

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE / FIOCRUZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, SOCIEDADE
E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA - PPGSSEA

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE ARBOVÍRUS EM
POPULAÇÕES RURAIS E URBANAS DO ESTADO DO AMAZONAS

GUSTAVO HENRIQUE NOLASCO GRIMMER DAVIS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2009

GUSTAVO HENRIQUE NOLASCO GRIMMER DAVIS

ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE ARBOVÍRUS EM POPULAÇÕES
RURAS E URBANAS DO ESTADO DO AMAZONAS



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

Orientadora: Dra. Vanessa Salete de Paula
(Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ)

Co-orientador: Dr. Wornei Silva Miranda Braga
(Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM)

Manaus
Março, 2009

Estudos epidemiológicos sobre arbovírus em populações rurais e urbanas do
Estado do Amazonas

Gustavo Henrique Nolasco Grimmer Davis

Orientadores: Dra. Vanessa Salete de Paula e Dr. Wornei Silva Miranda Braga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde,
Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde,
Sociedade e Endemias na Amazônia.

Aprovada por:

Presidente, Dra. Vanessa Salete de Paula

Dr. Felipe Gomes Naveca

Dra. Maria Paula Gomes Mourão

Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz

Dr. Cristóvão Alves da Costa

Manaus
Março, 2009

Agradecimentos

- ✚ Aos meus pais, Elizabeth e Gilberto, pelo carinho, educação e presença em todos os momentos. Vocês são meu exemplo de superação. Dedico esta dissertação a vocês.
- ✚ À minha querida irmã, Carol, que mesmo tão distante sempre esteve em meu coração.
- ✚ Ao grande amigo Ricardo. Rapaz, passamos poucas e boas, mas com certeza aprendemos muito. Não tenho palavras pra descrever nossa amizade.
- ✚ À Paloma. Palomitcha! Você veio nos complementar. Obrigado por seu apoio incondicional e é claro a sua amizade.
- ✚ Ao sincício.
- ✚ À Elaine e Adriana, que me receberam com muito carinho no Rio de Janeiro.
- ✚ Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ, representado pelo Dr. Roberto Sena, que permitiu a realização deste trabalho.
- ✚ À minha orientadora, Dra. Vanessa Salete de Paula, pelo convite à realização do mestrado, apresentação ao ILMD/FIOCRUZ, ensinamentos e apoio nos momentos de inconstância.
- ✚ Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, por ter me recebido no grupo de pesquisa do ILMD/FIOCRUZ.
- ✚ A toda equipe do ILMD/FIOCRUZ que dividiu bons e maus momentos nesses anos de trabalho. Nete, Mota, Mari, vocês foram fundamentais. Sr. Manoel, Sr. Frank, Sr. Josimar, pela prestação de seus serviços e ajuda sempre que preciso. A toda equipe administrativa representada pela Sra. Ray, a logística sempre é essencial.
- ✚ Aos colegas de laboratório, com os quais as trocas de informações e ensinamentos foram muito importantes.
- ✚ À Coordenação da pós-graduação, em especial à Elen e Laura pela atenção.

- ✚ A toda Comunidade de Rio Pardo. Agradeço a vocês pela recepção agradável em seus lares e pela disposição em participar dos estudos do ILDM/FIOCRUZ.
- ✚ À prefeitura de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil.
- ✚ À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM.
- ✚ Ao Dr. Wornei Silva Miranda Braga por ter me recebido nos projetos desenvolvidos pela gerência de virologia da FMTAM, e ensinamentos em virologia.
- ✚ À Dra. Regina Figueiredo, pela colaboração neste trabalho.
- ✚ À Dra. Maria Paula Mourão, pela colaboração, ensinamentos e troca de experiências em arbovirologia.
- ✚ Ao Dr. Luiz Tadeu Figueiredo e todos os pesquisadores e alunos do laboratório de virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP pela recepção, colaboração e ensinamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.
- ✚ À FAPEAM pela concessão da bolsa de mestrado.
- ✚ Às agências de fomento em pesquisa que financiaram este estudo, em destaque o IDRC, CNPq PAPES/FIOCRUZ, POM/ILMD.

Resumo

Estudos epidemiológicos sobre arbovírus em populações rurais e urbanas do Estado do Amazonas

Gustavo Henrique Nolasco Grimmer Davis

Orientadores: Vanessa Salete de Paula & Wornei Silva Miranda Braga

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Saúde Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

As arboviroses são atualmente reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde como um problema global. A maioria das arboviroses resume-se em afecções com sintomatologias agudas e inespecíficas, como febre, dores de cabeça e dores musculares. Embora sejam auto limitados, tais sintomas geram impactos sociais e econômicos relevantes. No Brasil, as arboviroses provocadas pelos por vírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* e *Flavivirus* são as principais causadoras de surtos ou epidemias. O presente estudo teve como objetivo estudar a circulação dos arbovírus mayaro, vírus da encefalite eqüina venezuelana, vírus da febre amarela, vírus da encefalite de Saint Louis e vírus oropouche em uma área rural e uma área urbana do Estado do Amazonas, Brasil. Assim sendo, a sorologia para detecção de imunoglobulinas G foi utilizada para avaliar a prevalência de anticorpos contra tais vírus em 335 moradores de uma comunidade rural do Estado do Amazonas e a PCR foi utilizada para avaliar a incidência de tais vírus em 250 amostras coletadas na área urbana de Manaus.

Os resultados encontrados para a sorologia sugerem a circulação do vírus mayaro na comunidade rural. A soroprevalência detectada nas amostras foi de 41,5%. Não houve relação estatisticamente significativa de risco para a infecção por mayaro entre os gêneros (p valor=0,7760) ou entre as faixas etárias (p valor=0,9422). A sorologia positiva detectada entre 39 crianças menores de 10 anos indica uma infecção recente. Os fatores de proteção contra a infecção por mayaro detectados foram o uso de mosquiteiro (p valor=0,0119) e a presença de animais no peridomicílio (p valor=0,0407). Os fatores de risco detectados para a infecção por mayaro foram a localização do domicílio em vilas próximas à floresta (p valor<0,0001) e a presença de toalete dentro ou próximo ao domicílio (p valor=0,0415). Os resultados sorológicos sugerem que a infecção por mayaro ocorreu há menos de 10 anos nas proximidades das residências analisadas.

A análise molecular das amostras coletadas na zona urbana de Manaus não detectou fragmentos genômicos de arbovírus. Fatores como baixa viremia no momento da coleta de sangue e estocagem das amostras de soro podem ter contribuído para a não detecção dos fragmentos genômicos. Contudo, o protocolo de detecção de fragmentos genômicos de arbovírus baseado na técnica de PCR está em uso nos centros de pesquisa e vigilância epidemiológica da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM e do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMDF/IOC/CRUZ.

Abstract

Epidemiological studies on arboviruses in rural and urban populations of the State of Amazonas

Gustavo Henrique Nolasco Grimmer Davis

Orientadores: Vanessa Salete de Paula & Wornei Silva Miranda Braga

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Saúde Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

Arbovirose are currently recognized by the World Health Organization as a global problem. Most arbovirose are summarized in diseases with acute and nonspecific symptoms such as fever, headache and muscle pain. Although self limited, these symptoms create relevant social and economic impacts. In Brazil, the arbovirose caused by viruses belonging to the genus *Alphavirus*, *Flavivirus* and *Orthobunyavirus* and are the main cause of outbreaks or epidemics. This study aimed to study the circulation of arbovirus mayaro, venezuelan equine encephalitis virus, yellow fever virus, Saint Louis encephalitis virus and oropouche virus in a rural and an urban area of the State of Amazonas, Brazil. Therefore, the serology for detection of immunoglobulin G was used to assess the prevalence of antibodies against these viruses in 335 residents of a rural community in the state of Amazonas and PCR was used to assess the incidence of these viruses in 250 samples collected in urban area of Manaus.

The results for serology suggest the movement of mayaro virus in the rural community. The seroprevalence detected in the samples was 41.5%. There was no significant relationship to risk for mayaro infection between genders (p value = 0.7760) or between age groups (p value = 0.9422). The positive serology detected among 39 children younger than 10 years indicates a recent infection. The factors of protection against mayaro infection detected were the use of mosquito net (p value = 0.0119) and the presence of animals in surrounding (p value = 0.0407). The risk factors identified for mayaro infection were the location of residence in towns near the forest (p value <0.0001) and presence of toilet in or near the home (p value = 0.0415). The serological results suggest that infection with mayaro occurred less than 10 years in the vicinity of residences analyzed.

Molecular analysis of the samples collected in the urban area of Manaus not detected genomic fragments of arboviruses. Factors such as low viremia at the time of blood collection and storage of serum samples may have contributed to the non-detection of genomic fragments. However, the protocol for the detection of genomic fragments of arboviruses based on the PCR technique is already used in research centers and surveillance of Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM and Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVÍRUS	1
1.2. TRANSMISSÃO.....	2
1.3. REPLICAÇÃO VIRAL	3
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DAS ARBOVIROSES E DIAGNÓSTICO ARBOVIRAL.....	4
1.5. ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	8
1.5.1. TOGAVIRIDAE: ALPHAVIRUS	9
<i>ALPHAVIRUS</i> DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA.....	11
A) VÍRUS MAYARO	11
B) VÍRUS DA ENCEFALITE EQUINA VENEZUELANA	12
1.5.2. FLAVIVIRIDAE: FLAVIVIRUS.....	13
<i>FLAVIVIRUS</i> DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA	14
A) VÍRUS DA DENGUE.....	14
B) VÍRUS DA FEBRE AMARELA	15
C) VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS.....	16
1.5.3. BUNYAVIRIDAE: ORTHOBUNYAVIRUS.....	17
<i>ORTHOBUNYAVIRUS</i> DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA.....	19
A) VÍRUS OROPOUCHE	19
1.6. PREVENÇÃO E CONTROLE DE ARBOVIROSES	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. METODOLOGIA	25
DELINEAMENTO DO ESTUDO	25
CONSIDERAÇÕES SOBRE ÉTICA EM PESQUISA.....	25
4.1. SOROLOGIA DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA RURAL (GRUPO 1).....	26
4.1.1. ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO	26

4.1.2.	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	27
4.1.3.	CRIAÇÃO E MANEJO DO BANCO DE DADOS.....	27
4.1.4.	PROCEDIMENTOS DE COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
4.1.5.	ANÁLISE SOROLÓGICA	28
4.1.6.	PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR	29
4.1.7.	PROCEDIMENTOS DE INFECÇÃO CELULAR.....	29
4.1.8.	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	30
4.1.9.	ANÁLISE DOS DADOS	33
4.2.	DETECÇÃO MOLECULAR VIRAL DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA URBANA (GRUPO 2).....	34
4.2.1.	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	34
4.2.2.	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
4.2.3.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO GENÔMICA	34
	A) EXTRAÇÃO DE RNA.....	35
	B) QUANTIFICAÇÃO DE RNA.....	35
	C) SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR	35
	D) IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS VIRAIS	36
	E) IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES VIRAIS	37
	F) TESTE DAS AMOSTRAS SELECIONADAS	38
5.	RESULTADOS.....	39
5.1.	SOROLOGIA DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA RURAL (GRUPO 1).....	39
5.1.1.	DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO	39
5.1.2.	DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DE SORO-REATIVOS	39
	A) GÊNERO, FAIXA ETÁRIA E SORO-REATIVIDADE	40
	B) SÍNDROME FEBRIL INDIFERENCIADA E A SORO-REATIVIDADE.....	41
	C) SOROPREVALÊNCIA DE MAYV DE ACORDO COM O LOCAL DE RESIDÊNCIA.....	42
	D) USO FREQUENTE DE MOSQUITEIRO E A SORO-REATIVIDADE	49
	E) INTERFERÊNCIA DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA NA SOROLOGIA.....	49
5.1.3.	ANÁLISE DE FATORES DE RISCO COLETIVOS.....	50
	A) PRESENÇA DE TOALETE E A SORO-REATIVIDADE	50

B) DESCARTE DOS DEJETOS PRODUZIDOS PELO DOMICÍLIO E A SORO-REATIVIDADE	52
C) PRESENÇA DE RESERVATÓRIO DE ÁGUA PRÓXIMO À RESIDÊNCIA E A SORO-REATIVIDADE	53
D) PRESENÇA DE ANIMAIS NAS PROXIMIDADES DA RESIDÊNCIA E A SORO-REATIVIDADE.....	55
5.2. DETECÇÃO MOLECULAR VIRAL DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA URBANA (GRUPO 2).....	56
5.2.1. PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE RNA.....	56
5.2.2. PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	56
5.2.3. DETECÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS VIRAIS EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	61
6. DISCUSSÃO	63
6.1. SOROLOGIA DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA RURAL (GRUPO 1).....	64
6.2. DETECÇÃO MOLECULAR VIRAL DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ZONA URBANA (GRUPO 2).....	73
7. CONCLUSÃO.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ANEXOS	89
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (GRUPO 1)	90
ANEXO II – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (GRUPO 2)	92
ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	93
ANEXO IV – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	94
ANEXO V – INFORMAÇÕES DO BANCO DE DADOS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICOS	95

Lista de Figuras

Figura 1.	Classificação das síndromes febris	5
Figura 2.	Fluxograma de rotina diagnóstica para pacientes febris	6
Figura 3.	Diagrama esquemático do genoma de <i>Alphavirus</i>	10
Figura 4.	Diagrama esquemático do genoma de <i>Flavivirus</i>	13
Figura 5.	Diagrama esquemático do genoma de <i>Orthobunyavirus</i>	18
Figura 6.	Imagem de satélite sobre a comunidade de Rio Pardo	26
Figura 7.	Placa de cultura de tecidos utilizada para o ensaio enzimático	31
Figura 8.	Unidade geográfica (UG) amostral 2	43
Figura 9.	Unidade geográfica (UG) amostral 4	43
Figura 10.	Unidade geográfica (UG) amostral 1	44
Figura 11.	Unidade geográfica (UG) amostral 3	45
Figura 12.	Unidade geográfica (UG) amostral 5	45
Figura 13.	Unidade Geográfica (UG) amostral 6	46
Figura 14.	Unidade Geográfica (UG) amostral 7	47
Figura 15.	Toalete no interior da residência	51
Figura 16.	Toalete no exterior da residência	51
Figura 17.	Cacimba: Reservatório de água	54
Figura 18.	Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 1	57
Figura 19.	Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 2	58
Figura 20.	Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 3	59
Figura 21.	Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 4	60
Figura 22.	Detecção de <i>Alphavirus</i> em amostras de soro	61

Figura 23	Detecção de <i>Flavivirus</i> em amostras de soro	62
Figura 24	Detecção de <i>Orthobunyavirus</i> em amostras de soro	62

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Tempo para observação de efeito citopatogênico	30
Tabela 2.	Oligonucleotídeos gênero-específicos	36
Tabela 3.	Oligonucleotídeos espécie-específicos	37
Tabela 4.	Distribuição da população segundo gênero e faixa etária	39
Tabela 5.	Distribuição da soro-reatividade entre os gêneros	40
Tabela 6.	Distribuição da soro-reatividade entre as faixas etárias	40
Tabela 7	Distribuição de soropositivos para mayaro segundo relato de síndrome febril indiferenciada nos últimos 12 meses	42
Tabela 8	Características populacionais das unidades geográficas amostrais	48
Tabela 9	Relação entre o uso de mosquiteiro e a soro-reatividade	49
Tabela 10.	Relação entre a criação de animais e a soro-positividade	55

