *Alouatta caraya* species were confirmed as positive for Oropouche virus (**Table 1**).

The arboviruses have geographic distribution covering all continents, with the exception of the temperate countries where the vectors relationship with vertebrate hosts is interrupted⁽⁵⁾. Brazil has characteristics that to favor the spread of these viruses; have a third of its territory occupied by forest besides a lot of density of vectors and vertebrate hosts including urban and suburban areas⁽¹³⁾. In the present study, it was observed a positivity of Oropouche virus in two NHPs of *Alouatta caraya* species which were

acclimatized at the CETAS/IBAMA. The virus has been considered of great importance to public health due to morbidity for humans with symptoms range from febrile illness to aseptic meningitis. It also has been responsible for explosive epidemics in cities and villages in the Amazon region since the first outbreak by the agent in 1960⁽³⁾. The occurrence of these viruses in humans has also been seen in southeast Brazil⁽¹⁴⁾ as well as NHPs⁽²⁾. In the state of Goiás, at our knowledge, there is not occurrence of Oropouche virus reports in human population. In this way, the detection of antibodies for this virus in NHPs is important considering the possibility of infection between these animals and then the potential for extrapolation for human population, concern to public health. In this regard, it is noteworthy that most of animals from the CETAS/IBAMA, originate from urban parks in Goiânia city that have great condition of interaction with humans. Goiás has not registry of *Culicoides paraensis* but it has other *Culicoides* species, that can potentially be virus vectors⁽¹⁵⁾. Finally, the identification of antibodies to Oropouche virus in NHPs at Goiânia city should be taken as an important warning sign and further studies should be conducted considering the continuous monitoring using sentinel animals as support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (Internet). Virology division: IUMS; 2013 (Cited 2015 January 28); Available at: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
2. 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.
3. Vasconcelos HB, Nunes MRT, Casseb LMN, Carvalho VL, Silva EVP, Silva M et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:800-806.
4. Bastos MS, Figueiredo LTM, Naveca FG, Monte RL, Lessa M, Figueiredo RMP et al. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:732-735.
5. Casseb AR, Casseb LMN, Silva SP, Vasconcelos PFC. Arbovírus: Importante zoonose na Amazônia brasileira. *Vet e Zootec* 2013; 20:9-21.

6. Primate Specialist Group. (Internet) IUCN/SSC; 2014 (Cited 2015 July 8); Available at: <http://www.primate-sg.org/>
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia de vigilância de epizootias em primatas não-humanos e entomologia aplicada a vigilância da febre amarela. 2^{ed}. Ministério da Saúde, Brasília, 2014.
8. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008.(Internet).Brasília: MS; 2008(Cited 2008 March 25); Available at: <http://portal.saude.gov.br/saude/>.
9. Clarke DH, Casals J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7:561-573.
10. 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. *An Microbiol* 1963; 11:167-171.
11. Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE. Arboviruses. *In*: Schmidt NJ, Emmons EW, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 6th ed. Washington: American Public Health Association; 1989. p. 797-855.

12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938; 27: 493-497.
13. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:224-229.
14. Figueiredo LTM, Travassos da Rosa APA, Fiorillo AM. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). *Rev Saúde Pública* 1986; 20:204-211.
15. Naves HAM, Carvalho MESV, Costa JA, Oliveira RA. Frequência domiciliar de Culicidae in zona urbana de Goiânia-Goiás-Brasil. *Rev Pat Trop* 1996; 1:43-49.

TABLE 1- Seropositivity by serum neutralizing test for arboviruses of NHPs observed in Goiânia city, Goiás.

Species	Number of animal	Neutralization index	Virus
<i>Cebus libidinosus</i>	02	0,4	Cacipacore
<i>Cebus libidinosus</i>	11	0	Oropouche
<i>Alouatta caraya</i>	12	2,9	Oropouche
<i>Alouatta caraya</i>	20	2,8	Oropouche