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Distribuição de indivíduos soropositivos para mayaro de acordo com o gênero e faixa etária	41
Gráfico 2	Distribuição de indivíduos soropositivos para mayaro de acordo com as unidades geográficas amostrais	48
Gráfico 3	Relação entre imunização prévia contra febre amarela e a soro-reatividade para mayaro	50
Gráfico 4	Relação entre presença/ausência de toaletes e a soro-reatividade	52
Gráfico 5	Relação entre a soro-reatividade e o descarte de lixo	53
Gráfico 6	Relação entre a presença/ausência de reservatório de água próximo ao domicílio e a soro-reatividade	54

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABTS – 2,2"-Azino-bis(3-Etilbenzetiazolino-6-Ácido Sulfônico)	IgG – Imunoglobulina G
BUNV – Vírus Bunyamwera	IgM – Imunoglobulina M
cBF – Complexo <i>Barmah Forest</i>	IH – Inibição da Hemaglutinação
cDNA – DNA complementar	ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane
cEEE – Complexo <i>Eastern Equine Encephalitis</i>	JEV – Vírus da Encefalite Japonesa
CHIKV – Vírus Chikungunya	MAYV – Vírus Mayaro
cMID – Complexo <i>Middelburg</i>	MIAF – Fluido Ascítico Murino Imunizado
cNDU – Complexo <i>Ndumu</i>	MS – Ministério da Saúde
CPE – Efeito citopatogênico	MVEV – Vírus da encefalite de Murray Valley
cSF – Complexo <i>Semliki Forest</i>	OMS – Organização Mundial da Saúde
cTBV – Complexo <i>Tick-borne virus</i>	ORF – <i>Open Reading Frame</i>
cVEE – Complexo <i>Venezuelan Equine Encephalitis</i>	OROV – Vírus Oropouche
cWEE – Complexo <i>Western Equine Encephalitis</i>	PAHO – Pan American Health Organization
DBS – <i>Dry Blood Spots</i>	PBS – <i>Phosphated Buffered Saline</i>
DENV – Vírus da Dengue	PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
DF – Grau de Liberdade	RNA – Ácido Ribonucléico
DNA – Ácido desoxirribonucléico	RR – Risco Relativo
EIA-ICC – <i>Enzymatic Immune Assay – Infected Cell Culture</i>	RT-PCR – <i>Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i>
ELISA – <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	RUBV – Vírus da Rubéola
EUA – Estados Unidos da América	RVFV – Vírus da febre de Rift Valley
FC – Fixação do Complemento	SFI – Síndrome Febril Indiferenciada
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz	SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto	TBEV – Vírus da encefalite de carrapatos
FMTAM – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas	TN – Teste de Neutralização
GUAV – Vírus Guamá	UG – Unidade Geográfica
IC – Intervalo de Confiança	USP – Universidade de São Paulo
IFI – Imunofluorescência Indireta	VEEV – Vírus da Encefalite Eqüina Venezuelana
	WNV – Vírus West Nile
	X ² – Qui-quadrado
	YFV – Vírus da Febre Amarela

1. INTRODUÇÃO

Arbovirose é uma doença infecciosa aguda, causada por um grupo heterogêneo de vírus que possui características epidemiológicas em comum. Tais vírus são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, pertencentes às famílias Ixodidae (carrapatos), Culicidae (mosquitos), Ceratopogonidae (mosquitos-pólvora) e Psychodidae (mosquitos-palha/flebótomos) (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; CHARREL *et al.*, 2004; MERCER & CASTILLO-PIZANGO, 2005; AMARO *et al.*, 2007). O termo “arbovírus” é o acrônimo da expressão de origem inglesa **Arthropod-borne virus** (vírus transmitido por artrópode) que atualmente é empregado de maneira ilustrativa, não sendo utilizado para a classificação taxonômica destes vírus.

1.1. Características Gerais dos Arbovírus

A classificação dos arbovírus é realizada a partir das características físico-químicas e propriedades antigênicas dos vírus (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997). O catálogo internacional de arbovírus registra mais de 500 vírus, dos quais cerca de 130 são considerados causadores de doenças em humanos e 40 em animais domésticos. Os arbovírus ocorrem em sete famílias virais: *Asfarviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (MILLER, 2008).

Os arbovírus possuem um genoma constituído por ácido ribonucléico (RNA), sendo as únicas exceções os vírus pertencentes à família *Asfarviridae*, que apresentam o ácido desoxirribonucléico (DNA) como material genético (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; KLEIBOEKER & SCOLES, 2001). A estrutura genômica dos vírus formados por RNA é variada, podendo apresentar-se em fita simples, ou fita dupla; segmentado ou não-segmentado. Acredita-se que a grande variabilidade genética proporcionada pelas características da molécula de RNA permite a propagação destes vírus em hospedeiros vertebrados e invertebrados (WEAVER, 2006).

Alguns vírus classificados em famílias pertencentes ao grupo dos arbovírus não são transmitidos por artrópodes, portanto, não são considerados arbovírus. Como exemplos, o hantavírus (*Bunyaviridae: Hantavirus*), transmitido pelas excretas de

roedores, agente etiológico da síndrome pulmonar hemorrágica e síndrome renal febril em humanos (FERREIRA, 2003); e o vírus da hepatite C (*Flaviviridae: Hepacivirus*), transmitido por vias parenterais, como transfusão de sangue contaminado, causador de infecções hepatotrópicas persistentes (MAHESHWARI; RAY; THULUVATH, 2008).

1.2. Transmissão

A infecção de um mesmo tipo viral em diferentes espécies, aparentemente é incomum. Atualmente, existem dois padrões de transmissão viral nos quais a maioria dos vírus pode ser classificada: (a) vírus mantidos em uma única espécie; e (b) arbovírus, que se alternam entre infecções em insetos e vertebrados. Poucos são os vírus capazes de atravessar a barreira de espécies como os arbovírus fazem. Dentre eles estão os vírus influenza e o vírus da raiva que apesar de pertencerem às famílias que abrigam arbovírus não são transmitidos por artrópodes (NATHANSON, 2007).

A transmissão dos arbovírus ocorre no momento do repasto sangüíneo realizado por um inseto hematófago. Uma vez infectado, o inseto transmite o vírus presente em suas glândulas salivares para um hospedeiro vertebrado susceptível. O vertebrado recém infectado desenvolve viremia com título e duração suficientes para infectar outros artrópodes que venham a se alimentar de seu sangue. Para alguns arbovírus a transmissão trans-ovariana no hospedeiro artrópode é uma alternativa ao ciclo de manutenção viral. Encontrados, por vezes, em machos (não hematófagos) tal sistema de transmissão não é fundamental para a disseminação viral (NATHANSON, 2007).

As arboviroses são essencialmente zoonoses; infecções que ocorrem na natureza envolvendo vetores e hospedeiros selvagens. No entanto, a domiciliação de algumas espécies de vetores selvagens proporcionou a adaptação de agentes infecciosos virais ao hospedeiro humano, que neste caso atua como hospedeiro final. Na maioria das vezes as infecções humanas são acidentais, ocorrendo quando o homem frequenta o meio em que o vírus está circulando. Infecções em hospedeiros finais raramente resultam na transmissão para outro hospedeiro (HERVÉ *et al.*, 1986).

Apenas dois arbovírus, o vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV) urbana, têm o homem como principal hospedeiro vertebrado (FORATTINI, 2002b). O vírus Oropouche (OROV), embora mantido em um ciclo silvestre, é

frequentemente isolado em áreas urbanas, sendo transmitido ao homem principalmente por mosquitos-pólvora, insetos da espécie *Culicoides paraensis* (PINHEIRO *et al.*, 1986).

As arboviroses podem ser classificadas como enzoóticas, quando envolvem casos esporádicos indeterminados, ou epizooticas, quando há registros de ocorrências significantes. Infecções por arbovírus que ocorrem em ciclos enzoóticos são geralmente causadas pela entrada do vertebrado susceptível no ciclo natural vírus-artrópode. Tais infecções são denominadas selvagens ou rurais. Já as epizootias resultam da introdução de um arbovírus em uma população de vertebrados susceptíveis em conjunto com uma população de vetores competentes. Esta situação está geralmente associada a condições cíclicas naturais, como chuvas intensas que propiciam o crescimento da população de insetos vetores e resulta em surtos epidêmicos significativos (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

1.3. Replicação viral

Os arbovírus são capazes de infectar diversos animais susceptíveis e tipos celulares. Duas hipóteses foram propostas para explicar este fenômeno. Ambas pesquisam as proteínas de superfície encontradas na partícula viral infecciosa (*virion*). Acredita-se que a adesão e entrada do *virion* na célula hospedeira ocorrem através da interação de receptores celulares específicos às proteínas do envelope viral. Os dados laboratoriais nos quais as hipóteses são baseadas levam a crer que a conjunção das duas seria a real estratégia de acoplamento e entrada do *virion* à célula hospedeira (KERR; WEIR; DALGARNO, 1993).

Ainda não se sabe como os receptores celulares garantem a entrada do vírus na célula. Duas categorias de receptores já foram identificadas atuando durante a adesão do vírus à membrana e invasão da célula: receptores de glicoproteínas e receptores de lamininas. Após a adesão, um vacúolo endocítico é formado e carrega o *virion* para o citoplasma. Com a diminuição do pH em direção ao núcleo celular o envelope viral se funde com a membrana endossomal e o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. Uma vez no citoplasma o nucleocapsídeo é degradado e o RNA genômico é exposto. Quando no citoplasma, o RNA genômico de polaridade positiva atua como RNA

mensageiro para síntese de proteínas não estruturais e de replicação. O RNA genômico de polaridade negativa sofre uma transcrição em RNA mensageiro antes do início da tradução das proteínas. O RNA mensageiro atua como molde para tradução de todas as proteínas virais e para replicação do RNA. A replicação do RNA ocorre em complexos protéicos associados à membrana perinuclear. As partículas virais são finalizadas no retículo endoplasmático e enviadas para as vias secretórias da célula para liberação (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

1.4. Aspectos Clínicos das Arboviroses e Diagnóstico Arboviral

As infecções arbovirais podem se manifestar clinicamente como síndromes indiferenciadas, tais como febre (temperatura axilar $\geq 38^{\circ}\text{C}$) e encefalite, ou apresentar sintomas clínicos mais severos, como mialgia, exantemas, artrite ou febre hemorrágica (NALCA; FELLOWS; WHITEHOUSE, 2003). Por apresentar sintomas clínicos inespecíficos, os quais não caracterizam a enfermidade, o diagnóstico das arboviroses não é simples.

De acordo com guia de diagnóstico e manejo clínico do Ministério da Saúde (MS) o diagnóstico sindrômico diferencial deve ser realizado em conjunto com o diagnóstico laboratorial. Infecções clinicamente semelhantes às arboviroses e que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial são: influenza, enteroviroses, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, parvovirose, eritema infeccioso, mononucleose infecciosa, exantema súbito, citomegalovirose), hepatites virais, abscesso hepático, escarlatina, meningococcemia, leptospirose, malária, salmonelose, riquetsioses, doença de *Henoch-Schonlein*, doença de *Kawasaki*, púrpura auto-imune, farmacodermias e alergias cutâneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE & SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2007).

Com a intenção de auxiliar o diagnóstico clínico a Organização Mundial da Saúde (OMS) disponibiliza um quadro de classificação das síndromes de acordo com os sintomas apresentados pelo paciente (Figura 1). A classificação dos sintomas auxilia o profissional de saúde a decidir a conduta diagnóstica e terapêutica a serem aplicadas.

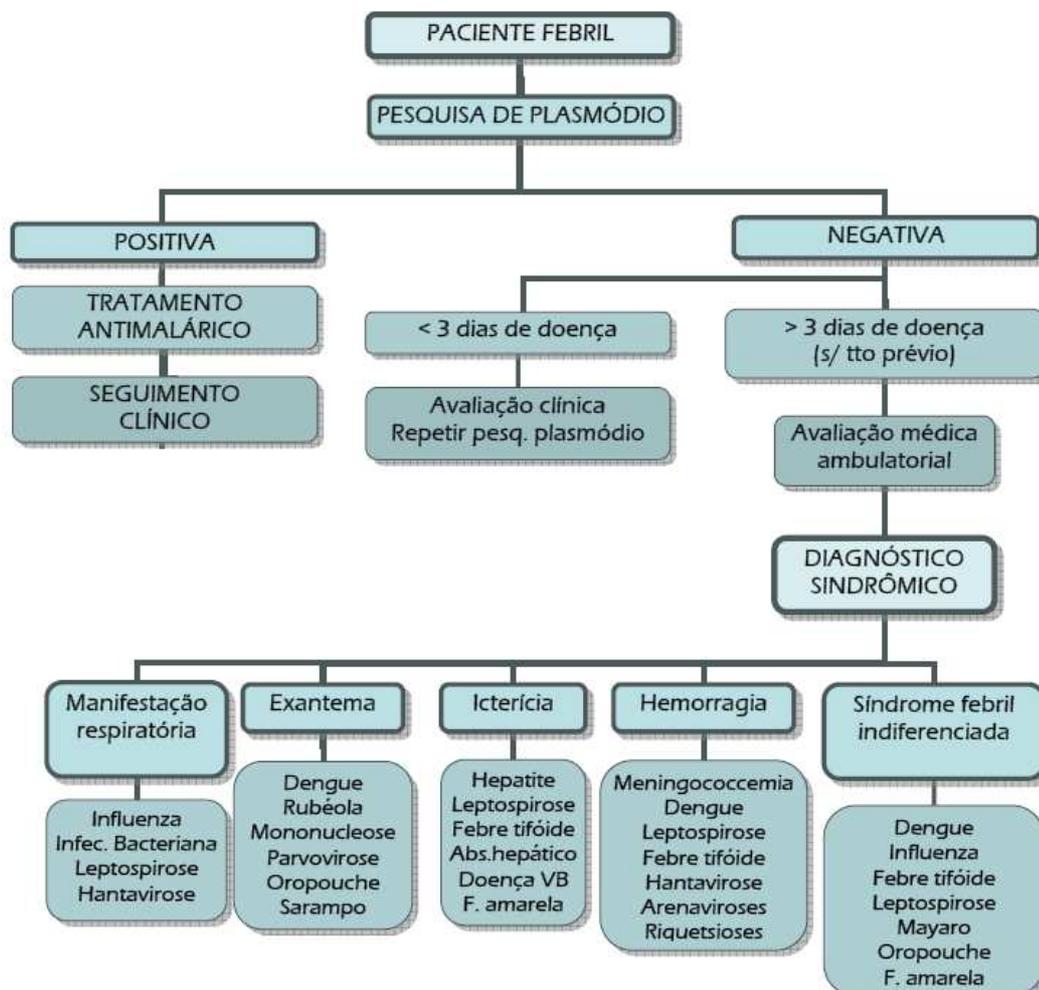
Figura 1. Classificação das síndromes febris

Síndrome Febril Indiferenciada	Febre sem etiologia óbvia, com menos de 7 dias de evolução, em paciente acima de 5 anos de idade previamente saudável.
Síndrome Febril Hemorrágica Aguda	Febre aguda, acompanhada de sinais de hemorragia espontânea (mucosa, cutânea, intestinal, pulmonar, renal e outras) ou induzida (prova do laço positiva).
Síndrome Febril Ictérica	Febre em paciente com mais de 1 ano de idade, acompanhada de icterícia aguda ou insidiosa, na ausência de colelitíase, obstrução biliar ou malignidade detectáveis.
Síndrome Febril Íctero-Hemorrágica Aguda	Febre em paciente com mais de 1 ano de idade, acompanhada de sinais de síndrome icterícia aguda e síndrome hemorrágica aguda, conforme definições anteriores.

Adaptado (OPAS, 2000)

No Município de Manaus, Amazonas, os casos de síndromes febris seguem a rotina de diagnóstico laboratorial estabelecida pelo fluxograma instituído pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM). Visto que a Região Amazônica é endêmica para a malária, o primeiro exame realizado é a gota espessa em busca de plasmódio. Sendo este exame negativo os pacientes são encaminhados à avaliação médica, na qual o diagnóstico diferencial laboratorial é efetivado (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma de rotina diagnóstica para pacientes febril



Adaptado (FMTAM, 2003).

O diagnóstico laboratorial das infecções por arbovírus baseia-se atualmente no isolamento viral para posterior identificação. O isolamento pode ser feito pela inoculação de fluidos contaminados em cultura celular, ou ainda pela inoculação direta em cérebro de camundongos recém-nascidos (DE PAULA & FONSECA, 2004). A infecção experimental de mosquitos também pode ser utilizada, embora não seja recomendada para vírus altamente patogênicos, tais como o YFV. Apesar de a manipulação viral em cultura ser o método mais eficaz para a identificação viral, é uma técnica trabalhosa, que consome muito tempo e requer unidades de biossegurança nível 3, o que dificulta o trabalho de pequenos centros de diagnóstico (O'GUINN *et al.*, 2004).

A identificação viral é realizada através de técnicas sorológicas como a Inibição da Hemaglutinação (IH), Fixação de Complemento (FC), Teste de Neutralização (TN) e a Imunofluorescência Indireta (IFI). Desde meados da década de 1980 o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é utilizado. Quando empregado com anticorpos monoclonais, o ELISA garante a detecção de imunoglobulinas da classe M (IgM) e G (IgG) do soro de pacientes infectados de maneira muito satisfatória. Contudo, devido às altas taxas de reatividade cruzada e à incapacidade de identificação de sorotipos virais, especialmente nos casos de dengue, a tendência atual é utilizar técnicas de detecção de ácido nucléico como complemento ao diagnóstico sorológico (DE PAULA e FONSECA, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em um instrumento de identificação muito preciso que elimina reações cruzadas, constantes nos teste sorológicos (HENCHAL *et al.*, 1991). Aliada as outras técnicas moleculares, como a transcrição reversa (RT-PCR) ou sondas fluorescentes (PCR em tempo real), a PCR possibilita identificar rapidamente a etiologia de diversas infecções virais com uma boa especificidade. A técnica é amplamente utilizada quando há necessidade de um diagnóstico rápido para tratamento clínico e no controle de epidemias ou de vetores (HOWE *et al.*, 1992; MONROY; SCOTT; WEBB, 1996; DEUBEL *et al.*, 1997).

1.5. Arbovírus de Importância para a Saúde Pública

Desde meados do século XIX, quando foi descoberto que insetos hematófagos são capazes de transmitir doenças a humanos, centenas de microrganismos veiculados por vetores artrópodes vêm sendo encontrados. A malária é a doença transmitida por vetor com maior morbidade mundial. Anualmente, mais de 500 milhões de pessoas adoecem gravemente de malária (OMS, 2007). Embora esta seja a principal doença transmitida por vetor, com maior distribuição global e número de mortes, as arboviroses humanas ainda a superam em números de casos (GUBLER, 1998).

As doenças transmitidas por vetores estão entre as doenças infecciosas emergentes/re-emergentes de maior importância para saúde pública, atingindo principalmente as regiões tropicais e subtropicais do planeta, onde as condições ambientais favorecem a proliferação destes insetos. Diversos arbovírus estão envolvidos com doenças febris benignas em poucos e esporádicos casos, contudo, algumas espécies virais se destacam por causarem epidemias e patologias severas. Os arbovírus com maior importância para a saúde humana estão classificados nas famílias *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*; *Bunyaviridae* gênero *Orthobunyavirus* e *Flaviviridae* gênero *Flavivirus* (GUBLER, 2002).

Nos últimos 10 anos observa-se a re-emergência de infecções arbovirais em todo o mundo. Surtos que até então eram restritos a certas regiões do planeta vêm sendo descritos em novas localidades. A re-emergência do vírus Chikungunya (CHIKV) na Ásia, surtos do vírus do Oeste do Nilo (WNV) e do vírus da febre de Rift Valley (RVFV) na América e na Europa são cada vez mais frequentes (SCHATZMAYR, 2001; HAYES *et al.*, 2005; GOULD *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2007; VOROU; PAPAVALASSILOU; TSIODRAS, 2007; POWERS & LOGUE, 2007). De acordo com a OMS, a dengue é a arbovirose de maior incidência mundial, comprometendo anualmente cerca de 50 milhões de pessoas. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas em todo o mundo estejam sob risco de contrair dengue (OMS, 2008).

No continente americano as arboviroses estão distribuídas nas regiões equatoriais, tropicais e subtropicais. Estudos recentes têm demonstrado a presença de alguns tipos virais causadores de surtos e epidemias na América do Sul, atingindo inclusive o território brasileiro. Com exceção ao DENV, distribuído por todo o país, o

YFV, o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus mayaro (MAYV), o vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) e o vírus oropouche (OROV) exibem uma distribuição restrita, porém intensa, ocorrendo principalmente na Bacia Amazônica e no Pantanal (TESH *et al.*, 1999; GUBLER, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2004; AGUILAR *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2007; MONDINI *et al.*, 2007).

1.5.1. *Togaviridae: Alphavirus*

Togaviridae foi a primeira família de arbovírus a ser classificada. A origem deste nome deve-se ao fato de os primeiros arbovírus observados por microscopia eletrônica se assemelharem a antigas togas romanas. Inicialmente, era formada pelo Grupo A (*Alphavirus*) e Grupo B (*Flavivirus*), até a adição dos gêneros *Rubivirus* e *Pestivirus* à família. A inclusão destes dois novos gêneros foi realizada com base em propriedades físicas semelhantes aos togavírus, mesmo estes não sendo transmitidos por artrópodes (KUHN, 2007).

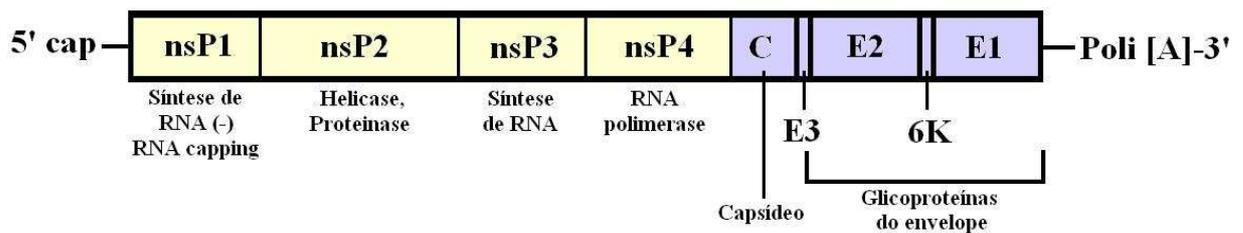
Com o avanço da genética a partir da década de 1960, o desenvolvimento do seqüenciamento nucleotídico e o estudo dos genomas virais viabilizaram a observação de diferenças genéticas importantes entre os grupos e uma nova classificação foi proposta. Atualmente, a família *Togaviridae* é composta pelos gêneros *Alphavirus* e *Rubivirus*, que embora compartilhem semelhanças na organização do genoma e características físicas do *virion*, possuem estratégias distintas quanto à replicação e montagem da partícula viral (STRAUSS *et al.*, 2005).

Somente os vírus classificados no gênero *Alphavirus* são transmitidos por artrópodes. Estes vírus são formados por um nucleocapsídeo arredondado de 40nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, além de um envelope bi-lipídico derivado da membrana plasmática do hospedeiro. Podem variar de uma forma esférica a pleomórfica, medindo aproximadamente 70nm de diâmetro. A superfície é coberta uniformemente com projeções glicoprotéicas. O genoma é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, linear, não-segmentado, de polaridade positiva. Apresenta entre 9700-11800 nucleotídeos, um *cap* metilado no terminal 5' e uma seqüência poliadenilada no terminal 3'. Dois terços do genoma codificam as proteínas

não-estruturais (nsP1 – 4). A parte terminal 3' codifica uma poliproteína que dá origem às proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) (STRAUSS & STRAUSS, 1994).

Na figura 3 observa-se a organização do genoma de um *Alphavirus*, os produtos gênicos e suas funções associadas.

Figura 3. Diagrama esquemático do genoma de *Alphavirus*



Em azul estão representadas as proteínas estruturais, em amarelo as não estruturais.

Adaptado (POWERS *et al.*, 2001)

O gênero *Alphavirus* possui 29 representantes distribuídos por sorogrupos (vírus relacionados pela reatividade cruzada em testes sorológicos). Os sorogrupos são determinados por sítios antigênicos comuns criados provavelmente por seqüências conservadas na proteína C e glicoproteína E1 dos diversos vírus do gênero.

A partir da reatividade imunogênica cruzada os vírus podem ser organizados em complexos antigênicos. O complexo antigênico determina membros de um sorogrupo estreitamente relacionados. Os *Alphavirus* são organizados em sete complexos antigênicos: complexo *Barmah Forest* (cBF), complexo *Easter Equine Encephalitis* (cEEE), complexo *Middelburg* (cMID), complexo *Ndumu* (cNDU), complexo *Semliki Forest* (cSF), complexo *Venezuelan Equine Encephalitis* (cVEE) e complexo *Western Equine Encephalitis* (cWEE). Os complexos cBF, cEEE, cMID e cNDU possuem apenas um vírus cada, enquanto o cSF, cVEE e cWEE são formados por diversos vírus (GRIFFIN, 2007).

A patogênese dos vírus classificados neste gênero está intrinsecamente relacionada à sua distribuição geográfica. Observa-se que vírus encontrados no Velho Mundo causam exantemas, artralgia e artrite. Já aqueles encontrados no Novo Mundo causam, na maior parte dos casos, encefalites. Entretanto, exceções foram reportadas. Dentre elas o MAYV, restrito à América do Sul, apresenta como principal sintoma a artralgia (POIDINGER *et al.*, 1997).

ALPHAVIRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA

Na América do Sul, especialmente na Bacia Amazônica, os arbovírus do gênero *Alphavirus* com maior incidência são o MAYV, membro do cSF e o VEEV pertencente ao cVEE.

a) Vírus Mayaro

O primeiro isolamento do MAYV foi feito em 1954, a partir de amostras sanguíneas de cinco pacientes febris moradores da ilha de Trindade, em Trindade e Tobago, no Caribe, e em seguida de diversas pessoas residentes as margens do rio Guamá, no Estado do Pará, Brasil (ANDERSON *et al.*, 1957; CAUSEY & MAROJA, 1957). No ano de 1978, outro surto foi identificado no Estado do Pará. No município de Belterra foram confirmados mais de 50 casos de febre por MAYV, sendo 43 por sorologia e isolamento viral (PINHEIRO *et al.*, 1981). Nenhum óbito foi registrado em tais surtos.

O MAYV ocorre de forma enzoótica na América do Sul, sendo responsável por pequenos surtos de febres exantemáticas na população rural, visto que seu inseto vetor, *Haemagogus janthinomys*, é raramente encontrado nas áreas urbanas. Os casos de infecção humana por MAYV são bem esporádicos e envolvem pessoas que trabalham ou residem em regiões de mata tropical densa (TESH *et al.*, 1999). Os principais sintomas relacionados à infecção pelo MAYV aparecem como uma doença febril aguda, com duração de 3 a 5 dias, caracterizada por dores de cabeça, artralgias, mialgias, por vezes acompanhadas por vômito, diarreia e exantemas. Em casos mais severos a infecção pode provocar um quadro grave de artrite que pode perdurar por meses (PINHEIRO e LE DUC, 1998).

Infecções por MAYV foram detectadas em Manaus através de exames sorológicos (IgM) durante epidemia de dengue ocorrida entre 1998 e 1999 (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2004). Em 2003, um levantamento sorológico em mamíferos reservatórios nas florestas da Guiana Francesa identificou uma prevalência de até 52% de soro-positividade entre as espécies analisadas (DE THOISY *et al.*, 2003). O último caso registrado na literatura científica envolvendo infecções por MAYV em humanos ocorreu recentemente, em 2007, no Brasil. De acordo com o relato registrado no Estado

de São Paulo, três pacientes provenientes do município de Camapuã, Mato Grosso do Sul, apresentaram soro-conversão para MAYV. O isolamento viral foi realizado somente em uma das amostras (COIMBRA *et al.*, 2007).

b) Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

Os vírus das Encefalites Equinas do Leste, do Oeste e Venezuelana são mantidos na natureza por algumas espécies de mosquitos, tendo como hospedeiros naturais pequenos roedores e aves selvagens. Todos estes três vírus são enzoóticos na América do Sul. No entanto, o EEEV e o WEEV também podem ser encontrados no sul dos Estados Unidos e em todo o território mexicano. As espécies de *Culex* são as responsáveis por transmitir ambos os vírus desde a América Central à Argentina.

O VEEV foi primeiramente isolado do cérebro de cavalos na região de La Guajira, Venezuela, em 1936 (BECK & WYCKOFF, 1938). Os primeiros casos humanos reportados ocorreram em pessoas que trabalhavam com o vírus em laboratório (LENNETTE & KOPROWSKI, 1943). Desde então, a doença em humanos é registrada em paralelo a surtos de encefalite equina. Epizootias do VEEV ocorrem frequentemente na América do Sul. No ano de 1969 ocorreu uma pandemia que se alastrou por toda a América Central, atingindo o Estado do Texas, nos Estados Unidos da América (EUA) em 1973 (MORILLA-GONZALES & DE MUCHA-MACIAS, 1969; SUDIA *et al.*, 1975). Após vinte anos, e a crença na erradicação do vírus das Américas, outra grande epizootia atingiu a Venezuela e a Colômbia, onde 75 mil casos foram confirmados (CDC, 1995; RICO-HESSE *et al.*, 1995; WEAVER *et al.*, 1996).

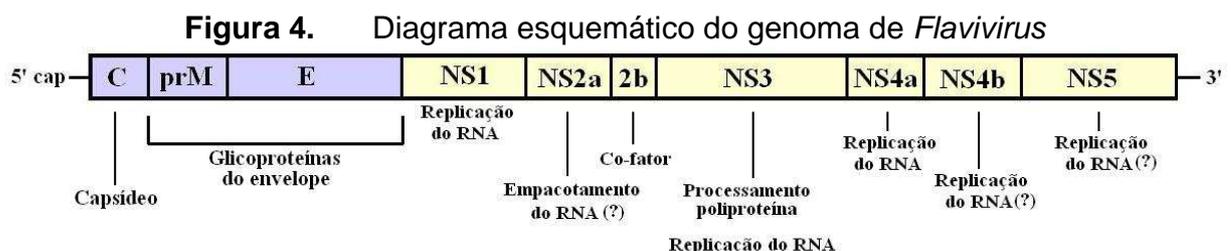
Estudos entomológicos sugerem a existência de ciclos de transmissão enzoóticos e epizoóticos diferenciados para este vírus. Especula-se que o ciclo enzoótico seria mantido por mosquitos *Culex (Melanoconion) spp.* em pequenos mamíferos reservatórios (roedores e marsupiais). Já as epizootias surgiriam a partir de uma mutação do vírus. O vírus modificado, carregado por culicíneos, seria então capaz de infectar grandes mamíferos (cavalos e humanos). O ciclo reiniciaria com a infecção de vetores mamofílicos (*Psorophora sp.*, *Aedes (Ochlerotatus) sp.*) e a subsequente transmissão para vertebrados susceptíveis (GRIFFIN, 2007).

1.5.2. *Flaviviridae: Flavivirus*

Embora um dos principais representantes da atual família *Flaviviridae*, o YFV, tenha sido o primeiro vírus humano a ser descoberto (REED; CARROLL; AGRAMONTE, 1901), a família *Flaviviridae* não foi descrita antes da utilização da biologia molecular como ferramenta de classificação viral.

Alguns dos vírus hoje pertencentes à família *Flaviviridae*, eram antes distribuídos por antigenicidade e características morfológicas semelhantes e classificados no Grupo B (flavivírus) da família *Togaviridae*. Atualmente, esta família é composta por três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (THIEL; COLLETT; GOULD, 2005).

Somente os vírus classificados no gênero *Flavivirus* são transmitidos por artrópodes. De maneira geral, os vírus pertencentes a este gênero são formados por um núcleo isométrico com diâmetro entre 25-30nm e um nucleocapsídeo poliédrico abrigado em um envelope bi-lipídico proveniente da membrana plasmática do hospedeiro. Os *virions* são esféricos, medindo entre 40-60nm de diâmetro e apresentam pequenas espículas como projeções de superfície. Possuem o genoma formado por uma molécula de RNA de fita simples linear, de polaridade positiva, medindo entre 9500-12500 nucleotídeos. No terminal 5' do genoma há um *cap* metilado (proteína vinculada ao genoma – VPg). No terminal 3' nenhuma seqüência poliadenilada é encontrada, com exceção de algumas cepas do complexo de vírus transmitidos por carrapatos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A fase aberta de leitura do genoma dá origem a uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos, que após clivagem resulta em três proteínas estruturais (E, M e C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). A figura 4 ilustra a organização do genoma de um *Flavivirus*.



Em azul estão representadas as proteínas estruturais, em amarelo as não estruturais.

Adaptado (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007)

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são classificados em complexos e subcomplexos antigênicos baseados em critérios sorológicos de reatividade imunogênica cruzada e de acordo com filogenia molecular. O gênero abriga mais de 70 vírus, sendo a maioria arbovírus patogênicos aos humanos. Os arbovírus de maior importância global são o DENV, o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o YFV (GUBLER, 2001). Outros vírus de importância regional incluem o vírus da encefalite de Murray Valley (MVEV), o SLEV e o vírus da encefalite de carrapatos (TBEV) (MCCORMACK & ALLWORTH, 2002; MONDINI *et al.*, 2007; LINDQUIST & VAPALAHTI, 2008).

O gênero *Flavivirus* é formado por três complexos virais: a) o complexo dos vírus transmitidos por carrapatos, que abriga o grupo de vírus de mamíferos com 15 vírus descritos, e o grupo de vírus de aves marinhas com 4 vírus descritos; b) o complexo dos vírus transmitidos por mosquitos, que é composto por sete grupos, sendo os mais importantes o grupo dos vírus da dengue com 5 vírus descritos, o grupo da encefalite japonesa com 10 vírus descritos, e o grupo dos vírus da febre amarela com 9 vírus descritos; c) o complexo dos vírus sem vetor conhecido, que é formado por três grupos distintos: grupo dos vírus dos morcegos de Entebbe com 3 vírus descritos, grupo dos vírus de Modoc com 6 vírus descritos e grupo dos vírus de Rio Bravo com 7 vírus descritos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

FLAVIVIRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA

a) Vírus da Dengue

O DENV, atualmente o arbovírus com maior incidência mundial, está distribuído por todo o planeta desde o século XVIII (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007). Exibe um perfil estritamente urbano, transmitido por mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, e em algumas localidades pelo *Aedes albopictus*. A espécie viral é composta por quatro sorotipos (DENV1 – 4). Em humanos a sintomatologia pode variar desde uma febre inaparente ou fraca (febre clássica por dengue), até um quadro grave de hemorragia (dengue hemorrágica).

Com a reforma sanitária promovida por Oswaldo Cruz a partir de 1904, a fim de eliminar a febre amarela urbana, o Brasil foi decretado livre do *Aedes aegypti* em 1955

(FRANCO, 1961). Observa-se que no período entre 1923 e 1981 não houve casos de dengue no país. A partir de 1981, com a reentrada do vetor, a expansão da epidemia que ocorria no Caribe e América Central chegou ao Estado de Roraima. Acredita-se que mais de 10 mil pessoas foram infectadas pelos subtipos DENV1 e DENV4 na época (RICO-HESSE, 1990).

O subtipo DEN1 se dispersou por todas as regiões do país, causando epidemias nos grandes centros urbanos. Em 1990, o subtipo DENV2 foi identificado durante epidemia no município do Rio de Janeiro. Sucessivas epidemias ocorreram na região; os subtipos DENV1 e DENV2 circularam concomitantemente por cerca de 10 anos no Rio de Janeiro. A partir de amostra de sangue de uma pessoa que retornou ao Brasil de viagem da Nicarágua foi isolado o subtipo DENV3, em 1999. A entrada de mais um sorotipo no país foi responsável pelo incremento dos casos de febre clássica por dengue e dengue hemorrágico (FIGUEIREDO, 2000).

Recentemente foi identificado o sorotipo DENV4, em Manaus, Amazonas. Não havia relatos de infecções por este sorotipo desde 1981. Amostras de soro de pacientes foram testadas por técnicas sorológicas e moleculares, três amostras foram positivas para DEN4 (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

De acordo com a OMS, mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em área de risco de infecção por DENV. Aproximadamente 100 milhões de casos ocorrem por ano, destes, cerca de 250 – 500 mil são diagnosticados como dengue hemorrágica. Estima-se que 5% dos casos de dengue hemorrágica são fatais (OMS, 2008).

b) Vírus da Febre Amarela

O YFV ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da África e América do Sul. Seu ciclo primário de transmissão envolve vetores aedinos (*Aedes* e *Haemagogus*) silváticos e primatas não-humanos. Nas regiões urbanizadas o vetor responsável pela transmissão é o *Aedes aegypti*.

O YFV é responsável por um quadro de febre hemorrágica fatal entre 5% e 10% dos casos. Nos casos graves, que evoluem para síndromes íctero-hemorrágica e hepato-renal, o óbito pode chegar a 50%. Cerca de 90% dos casos notificados à OMS em todo o mundo estão localizados no Continente Africano. Estima-se a ocorrência de 300 casos anuais de febre amarela na América do Sul. No Brasil, a febre amarela

urbana está erradicada desde 1942, porém casos de febre amarela silvestres ainda são registrados (VASCONCELOS, 2003).

Entre dezembro de 2007 e janeiro de 2008, a situação epidemiológica do Brasil elevou-se ao estado de quarentena, com cerca de 40 casos suspeitos de febre amarela em Estados da Região Centro-Oeste do país, sendo 20 confirmados, dos quais 10 foram ao óbito (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2008).

c) Vírus da Encefalite de Saint Louis

O SLEV, membro do grupo da encefalite japonesa, foi primeiramente descrito em 1932, em Illinois, EUA. No ano seguinte, um grande surto de encefalite ocorreu na mesma região. Mais de 1000 casos clínicos foram identificados e pelo menos 200 mortes registradas. O SLEV foi identificado em diversas biópsias de cérebros humanos. Estima-se que o período de incubação do vírus seja de 4 a 21 dias. O aparecimento dos sintomas é abrupto. São relatadas febre, encefalite, tontura, náusea, anorexia, mialgia, faringite e tosse. Tais sintomas podem ser seguidos por meningite e sintomas neurológicos. Em alguns pacientes, a cura é espontânea, mas em certos casos a infecção do sistema nervoso central pode se desenvolver progressivamente (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007).

Até 1999, quando se detectou a presença do WNV, o SLEV era o único arbovírus da família *Flaviviridae* encontrado nos EUA. Atualmente, o SLEV é distribuído por todo o Continente Americano. Observa-se uma diferença quanto à virulência entre as amostras isoladas dos EUA e Canadá (mais virulentas) e do Caribe e América do Sul. O SLEV, na América do Sul, é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Culex*, em especial pela espécie *C. pipiens quinquefasciatus* (DIAZ *et al.*, 2006). Os principais hospedeiros deste vírus são aves peridomiciliares (Passeriformes e Columbiformes), contudo, diversos isolados já foram realizados em aves migratórias e mamíferos (DIAZ *et al.*, 2008).

No Brasil, inquéritos sorológicos em humanos reportaram a presença de anticorpos contra SLEV nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país. Os indivíduos pesquisados, no entanto, não apresentavam qualquer comprometimento neurológico (FIGUEIREDO, 2000). Somente em 2005 foi confirmada a primeira

encefalite causada por SLEV. O vírus foi isolado de um paciente com diagnóstico errôneo para dengue (ROCCO *et al.*, 2005).

Em 2006, foi identificado o primeiro surto de SLEV no país. Ocorreu na cidade de São José do Rio Preto, região noroeste do Estado de São Paulo. O surto foi detectado no momento de uma epidemia de dengue, por uma equipe do sistema de saúde responsável pelo diagnóstico sorológico daquela doença. Na ocasião, nas amostras de soro de pacientes com resultado sorológico negativo para DENV e YFV, foi realizada a detecção de fragmentos do genoma do SLEV por PCR. Seis amostras foram positivas para este vírus (MONDINI *et al.*, 2007).

1.5.3. *Bunyaviridae: Orthobunyavirus*

A família *Bunyaviridae* surgiu a partir do descobrimento de diversos arbovírus que não se encaixavam nos Grupos Antigênicos A e B da família *Togaviridae* (classificação proposta da época). O vírus Bunyamwera (BUNV), originalmente isolado de mosquitos do gênero *Aedes* na localidade de mesmo nome, em Uganda, durante um estudo acerca da febre amarela em 1943, foi o primeiro vírus alocado no Grupo Antigênico C da família *Togaviridae* (SMITHBURN; HADDOW; MAHAFFY, 1946). Após esta descoberta, diversos outros vírus foram encontrados e classificados no Grupo C. Com a separação dos Grupos Antigênicos da família *Togaviridae* os vírus classificados no Grupo C deram origem à família *Bunyaviridae*, nome que faz referência ao primeiro vírus do antigo Grupo C isolado (CASALS, 1963).

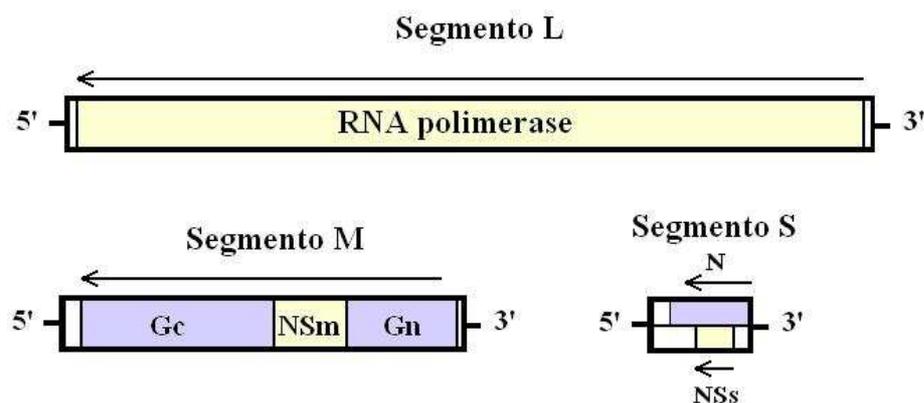
Cinco gêneros formam a família. Quatro gêneros de vírus que infectam animais (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus*), e um gênero infeccioso para plantas (*Tospovirus*). A maior parte dos vírus classificados nestes gêneros é transmitida por artrópodes. Fazem exceção os vírus do gênero *Hantavirus* transmitidos por aerossóis formados de excretas de roedores (NICHOL *et al.*, 2005).

Desde a descoberta do BUNV diversos sorogrupos foram criados para classificar os vírus desta família. O gênero *Orthobunyavirus*, maior gênero da família *Bunyaviridae*, contém atualmente mais de 150 vírus distribuídos por todo o mundo. Em geral, os *virions* do gênero *Orthobunyavirus* são formados por um nucleocapsídeo circular coberto por um envelope bi-lipídico. São morfologicamente esféricos, variando de 80nm

a 120nm de diâmetro. Tais *virions* apresentam a superfície coberta com projeções glicoprotéicas arredondadas. O genoma consiste em três segmentos de RNA de fita simples circulares denominados L, com aproximadamente 7000 nucleotídeos; M variando entre 3500-6000 nucleotídeos; e S variando entre 850-900 nucleotídeos. A circularização dos segmentos é possível devido às seqüências redundantes (complementares) em ambos os terminais. As seqüências terminais são pareadas e ligadas por pontes de hidrogênio, o que confere à molécula de RNA um caráter circular não-permanente. Cada *virion* formado possui apenas uma cópia de cada segmento do genoma (SCHMALJOHN e NICHOL, 2007).

A figura 5 ilustra o arranjo genético dos vírus do gênero *Orthobunyavirus*. O segmento S codifica duas proteínas na mesma janela de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*) de maneira sobreposta em anti-senso. Os polipeptídeos originam a nucleoproteína N e uma proteína não-estrutural (NSs). O segmento M codifica as glicoproteínas do envelope viral Gn e Gc na mesma ORF anti-senso. Neste gênero também é possível encontrar uma proteína não-estrutural (NSm). O segmento L utiliza a estratégia de codificação anti-senso para gerar a RNA polimerase RNA-dependente.

Figura 5. Diagrama esquemático do genoma de *Orthobunyavirus*



Em azul estão representadas as proteínas estruturais, em amarelo as não estruturais.
Adaptado (SCHMALJOHN e NICHOL, 2007)

Atualmente, cerca de 50 sorogrupos fazem parte deste gênero. Dentre estes se destacam como mais prevalentes os sorogrupos Bunyamwera, Califórnia, e Simbú.

ORTHOBUNYAVIRUS DE IMPORTÂNCIA PARA A REGIÃO AMAZÔNICA

a) Vírus Oropouche

Na América do Sul, o OROV, membro do grupo Simbú, se destaca como grande causador de síndromes febris. Desde o primeiro isolamento em 1955 na ilha de Trindade, (ANDERSON *et al.*, 1961), em Trindade e Tobago, diversos estudos têm associado o OROV com epidemias de síndrome febril, particularmente na região da Bacia Amazônica localizada entre o Peru e a Região Norte do Brasil. A primeira epidemia urbana causada pelo OROV foi registrada na cidade de Belém, Pará, Brasil (PINHEIRO *et al.*, 1962). Estima-se que 11 mil pessoas foram infectadas na época.

O vírus é mantido na natureza por um ciclo silvestre e outro urbano. Suspeita-se que o mosquito *Aedes serratus* possa ser o vetor silvestre do Oropouche, que apresenta como reservatórios silvestres diversas aves e mamíferos de médio porte. O ciclo urbano ocorre geralmente em épocas chuvosas, quando o vetor *Culicoides paraensis* tem maior capacidade de se reproduzir nos acúmulos de água. Febre, cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobia são os sintomas habituais desta doença. Descreve-se, em 5% dos casos, exantema morbiliforme, semelhante à rubéola e são descritos casos com náuseas, vômitos, diarreia, congestão conjuntival, dor epigástrica e dor retro-ocular. As manifestações hemorrágicas em pacientes co-infectados com dengue não são incomuns e podem ser graves. Hemorragias superficiais, como petéquias, são as mais comuns, entretanto podem ser acompanhadas de menorragia e hemorragia gastrintestinal. O vírus Oropouche pode ainda infectar o sistema nervoso central, produzindo meningite asséptica (linfomonocitária), que tem evolução benigna (ANDERSON *et al.*, 1961; PINHEIRO *et al.*, 1962).

Após o primeiro relato de epidemia de febre por OROV, ocorreram aproximadamente 30 outros surtos epidêmicos, com o número total de infectados variando entre centenas a dezenas de milhares de pessoas de infectadas (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 1998). No Estado do Amazonas, casos de infecção por OROV foram detectados em três pacientes durante epidemia de dengue ocorrida entre 1998 e 1999 (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2004). A febre de Oropouche é a

segunda infecção por arbovírus com mais notificações no Brasil, ficando atrás apenas do dengue (VASCONCELOS *et al.*, 1998).

1.6. Prevenção e Controle de arboviroses

A prevenção e o controle das arboviroses dependem de abordagens que reduzam a infecção por arbovírus. O controle dos insetos vetores, a proteção pessoal e a vacinação são as principais ações para um controle eficaz.

Os programas de prevenção das arboviroses devem ser fundamentados em atividades de vigilância entomológica e vigilância da doença que, portanto, demandam uma integração entre o monitoramento da densidade das populações de vetores e os dados da vigilância sindrômica. Uma equipe médica capacitada, que reconheça os sintomas e saiba como realizar o manejo dos casos específicos de arboviroses e a participação ativa da comunidade para erradicação de criadouros, são fatores fundamentais para o sucesso do programa (GRIFFIN, 2007; SCHMALJOHN e NICHOL, 2007; GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007).

Com o monitoramento de vetores é possível fornecer um mecanismo de alerta epidêmico que se antecipe à epidemia. Aliado ao monitoramento, os diagnósticos sindrômico e laboratorial podem fornecer dados importantes acerca de epidemias que por vezes ocorrem silenciosamente originando significantes níveis de morbidade e mortalidade. É importante enfatizar que a vigilância passiva não é eficaz para sistemas de alertas epidêmicos antecipados. Com a vigilância passiva para arboviroses, a epidemia não é reconhecida até o momento do pico de transmissão. Neste estágio, a epidemia não é mais controlável e as taxas de morbidade e mortalidade não podem ser mais diminuídas (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007).

A sintomatologia das arboviroses é inespecífica. A maioria dos arbovírus provoca reações febris não diferenciáveis de outras doenças comuns (infecções das vias aéreas superiores, gastroenterites). Sem o diagnóstico laboratorial, não é possível determinar a etiologia da doença. Ademais, somente os testes laboratoriais são capazes de monitorar a presença de arbovírus em animais sentinelas (hospedeiros vertebrados naturais) e vetores (GU *et al.*, 2008).

Não existe nenhum antiviral específico para o tratamento das arboviroses. O tratamento de suporte para casos de encefalite grave é fundamental para a recuperação de indivíduos em coma. O tratamento sintomático de casos graves de artrite com o uso de anti-inflamatórios é benéfico para a recuperação dos pacientes (GRIFFIN, 2007).

Vacinas eficazes, para uso em humanos, estão disponíveis apenas contra os flavivírus YFV, JEV e TBEV. As vacinas licenciadas para JEV e TBEV são produzidas com vírus inativado, as quais requerem múltiplas doses para imunização. Doses de reforço são necessárias em intervalos regulares para prover proteção adequada. Até o momento, diversas vacinas que utilizam vírus atenuado para os quatro sorotipos de DENV estão em desenvolvimento, e duas destas já completaram a fase 2 dos testes, na qual é testada a imunogenicidade da vacina em diferentes doses (MORITA, 2008).

Existem vacinas contra os alfavírus EEEV, WEEV e VEEV. São vacinas inativadas e disponíveis somente para imunização de cavalos e aves. Vacinas experimentais contra tais vírus estão disponíveis para trabalhadores de laboratórios expostos a esses agentes. Vacinas produzidas com vírus inativado foram desenvolvidas para VEEV e CHIKV. Efeitos colaterais expressivos causados por essas vacinas, especialmente contra VEEV, são comuns e novas cepas estão sendo pesquisadas (GRIFFIN, 2007). Nota-se que nas imunizações em cavalos e humanos, a vacinação contra um alfavírus pode interferir com o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes para subseqüentes imunizações contra outros alfavírus (MCCLAIN *et al.*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos têm sido reveladas diversas infecções humanas até então desconhecidas, da mesma forma que tem ocorrido a re-emergência de outras controladas ao longo dos anos. No Brasil, as arboviroses provocadas pelos vírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* e *Flavivirus* são as principais causadoras de surtos ou epidemias.

O problema das viroses emergentes/re-emergentes é complexo, porém pode-se reconhecer que, em sua maioria, essas viroses são desencadeadas por atividades humanas que modificam o meio ambiente, em especial, pela ação antrópica nas matas preservadas e periferias urbanas da Amazônia.

As epidemias por arbovírus provocam impactos sociais e econômicos relevantes. Durante estas epidemias muitos trabalhadores e estudantes são afetados e há uma conseqüente diminuição da produtividade e aumento da evasão escolar. Apesar de intensos estudos acerca das arboviroses na Região Amazônica, informações epidemiológicas desses vírus são escassas.

É importante destacar que poucos estudos foram realizados em populações rurais da Região Amazônica. A vigilância epidemiológica em tais localidades é uma ferramenta eficaz na obtenção de informações acerca da circulação destes vírus. Ademais, os hospitais da região consideram apenas o DENV e o YFV no diagnóstico sorológico de rotina, fato que gera uma sub-notificação dos casos de arboviroses de etiologia não-dengue.

Dados da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas indicam que no ano de 2005 foram notificados 653 casos de Dengue. Dados da Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas estimam que no ano de 2005 30% dos casos de síndromes febris de etiologia não-malárica/não-bacteriana permaneceram sem diagnóstico. A Gerência de Virologia da FMTAM estima que no primeiro semestre de 2006 50% dos pacientes indicados para a sorologia de dengue não tiveram diagnóstico confirmado para tal doença. Estes fatos indicam uma possível presença de agentes virais ainda não detectáveis pela rede pública de saúde.

Apesar de grande parte destas arboviroses não culminar em um quadro severo, as epidemias por arbovírus terminam por provocar fatos sociais e econômicos adversos. Portanto, realizar um estudo que busque o conhecimento da etiologia e da frequência das principais arboviroses nas áreas rurais e urbanas da Região Amazônica se torna relevante, visto que o diagnóstico rápido e específico é necessário tanto para um tratamento adequado do paciente, como para um controle prévio de possíveis surtos epidêmicos que possam acontecer.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a circulação de arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* em uma área rural e uma área urbana do Estado do Amazonas, Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a soroprevalência de infecções por cinco arbovírus (vírus mayaro, vírus da encefalite eqüina venezuelana, vírus da febre amarela, vírus da encefalite de Saint Louis, e vírus oropouche) em uma população rural da Região Amazônica;
2. Adaptar e disponibilizar um protocolo de detecção de fragmentos genômicos de arbovírus baseado na técnica de PCR para complementar os testes sorológicos realizados nos centros de diagnóstico e pesquisa da Região Amazônica;
3. Avaliar a incidência de infecções pelos vírus mayaro, vírus da encefalite eqüina venezuelana, vírus da encefalite de Saint Louis, e vírus oropouche em pacientes com síndromes febris agudas atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

4. METODOLOGIA

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo retrospectivo que buscou, através de técnicas de detecção sorológica e molecular, investigar a circulação de arbovírus em duas populações distintas do Estado do Amazonas, Brasil.

A primeira população estudada foi composta por moradores de uma comunidade localizada na zona rural do Estado e denominada de Grupo 1. Neste grupo foi utilizada a detecção sorológica para avaliar a prevalência de anticorpos contra arbovírus.

A segunda população foi composta por pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, zona urbana de Manaus, e denominada de Grupo 2. Neste grupo foi utilizada a detecção molecular do genoma viral para avaliar a circulação de arbovírus.

CONSIDERAÇÕES SOBRE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo realizado com o Grupo 1 foi parte integrante do projeto “Ecologia e saúde na Amazônia: mapeamento integrado e participativo das dinâmicas sócio-ambientais e de incidência de doenças transmissíveis na Amazônia central”, realizado por uma equipe multidisciplinar (antropólogo, biólogos, cientistas sociais, médico e técnicos laboratoriais) pertencente ao Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ. O estudo respeitou as recomendações da Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz (Anexo I).

O estudo realizado com o Grupo 2 pertenceu ao projeto “Detecção e caracterização molecular de arbovírus em pacientes febris atendidos na rotina da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas”, realizado por equipe de biólogos, médicos e técnicos laboratoriais do ILMD/FIOCRUZ e FMTAM. As amostras pertencentes à soroteca da Gerência de Virologia da FMTAM foram gentilmente cedidas pela Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo para realização deste trabalho. O

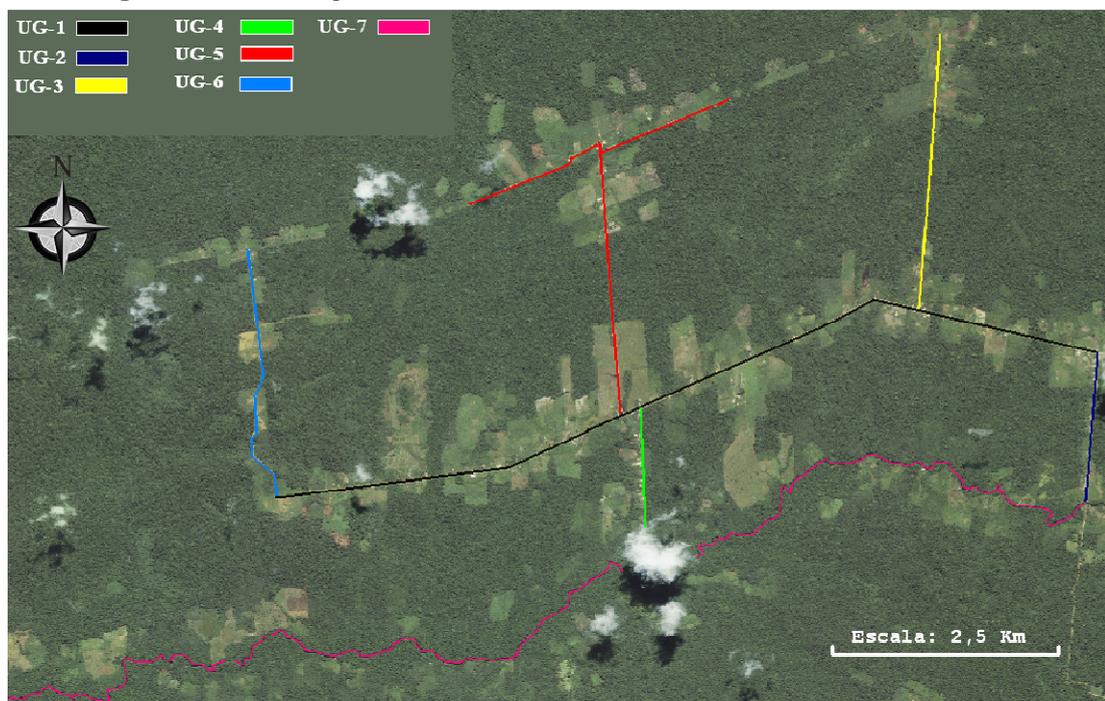
estudo respeitou as recomendações da Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (Anexo II).

4.1. Sorologia das amostras coletadas na zona rural (Grupo 1)

4.1.1. Área e população de estudo

A área selecionada para a investigação sorológica pertence ao Município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil e está localizada há aproximadamente 140 km ao norte da capital do Estado, Manaus. Denominada Assentamento Rural de Rio Pardo (Portaria INCRA nº 274/96, de 25/10/1996), a comunidade foi estabelecida entre uma área de assentamento rural a leste e uma área de preservação indígena a oeste/noroeste. A comunidade é composta por uma estrada principal de 10 km, cinco vicinais e um trecho de rio de 25 km, totalizando sete Unidades Geográficas (UG) amostrais. As coordenadas geográficas que marcam o início da comunidade a leste são: latitude sul 01°49'10.49"/ longitude oeste 60°19'02.79" (Figura 6).

Figura 6. Imagem de satélite sobre a comunidade de Rio Pardo



Fonte: Ikonos Satellite Imaging Corporation, 2008

Aproximadamente 600 pessoas moram na região, que apresenta grandes áreas para agricultura e pequena criação de gado. A reduzida mobilidade da população para o exterior da comunidade e os diferentes níveis de antropização encontrados na região foram características valorizadas durante a seleção do local de trabalho e que permitiram o controle do estudo, uma vez que a entrada de pessoas estranhas à comunidade ou a saída freqüente dos moradores poderia introduzir arbovírus estranhos à localidade, logo um viés ao estudo.

4.1.2. Seleção dos participantes

Moradores da comunidade de Rio Pardo foram convidados aleatoriamente a participar do estudo durante os meses de outubro de 2006 a janeiro de 2007. Após uma breve explanação do estudo, cada indivíduo foi convidado a participar da pesquisa através da ciência e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III).

Para a inclusão do indivíduo na pesquisa foram utilizados os seguintes critérios:

- Ser residente da comunidade de Rio Pardo;
- Estar presente no momento da entrevista sócio-epidemiológica;
- Aceitar participar da pesquisa.

4.1.3. Criação e manejo do banco de dados

Um questionário epidemiológico foi preenchido para cada participante (Anexo IV). Os dados obtidos pelo questionário, juntamente com dados sócio-demográficos coletados anteriormente foram utilizados para criar o banco de dados do estudo. Para tabulação dos dados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel® 2003.

4.1.4. Procedimentos de coleta e processamento das amostras

Para coleta de amostras de sangue foi utilizado o método de punção do dedo com estilete estéril descartável e armazenagem do sangue capilar em papel-filtro. Esta técnica é conhecida como DBS, sigla em inglês para *Dry Blood Spot* (gota de sangue seca) e recomendada pela OMS como alternativa à punção venosa (MERCADER; FEATHERSTONE; BELLINI, 2006). Por ser uma técnica menos invasiva frente à coleta

de sangue por punção venosa, existe uma maior aceitação por parte dos indivíduos. Além de mais segura e menos incômoda, a técnica oferece vantagens ao trabalho com grande número amostral, principalmente em trabalhos de campo. Problemas como, processamento, armazenagem e transporte das amostras são evitados ao utilizar DBS para coleta (PARKER & CUBITT, 1999).

A punção capilar foi realizada em todos os indivíduos com estilete estéril. O sangue foi depositado imediatamente em papel-filtro (gramatura: 80g/m²; porosidade: 14µm – J. Prolab Ind. e Com., Paraná). A amostra de sangue secou a temperatura ambiente (25°C - 30°C) e ao abrigo da luz solar. Os papéis de filtro contendo as amostras foram armazenados à 4°C até o momento do transporte. As amostras foram transportadas para o laboratório do Centro de Pesquisa em Virologia/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

No laboratório, discos de 0,6cm de diâmetro foram removidos de cada DBS com o auxílio de um perfurador de papel e acondicionados separadamente em microtubos de 1,5mL. O perfurador de metal foi higienizado cada nova perfuração.

Assumindo que cada disco absorve 15µL de sangue, adicionou-se 1,5mL de solução salina tamponada (*Phosphated Buffered Saline* – PBS – NaCl [137mM]; KCl [2,7mM]; KH₂PO₄ [1,47mM]; Na₂HPO₄ [10mM]), contendo Tween-20 [0,05%], em pH 7.4. Os microtubos contendo o disco de papel-filtro e PBS foram estocados à 4°C por 24 horas para eluição do sangue.

Após o período de eluição, os microtubos foram centrifugados por 15 segundos a 8000 rpm para deposição das fibras de celulose e resíduos de sangue. O sobrenadante foi coletado e armazenado em outro microtubo. Ao final da eluição obteve-se 1,5mL de soro com fator de diluição de 1:100. Os microtubos contendo o sobrenadante foram armazenados à 4°C até o momento do uso.

4.1.5. Análise sorológica

Para a análise sorológica das amostras foi utilizado o ensaio imuno-enzimático em cultura de células infectadas (EIA-ICC – *Enzymatic Immune Assay – Infected Cell Culture*). O método utiliza células de *Aedes albopictus* de linhagem C6/36 infectadas com vírus como matriz antigênica para captura de anticorpos (FIGUEIREDO, 1990).

Este método, utilizado em diversos inquéritos sorológicos, é utilizado em substituição aos kits diagnósticos comerciais ou na falta de kits diagnósticos específicos para determinado tipo viral (LIMA *et al.*, 2007).

4.1.6. Procedimentos de cultivo celular

As células de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo (FMRP/USP) para a realização deste ensaio. Para o cultivo celular foi utilizado meio Leibovitz L-15 (Invitrogen Corp.TM, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen Corp.TM, Brasil) inativado pelo calor, 100U/mL de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de cultivo de 25cm² (TPP®, Suíça) contendo 5mL do meio de cultura, em estufa à temperatura de 28°C até estabilizar o crescimento celular. Ao atingir o nível máximo de crescimento na área do frasco (formação de monocamada celular) as células foram transferidas para frascos de 75cm² (TPP®, Suíça), prolongando a expansão celular.

Para a transferência das células, o meio de cultura foi removido em condições assépticas e as células foram soltas com o auxílio de uma lâmina de polietileno estéril (TPP®, Suíça). Com uma pipeta estéril a solução de células soltas foi recolhida e transportada para o frasco de 75cm². Foram adicionados 15mL de meio de cultura ao frasco, que foi levado em seguida para a estufa à 28°C.

O meio de cultura foi trocado a cada 36 horas até a formação da monocamada celular. No total foram produzidos doze frascos de 75cm² contendo células.

4.1.7. Procedimentos de infecção celular

Dos doze frascos contendo células, cinco foram utilizados para a infecção com arbovírus. Cada frasco foi inoculado com um tipo viral, proveniente de infecção por inoculação direta em cérebro de camundongos recém nascidos. Os vírus utilizados para a infecção foram: vírus da febre amarela (cepa vacinal 17D), vírus da encefalite de Saint Louis, vírus mayaro, vírus da encefalite eqüina venezuelana e vírus oropouche, todos gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo. A preparação das amostras virais utilizadas ficou sob responsabilidade da equipe técnica do laboratório do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP/USP.

Para a infecção das células, todo o meio de cultura foi removido em condições assépticas. Adicionou-se 100µL da suspensão viral (macerado de cérebro de camundongo recém-nascido infectado, liofilizado, ressuspenso em PBS estéril) ao frasco. A solução viral foi homogeneizada pela superfície da monocamada por leve agitação orbital. As células foram incubadas à temperatura ambiente em agitação orbital a cada 15 minutos para manter a homogeneidade da suspensão viral pela superfície da monocamada durante a incubação. Após a incubação, 15mL do meio de manutenção do crescimento celular (meio Leibovitz L-15 (Invitrogen Corp.™, Brasil) suplementado com 2% SFB (Invitrogen Corp.™, Brasil) inativado pelo calor, 100U/mL de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina) foram adicionados ao frasco. O frasco foi levado à incubação à 28°C.

Devido ao fato dos vírus possuírem um tempo de biossíntese diferente, o tempo de incubação de cada frasco variou. A tabela 1 apresenta o tempo médio de formação de efeito citopatogênico (CPE) pelos vírus utilizados no estudo. O CPE consiste na modificação da morfologia da célula infectada, e pode ser observado por microscopia.

Tabela 1. Tempo para observação de efeito citopatogênico

Tipo viral	Tempo de incubação viral
<i>Alphavirus</i> – MAYV, VEEV	3 – 4 dias
<i>Orthobunyavirus</i> – OROV	4 – 5 dias
<i>Flavivirus</i> – YFV, SLEV	5 – 7 dias

Nos sete frascos restantes foi realizada a troca do meio de cultura. Em condições assépticas, com o auxílio de uma pipeta, retirou-se todo o volume de meio de cultura dos frascos. O meio de manutenção do crescimento celular foi adicionado, totalizando um volume de 15mL para cada frasco. Os frascos foram levados à incubação à 28°C até o momento de seu uso.

4.1.8. Ensaio imunoenzimático

Um dia antes da formação do CPE as células infectadas foram transferidas para placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços com fundo chato (TPP®,

Suíça). Uma garrafa inoculada com o vírus foi mantida até o final do ciclo viral para observação do efeito citopático e confirmação da infecção das células.

Para a retirada das células dos frascos de cultura, em condições assépticas todo o meio de cultura foi retirado e as células foram soltas com auxílio de uma lâmina de polietileno estéril (TPP®, Suíça). Um volume de 10 μ L foi retirado da suspensão de células para contagem em câmara de Neubauer. Após ajuste da concentração de células para 10⁶ células/mL, adicionando meio de cultura à suspensão celular, um volume de 100 μ L foi transferido para cada poço de coluna ímpar da placa (Figura 7).

Para atuar como controle negativo do ensaio, o mesmo procedimento foi adotado para uma garrafa de células não infectadas. Após a liberação, contagem e ajuste da concentração de células para 10⁶ células/mL, 100 μ L de células não infectadas foram transferidos para cada poço de coluna par da placa.

Figura 7. Placa de cultura de tecidos utilizada para o ensaio enzimático

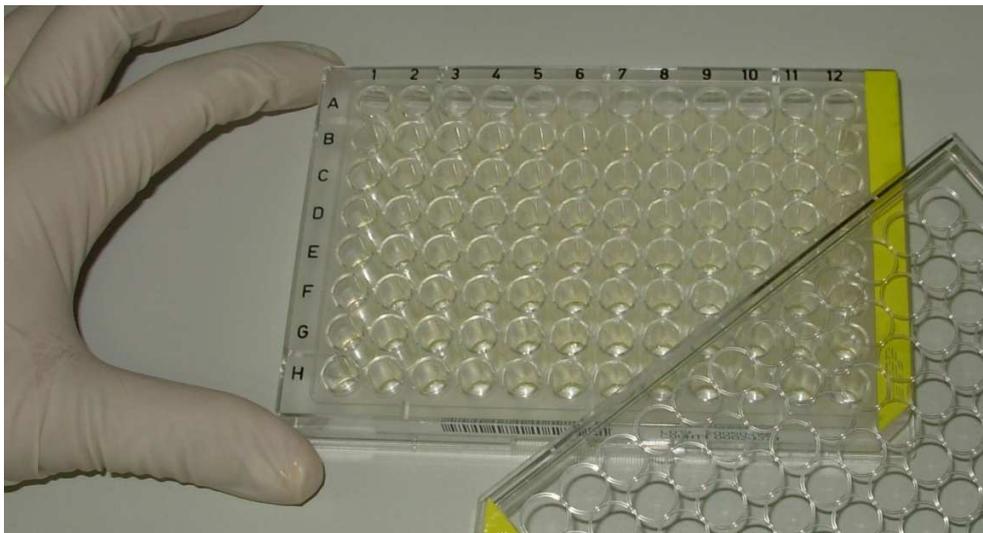


Foto: Arquivo pessoal, 2009

Após a transferência das células infectadas e não infectadas para a placa adicionou-se 200 μ L do meio de manutenção do crescimento celular a cada poço. A placa foi tampada e armazenada na estufa à 28°C por 24 horas para aderência celular e finalização do ciclo viral.

Com o ciclo viral completo, em condições assépticas o meio de manutenção foi retirado e adicionou-se 100 μ L de solução fixadora constituída de formalina 40% em pH

7.0 (formaldeído [4%]; Na_2HPO_4 [45mM]; NaH_2PO_4 [33mM]). A placa foi tampada e incubada por 18 horas à temperatura de 4°C. Ao término da incubação a solução de fixação foi removida e PBS foi adicionado para lavagem dos poços. A lavagem procedeu-se pela retirada e adição de 200µL de PBS dos poços por quatro vezes consecutivas.

Ligações inespecíficas das amostras aos antígenos presentes nos poços foram minimizadas com incubação da placa em 200µL/poço de solução de bloqueio (leite desnatado [5%] e Tween-20 [0,05%] em PBS) por 1 hora à 37°C. Após a incubação os poços foram lavados com solução de lavagem (PBS, Tween-20 [0,05%]) por quatro vezes e a placa foi armazenada à temperatura ambiente para secagem. Após a secagem a placa foi armazenada à temperatura de -70°C até o início do teste imunoenzimático.

Com a placa pronta para a captura de imunoglobulinas, as amostras de soro eluídas do DBS foram adicionadas. Um volume de 100µL de cada amostra de soro foi adicionado em colunas adjacentes, respeitando a seqüência de colunas ímpares (poço com antígeno viral presente) e colunas pares (poço com antígeno viral ausente). Portanto, cada amostra de soro foi adicionada a um par de poços “com antígeno / sem antígeno”.

Para o controle positivo do ensaio amostras do fluido ascítico imunizado murino (MIAF) foram utilizadas. Os MIAF imunizados para os cinco diferentes arbovírus utilizados neste trabalho foram preparados pelo laboratório do Centro de Pesquisa em Virologia/FMRP/USP e gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo. A adição do MIAF nos poços seguiu os mesmos procedimentos adotados para a adição das amostras de soro humano.

Todas as amostras foram diluídas pela adição de 100µL de PBS a cada poço, atingindo, portanto, fator de diluição das amostras de 1:200. A homogeneização das amostras com o PBS foi realizada com o auxílio de uma pipeta. Depois de diluídas as amostras, as placas foram tampadas e levadas à estufa para incubação à 37°C por 1 hora.

Após a incubação, os poços foram lavados quatro vezes com solução de lavagem e, em seguida, 100µL do anticorpo anti-IgG humana conjugado com

peroxidase (KPL Inc., EUA), na concentração de 1:200, foram adicionados em cada poço. Para a amostra de MIAF, 100µL do anticorpo anti-IgG murina conjugado com peroxidase [1:200] (KPL Inc., EUA) foram adicionados. A placa foi tampada e armazenada à 37°C por 1 hora. Novamente, após a incubação, os poços foram lavados com solução de lavagem por quatro vezes. Em seguida, 50µL de substrato de peroxidase ABTS (KPL Inc., EUA) foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄ [1N]. A leitura da reação foi realizada em um espectrofotômetro através de filtro de 405nm.

4.1.9. Análise dos dados

Os dados de absorvância adquiridos foram inseridos em planilha do programa Microsoft Office Excel® 2003. Os valores de cada placa testada foram organizados em planilhas separadas. A normalização dos valores obtidos para cada amostra foi realizada através da subtração do valor da amostra testada por seu respectivo controle negativo. O *cut-off* de cada placa foi alcançado a partir da soma média dos valores normalizados com três vezes o valor do desvio padrão do teste. Amostras que apresentaram valor de absorvância maior ou igual ao *cut-off* do teste foram consideradas positivas.

O banco de dados previamente criado foi atualizado com as informações obtidas do teste sorológico. Informações relevantes à pesquisa foram copiadas para uma nova planilha. Esta planilha foi convertida para análise estatística no software EPI-INFO™, versão 3.3.2., de fevereiro de 2005. As informações utilizadas para confecção do banco de dados estão disponíveis no anexo V.

A análise descritiva foi apresentada pela distribuição percentual por categoria. Algumas variáveis contínuas foram transformadas em variáveis categóricas. Os dados foram apresentados mediante distribuição de freqüências em forma de tabelas e gráficos. A análise comparativa das variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste qui-quadrado (X^2) com a correção de Yates. O Risco Relativo (RR) e o respectivo intervalo de confiança (95%) foram calculados para as associações utilizando tabelas 2x2.

4.2. Detecção molecular viral das amostras coletadas na zona urbana (Grupo 2)

4.2.1. População de estudo

Para a detecção molecular de fragmentos genômicos de arbovírus foi realizada em amostras de soro pertencentes à soroteca de arbovirologia, da Gerência de Virologia da FMTAM.

4.2.2. Seleção das amostras

Para a seleção das amostras de soro a serem testadas, foi realizado um levantamento dos dados clínicos dos pacientes na ocasião da coleta de sangue. Foram selecionadas aquelas amostras provenientes de pacientes indicados para a rotina diagnóstica de doença febril (Figura 2), que apresentavam sintomas (febre, cefaléia, mialgia ou artralgia) por menos de 15 dias, e que obtiveram resultados negativos para a busca hemoscópica de plasmódio e sorologia para dengue na rotina de atendimento da FMTAM.

Amostras coletadas no primeiro trimestre dos anos de 2007 e 2008 foram escolhidas para análise. Este período coincide com a época de maior precipitação pluviométrica da região e, portanto, ocasião de maior número de casos febris registrados na FMTAM por consequência da proliferação de insetos vetores.

4.2.3. Padronização da técnica de detecção genômica

A padronização dos ensaios de detecção de fragmentos genômicos virais foi realizada antes do exame das amostras de soro. Foram testadas amostras-controle originadas de infecção de cérebro de camundongo recém nascido liofilizadas e amostras-controle originadas de sobrenadante de cultura celular infectada com cada tipo viral. Para a padronização do teste foram utilizadas amostras-controle de três gêneros virais distintos: *Alphavirus* (vírus mayaro), *Flavivirus* (vírus dengue-2) e *Orthobunyavirus* (vírus oropouche e vírus guamá (GUAV)), gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo, do Centro de Pesquisa em Virologia/FMRP/USP.

a) Extração de RNA

Amostras de MAYV, DENV2, OROV e GUAV produzidas separadamente em células C6/36 foram submetidas à extração de RNA com o uso do Qiang Viral RNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA), de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi mantido a temperatura de -20°C até sua utilização.

b) Quantificação de RNA

Com o objetivo de verificar a pureza e quantidade estimada de RNA extraído as amostras controle foram submetidas à quantificação por espectrofotometria. Este método de quantificação avalia o RNA total presente na amostra, ou seja, RNA celular e viral e auxilia a estabelecer a o volume de amostra a ser utilizado na PCR.

Para realizar o teste 10µL de cada amostra foram diluídos em 990µL de água deionizada autoclavada para obter uma concentração final de 1:100. Após a diluição, 200µL desta solução foram acondicionados em uma cuveta e submetidos à espectrofotometria em filtro de 260nm / 280nm (Cary 50 Conc, Varian, Austrália). A densidade óptica detectada pelo filtro de 260nm determina a concentração de RNA presente na solução. A razão entre as densidades óticas detectadas em 260nm e 280nm determina a pureza do RNA presente na solução.

c) Síntese do DNA complementar

A transcrição reversa do RNA extraído foi realizada a partir da técnica de RT-PCR para síntese do DNA complementar (cDNA).

Para a transcrição reversa foi preparado um volume de 10µL para cada amostra viral contendo: 0,5µL de RNasin® Plus RNase Inhibitor [40U/µL] (Promega Corp.), 1,0µL de dNTP [10mM], 1,0µL de enzima SuperScript® III Transcriptase Reversa [200U/µL] (Invitrogen Corp.™, Brasil), 4,0µL de tampão da enzima (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) [5X], 1,5µL de DTT [0,1 M] 1,0µL de oligonucleotídeos randômicos [10pmol]. A mistura foi acrescida de 10µL do RNA extraído de cada amostra viral e incubada à temperatura de 55°C por 1 hora, seguida de outra incubação

à temperatura de 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Os cDNAs obtidos foram estocados à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

d) Identificação dos gêneros virais

O protocolo utilizado para detecção dos genomas de *Alphavirus* e *Flavivirus* foi adaptado de Bronzoni (BRONZONI *et al.*, 2005), alterando-se a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos para verificação do melhor resultado. O protocolo utilizado para detecção do genoma de *Orthobunyavirus* foi adaptado de Moreli (MORELI *et al.*, 2002).

Para a identificação de fragmentos genéticos virais o cDNA foi amplificado pela técnica de PCR. Foram preparadas soluções de 20µL, uma para cada gênero viral (*Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*) contendo: 2,0µL de dNTP [1,25mM], 2,5µL de tampão da enzima (200mM de Tris-HCl pH 8.4, 500mM de KCl) [10X], 1,5µL de MgCl₂ [50mM] 1,0µL do oligonucleotídeo gênero-específico senso [10pmol], 1,0µL do oligonucleotídeo gênero-específico anti-senso [10pmol], 0,5µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) e 11,5µL de água deionizada autoclavada. Foi adicionado à mistura 5µL da amostra de cDNA previamente obtida. A descrição da seqüência de nucleotídeos de cada oligonucleotídeo utilizado está descrita na tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos gênero-específicos

Gênero	Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)
<i>Alphavirus</i>	M2W (+)	YAG AGC DTT TCG CAY STR GCH W	434
	cM3W (-)	ACA TRA ANK GNG TNG TRT CRA ANC CDA YCC	
<i>Flavivirus</i>	FG1 (+)	TCA AGG AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC T	958
	FG2 (-)	GTG TCC CAT CCT GCT GTG TCA TCA GCA TAC A	
<i>Orthobunyavirus</i>	BUN-S (+)	AGT AGT GTG CTC CAC	700-1100
	BUN-C (-)	AGT AGT ATA CTC CAC	

(+) oligonucleotídeo senso; (-) oligonucleotídeo anti-senso. BRONZONI *et al.*, 2005 e MORELI *et al.*, 2002.

A amplificação do DNA de *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 94°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação (94°C por 60 segundos para desnaturação, 52°C a 56°C por 60 segundos para

hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 2 minutos para síntese do DNA). Seguido de uma elongação final de 72°C por 7 minutos.

A identificação foi realizada através da comparação dos produtos obtidos nas PCRs com amostras controle e padrões de tamanho de banda a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídio [15µg/mL].

e) Identificação das espécies virais

Os produtos da amplificação obtidos na primeira PCR foram novamente amplificados, com o objetivo de identificar as espécies virais. Nesta etapa, oligonucleotídeos espécie-específicos foram utilizados em ensaios de semi nested-PCR para detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus* e nested-PCR para detecção de fragmentos de *Orthobunyavirus*. A descrição da seqüência de nucleotídeos de cada oligonucleotídeo espécie-específico utilizado encontra-se na tabela 3.

Para a semi nested-PCR, foram preparadas soluções de 20µL, uma para *Alphavirus* e outra para *Flavivirus*, contendo: 2,0µL de dNTP [1,25mM], 2,5µL de tampão da enzima (200mM de Tris-HCl pH 8.4, 500mM de KCl) [10X], 1,5µL de MgCl₂ [50mM], 1,0µL do oligonucleotídeo gênero-específico (FG1 ou cM3W) [10pmol], 1,0µL de cada oligonucleotídeo espécie-específico [10pmol], 0,5µL de Taq DNA Polimerase [5U/µL] e 11,5µL água deionizada autoclavada. Foi adicionado à mistura 5µL do produto de amplificação obtido na primeira PCR.

Tabela 3. Oligonucleotídeos espécie-específicos

Gênero	Espécie	Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)
<i>Alphavirus</i>	MAYV	nMAY (+)	GGA AGT TGG CCA AGG C	270
<i>Flavivirus</i>	DENV1	nDEN1 (-)	CGT TTTGCT CTT GTG TGC GC	472
<i>Orthobunyavirus</i>	OROV	BS-S (+)	GTG GGG TCC AAT TTG C	300
		BS-C (-)	TGA ACC CTA TGC ATC T	

(+) oligonucleotídeo senso; (-) oligonucleotídeo anti-senso. BRONZONI et al., 2005 e MORELI et al., 2002.

A amplificação do DNA foi realizada no termociclador (Mastercycler, Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 94°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação (94°C por 60 segundos para desnaturação, 53°C por 60 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 2 minutos para síntese do DNA). Seguido de uma elongação final de 72°C por 7 minutos.

A identificação viral foi realizada através da comparação dos produtos obtidos nas PCRs com amostras controle e padrões de tamanho de banda a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídio [15µg/mL].

Para identificação do *Orthobunyavirus* detectado na PCR foi realizada uma nested-PCR com os mesmos volumes e concentrações apresentados acima, sendo que os oligonucleotídeos utilizados foram aqueles descritos para *Orthobunyavirus* (tabela 3). Quanto às condições de amplificação foi modificada apenas a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos de 53°C para 55° C.

f) Teste das amostras selecionadas

Uma vez que as melhores condições do PCR foram estabelecidas 250 amostras selecionadas foram testadas para detecção do genoma viral

5. RESULTADOS

5.1. Sorologia das amostras coletadas na zona rural (Grupo 1)

5.1.1. Distribuição da população

Trezentas e trinta e cinco (335) pessoas foram incluídas neste estudo. Destas, cento e setenta e três pessoas (173 / 51,6%) do gênero feminino, e cento e sessenta e dois (162 / 48,4%) do gênero masculino. Cento e sessenta e nove (169) pessoas possuíam idade entre 18 e 64 anos, representando 50% da população estudada. O maior grupo encontrado na população corresponde a mulheres com idade entre 18 e 64 anos (26,9%). A tabela 4 demonstra a distribuição da população de acordo com o gênero e faixa etária.

Tabela 4. Distribuição da população segundo gênero e faixa etária

Faixa Etária	Feminino n(%)	Masculino n(%)	Total n(%)
0-10 anos	48 (14,3)	50 (14,9)	98 (29,3)
11-17 anos	28 (8,4)	23 (6,9)	51 (15,2)
18-64 anos	90 (26,9)	79 (23,6)	169 (50,4)
≥ 65 anos	7 (2,1)	10 (3,0)	17 (5,1)
Total	173 (51,6)	162 (48,4)	335 (100)

5.1.2. Distribuição da população de soro-reativos

Anticorpos contra MAYV foram detectados em 139 amostras (41,5%), 3 amostras (0,9%) foram reativas para anticorpos contra VEEV. Dentre as amostras reativas para VEEV duas amostras (0,6%) também foram reativas para MAYV. No total, 140 amostras apresentaram reatividade sorológica para pelo menos um vírus.

Os fatores de risco foram analisados em relação à prevalência do MAYV, pois para o VEEV, apenas três amostras foram positivas.

Informações individuais obtidas pelo preenchimento do questionário epidemiológico (Anexo IV) foram analisadas como fatores de risco à soro-positividade.

a) Gênero, faixa etária e soro-reatividade

A distribuição de soropositivos foi analisada estatisticamente de acordo com o gênero e a faixa etária da população.

A distribuição de soropositivos para MAYV entre homens e mulheres foi semelhante. Do total de indivíduos estudados, 20,6% representam homens soropositivos para MAYV e 20,9% representam mulheres soropositivas para MAYV. Não houve relação estatisticamente significativa entre a soro-positividade e os gêneros masculino e feminino (RR=0,9642; IC 95%=0,8047 – 1,1553; p valor=0,7760). A tabela 5 demonstra a distribuição da soro-reatividade da população de acordo com os gêneros.

Tabela 5. Distribuição da soro-reatividade entre os gêneros

Gênero	Soronegativos n (%)	Soropositivos para mayaro n (%)	Total n (%)
Masculino	93 (27,8%)	69 (20,6%)	162 (48,4%)
Feminino	103 (30,7%)	70 (20,9%)	173 (51,6%)
Total	196 (58,5%)	139 (41,5%)	335 (100%)

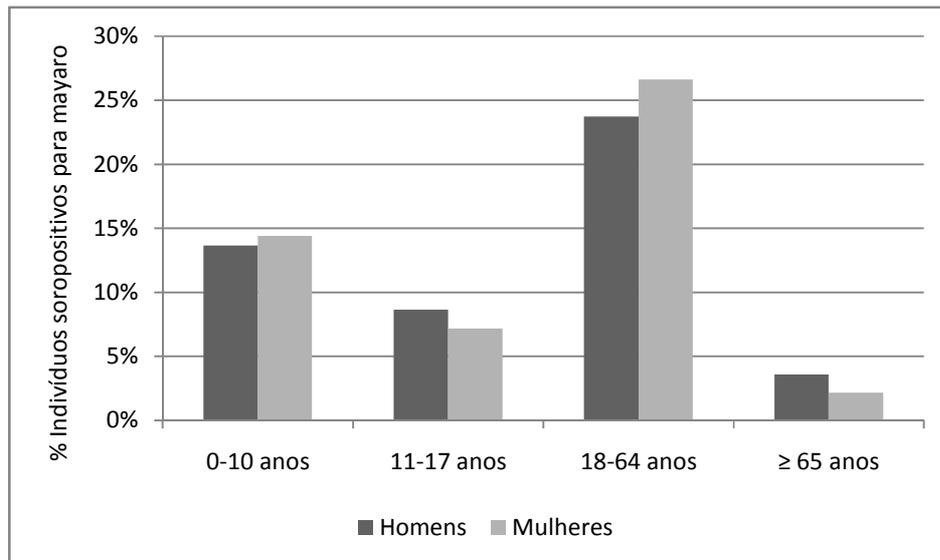
Setenta (70) indivíduos, com idade entre 18 e 64 anos, apresentaram soro-positividade para MAYV, valor este que representa 20,9% da população estudada. A análise estatística da soro-reatividade segundo a faixa etária dos indivíduos não demonstrou relação de risco estatisticamente significativa. ($X^2=0,3904$; DF=3; p valor=0,9422). A tabela 6 demonstra a distribuição da soro-reatividade entre as faixas etárias.

Tabela 6. Distribuição da soro-reatividade entre as faixas etárias

Faixa Etária	Soronegativos n (%)	Soropositivos n (%)	Total n(%)
0-10 anos	59 (17,6)	39 (11,6)	98 (29,3)
11-17 anos	29 (8,7)	22 (6,6)	51 (15,2)
18-64 anos	99 (29,6)	70 (20,9)	169 (50,4)
≥ 65 anos	9 (2,7)	8 (2,4)	17 (5,1)
Total	196 (58,5)	139 (41,5)	335 (100)

O gráfico 1 ilustra a distribuição de homens e mulheres soropositivos para MAYV de acordo com a faixa etária.

Gráfico 1 Distribuição de indivíduos soropositivos para mayaro de acordo com o gênero e faixa etária



b) Síndrome febril indiferenciada e a soro-reatividade

Indivíduos que reportaram ocorrência de síndrome febril indiferenciada (SFI) progressiva, e que obtiveram diagnóstico hemoscópico negativo para malária naquela afecção, foram analisados pela distribuição total de soropositivos. Não houve relação estatística significativa entre a ocorrência de SFI com diagnóstico hemoscópico negativo e a soro-positividade (RR=0,8432; IC 95%=0,0610 – 1,1093; *p* valor=0,2524). A tabela 7 demonstra a prevalência de anticorpos contra MAYV nos indivíduos que relataram ter apresentado uma síndrome febril indiferenciada e que permaneceram sem qualquer diagnóstico.

Tabela 7 Distribuição de soropositivos para mayaro segundo relato de síndrome febril indiferenciada nos últimos 12 meses

Síndrome febril indiferenciada	Soronegativos n(%)	Soropositivos n(%)	Total n(%)
Não	31 (11,9)	31 (11,9)	62 (23,8)
Sim	118 (45,2)	81 (31,0)	199 (76,2)
Total	149 (57,1)	112 (42,9)	261 (100)

c) Soroprevalência de MAYV de acordo com o local de residência

Foi possível observar diferentes padrões de antropização entre as unidades geográficas estudadas. As unidades geográficas (UG) foram, portanto, classificadas em quatro categorias: área de vila, área de sítio, área de floresta e área de rio.

As UG-2 e UG-4 foram caracterizadas como vilas e constituem as estradas mais urbanizadas da comunidade (figuras 8 e 9). As casas construídas nessas estradas são distantes cerca de 20-150 metros umas das outras. Tais estradas fazem contato com o rio, e margeiam grandes áreas de floresta contínua. As casas, em geral, estão a menos de 500 metros da floresta. A densidade populacional estimada para a UG-2 durante o estudo foi de 2,9 habitantes por residência (59 habitantes/20 residências), já a UG-4 apresentou densidade populacional de 4,4 habitantes por residência (92 habitantes/21 residências).

Figura 8. Unidade geográfica (UG) amostral 2



Figura 9. Unidade geográfica (UG) amostral 4



As UG-1, UG-3 e UG-5 foram consideradas áreas de sítios (figuras 10, 11 e 12). As casas possuem grandes terrenos, por vezes utilizados para agricultura e pecuária. Nestas estradas a distância entre as casas varia entre 70-500 metros. Devido à grande atividade agropecuária, os lotes destas regiões não possuem mais uma cobertura vegetal contínua. A margem da floresta, em geral, está entre 500-1500 metros de distância das casas. Estima-se que a densidade populacional para a UG-1 durante o estudo era de 4,1 habitantes por residência (156 habitantes/38 residências). A UG-3 foi a localidade com menor densidade populacional da comunidade, apresentando em média 1,5 habitantes por residência (12 habitantes/8 residências). Já a UG-5 foi a estrada com maior densidade populacional estimada, com 5,4 habitantes por residência (87 habitantes/16 residências).

Figura 10. Unidade geográfica (UG) amostral 1



Figura 11. Unidade geográfica (UG) amostral 3



Figura 12. Unidade geográfica (UG) amostral 5



A UG-6 é a estrada com cobertura vegetal mais preservada, sendo considerada área de floresta (figura 13). Embora as casas estejam localizadas entre 500-1500 metros de distância da floresta, os lotes ainda conservam grande parte da vegetação nativa. A densidade populacional da UG-6 estimada durante o estudo foi a segunda menor dentre as sete unidades amostrais, sendo maior apenas que a UG-3. A estrada apresenta em média 1,8 habitantes por residência (13 habitantes/7 residências).

Figura 13. Unidade Geográfica (UG) amostral 6



A UG-7 é o loteamento com acesso exclusivamente fluvial (figura 14). As residências estão distribuídas ao longo do rio, distantes cerca de 1000-1500 metros umas das outras. A região apresenta cobertura vegetal nativa preservada com algumas áreas desmatadas para agricultura. Em geral, as residências estão inseridas dentro da área preservada, com pouco ou nenhum desmatamento em um raio de 20 metros. A densidade populacional estimada para a UG-7 durante o estudo foi de 3,8 habitantes por residência (111 habitantes/29 residências).

Figura 14. Unidade Geográfica (UG) amostral 7



A tabela 8 demonstra as características populacionais das unidades geográficas amostrais estudadas descritas anteriormente.

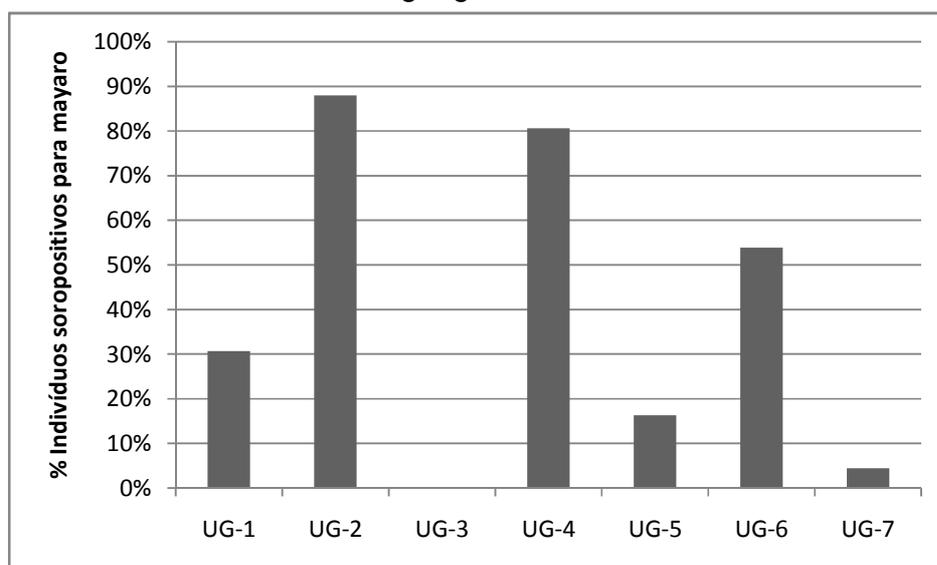
Tabela 8 Características populacionais das unidades geográficas amostrais

Características populacionais	Unidades geográficas amostrais						
	UG-2	UG-4	UG-1	UG-3	UG-5	UG-6	UG-7
Categoria de urbanização	Vila	Vila	Sítio	Sítio	Sítio	Floresta	Floresta
Habitantes / residência	59/20	92/21	156/38	12/8	87/16	13/7	111/29
Densidade populacional	2,9	4,4	4,1	1,5	5,4	1,8	3,8

A análise das unidades geográficas (UG) pelo teste do qui-quadrado frente à soro-reatividade se mostrou como fator de risco significativa para soro-positividade ($X^2=115.8304$; $DF=6$; $p<0.0001$). As UGs que apresentaram os maiores índices de soropositivos foram: UG-2 com 88,0% e UG-4 com 80,7%, seguidas pela UG-6 com 53,8%. A UG-1 apresentou 30,7% de indivíduos soropositivos e a UG-5 apresentou 16,3%. As menores taxas foram encontradas na área do rio (UG-7), com 4,5% e UG-3, onde nenhum indivíduo soropositivo foi detectado.

O gráfico 2 ilustra a distribuição de indivíduos examinados de acordo com as unidades geográficas e reatividade sorológica.

Gráfico 2 Distribuição de indivíduos soropositivos para mayaro de acordo com as unidades geográficas amostrais



d) Uso freqüente de mosquiteiro e a soro-reatividade

A relação entre o uso freqüente de mosquiteiro ao dormir e a soro-reatividade foi analisada estatisticamente pelo teste qui-quadrado. A análise estatística demonstrou que o uso freqüente de mosquiteiro ao dormir foi fator de proteção contra a soro-positividade (RR=0,5587; IC 95%=0,3435 – 0,9086; *p* valor=0,0119). A tabela 7 demonstra a distribuição de indivíduos que utilizam mosquiteiro e o resultado sorológico dos mesmos. Observa-se que apenas 13 indivíduos que relataram utilizar freqüentemente mosquiteiro ao dormir apresentaram soro-positividade para o MAYV, valor este que representa 4,9% dos duzentos e sessenta e oito (268) indivíduos que responderam à entrevista.

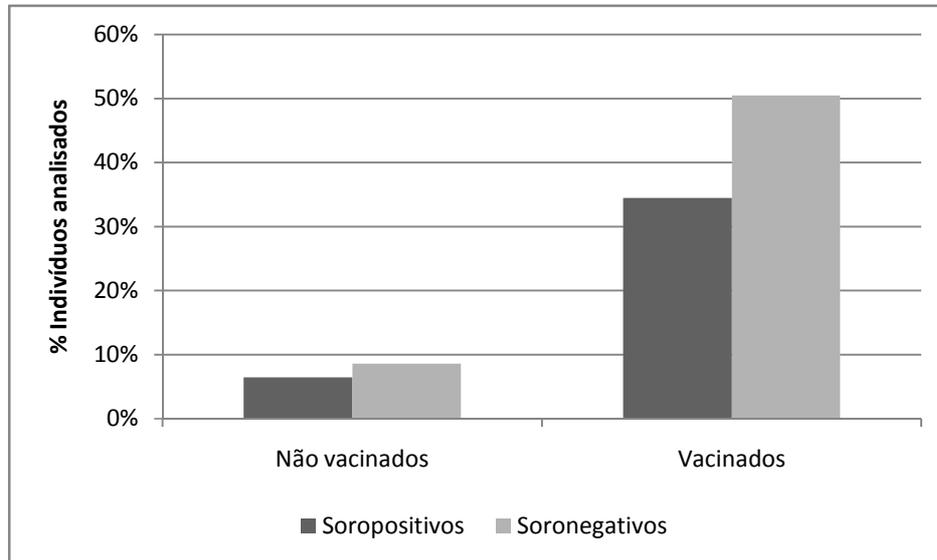
Tabela 9 Relação entre o uso de mosquiteiro e a soro-reatividade

Uso freqüente de mosquiteiro	Soronegativos	Soropositivos	Total
Não	115 (42,9)	104 (38,8)	219 (81,7)
Sim	36 (13,4)	13 (4,9)	49 (18,3)
Total	151 (56,3)	117 (43,7)	268 (100)

e) Interferência da vacina contra febre amarela na sorologia

Duzentos e setenta e seis (276) indivíduos relataram ser vacinados contra a febre amarela nos últimos dez anos. A imunização contra a febre amarela foi avaliada estatisticamente com relação à soro-reatividade com o objetivo de avaliar se a imunização prévia contra arbovírus, no caso vacina contra febre amarela, influenciaria no resultado sorológico para MAYV. O teste qui-quadrado não revelou qualquer relação estatisticamente significativa entre a imunização e a soro-positividade (RR=0,9617; IC 95%=0,7405 – 1,2489 *p* valor=0,8877). O gráfico 3 ilustra a distribuição total de indivíduos soropositivos e soronegativos frente a vacinação contra a febre amarela.

Gráfico 3 Relação entre imunização prévia contra febre amarela e a soro-reatividade para mayaro



5.1.3. Análise de fatores de risco coletivos

A partir do banco de dados sócio-demográficos obtido anteriormente foi criado um banco de dados para análise dos dados sócio-demográficos e epidemiológicos em conjunto. Nesse banco de dados foram incluídos somente aqueles indivíduos que possuíam os dados sócio-demográficos completos. Portanto, 270 indivíduos foram incluídos. Informações coletivas (referentes ao domicílio) foram utilizadas para a análise de risco à soro-positividade.

a) Presença de toaletes e a soro-reatividade

Foi analisada a relação entre o uso de um ambiente reservado para realizar as necessidades fisiológicas e o risco de soro-reatividade, uma vez que ambientes úmidos e escuros servem de abrigo e local de reprodução para insetos vetores. Foi considerado ambiente reservado um espaço com paredes e cobertura para restringir o acesso à fossa, sendo este espaço no interior ou até 20 metros do domicílio. As figuras 15 e 16 ilustram os toaletes comuns encontrados nos domicílios estudados.

Figura 15. Toaleta no interior da residência



Arquivo pessoal, 2007

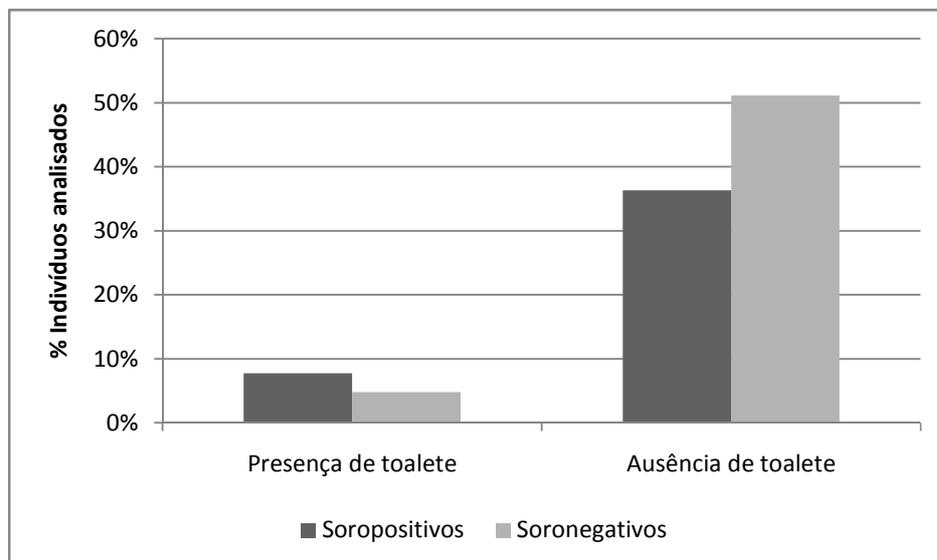
Figura 16. Toaleta no exterior da residência



Arquivo pessoal, 2006

A análise pelo teste de qui-quadrado demonstrou que a presença de banheiro fechado dentro ou próximo ao domicílio (casinha) foi considerado fator de risco estatisticamente significativo à soro-positividade (RR=1,4874; IC 95%=1,0967 – 2,0173; p valor=0,0415). No gráfico 4 é possível observar que cerca de 140 pessoas que não possuem toailete em suas residências não apresentaram soro-reatividade para MAYV, representando mais de 50% de toda a população estudada. Trinta e quatro (34) indivíduos que possuem toailete em casa foram soropositivos para MAYV, representando cerca de 8% da população total estudada.

Gráfico 4 Relação entre presença/ausência de toaletes e a soro-reatividade



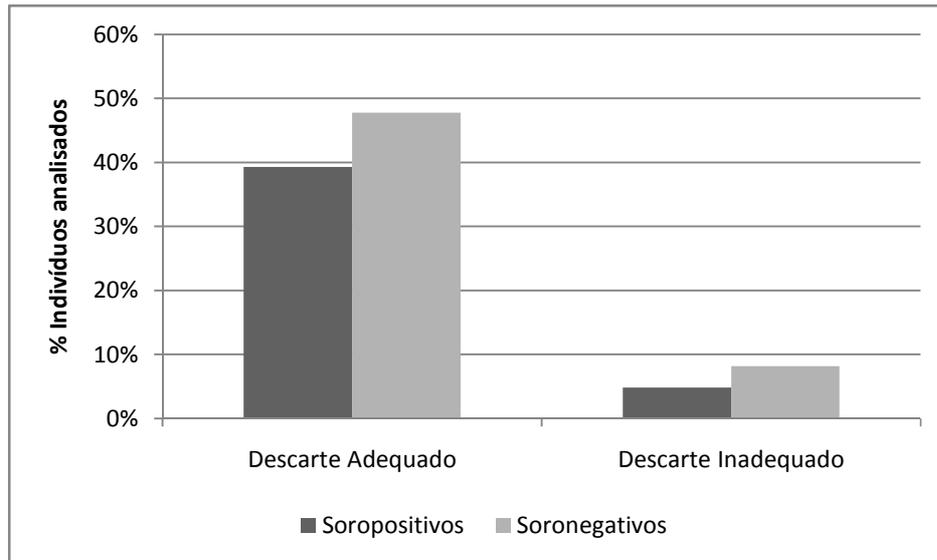
b) Descarte dos dejetos produzidos pelo domicílio e a soro-reatividade

A relação entre o descarte dos dejetos produzidos pelo domicílio e soro-reatividade foi analisada estatisticamente através do teste qui-quadrado. Assumiram-se como destinos satisfatórios para o lixo as respostas: queimado ou enterrado. As outras respostas presentes no questionário sócio-demográfico (despejado no quintal, despejado no rio ou córrego) foram consideradas insatisfatórias para o destino do lixo.

O resultado da análise estatística que relaciona o destino dos dejetos com a soro-conversão não revelou qualquer relação entre o despejo correto/incorreto com a

soro-positividade (RR=1,2144; IC 95%=0,7716 – 1,9112; p valor=0,4821). O gráfico 5 ilustra a relação entre o descarte do lixo e a soro-reatividade. É possível observar que cerca de 90% das pessoas descartam o lixo de maneira adequada.

Gráfico 5 Relação entre a soro-reatividade e o descarte de lixo



c) Presença de reservatório de água próximo à residência e a soro-reatividade

A presença de reservatório de água (poço ou cacimba) a uma distância de até 20 metros do domicílio foi avaliada quanto ao risco de soro-positividade. A figura 17 ilustra um reservatório de água comumente encontrado na comunidade.

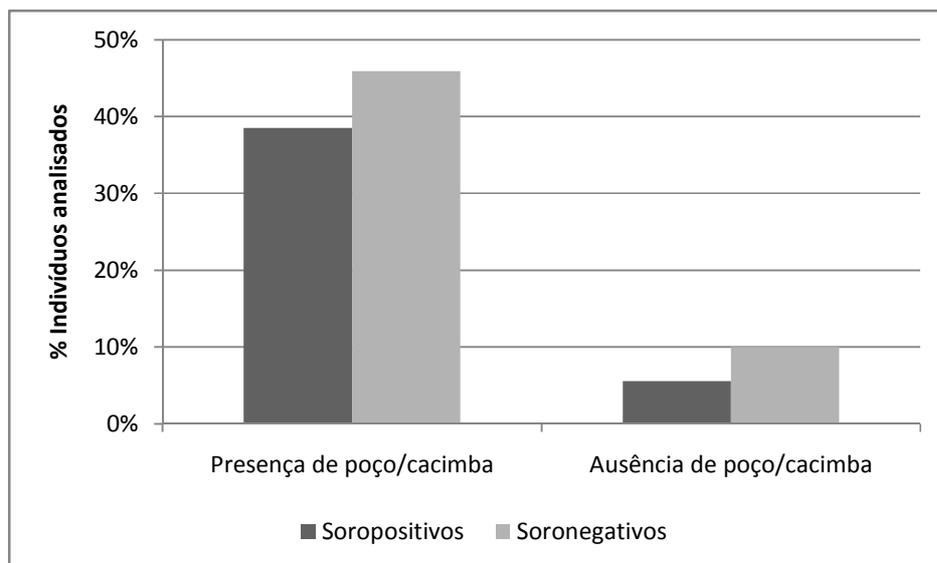
Através do teste qui-quadrado não foi possível determinar nenhuma relação entre a presença/ausência de um reservatório de água próximo ao domicílio e a soro-positividade (RR=1,2772; IC 95%=0,8310 – 1,9630; p valor=0,3084). O gráfico 6 ilustra a relação entre a presença/ausência de reservatório de água próximo ao domicílio e a soro-reatividade. A soro-positividade foi menor em ambos os grupos analisados.

Figura 17. Cacimba: Reservatório de água



Arquivo pessoal, 2007

Gráfico 6 Relação entre a presença/ausência de reservatório de água próximo ao domicílio e a soro-reatividade



d) Presença de animais nas proximidades da residência e a soro-reatividade

Foi avaliada a relação entre a presença de animais domésticos (gato; cachorro), de criação (galinha; pato, gado; cavalo; porco; cabras) ou selvagens (ave silvestre; macaco; porco) pertencentes ao morador da casa e a soro-positividade. Não foi possível realizar o teste estatístico para a presença de cavalo, cabra e macaco porque a amostra nesses casos foi insuficiente. Os registros da presença de pato, galinha e aves silvestres no domicílio foram agrupados na categoria “presença de ave”. Os registros da presença de porco e porco silvestre no domicílio foram agrupados na categoria “presença de porco”. Cada categoria foi analisada como um único fator de risco à soro-conversão. O resultado do teste qui-quadrado expôs uma relação estatisticamente significativa entre a presença de animais no domicílio e a soro-positividade (RR=0,7076; IC 95%=0,5336 – 0,9385; *p* valor=0,0407). Dos cinco grupos de animais avaliados, três se mostraram como fator de proteção contra a soro-positividade. Na tabela 10 encontram-se os valores de significância estatística para cada grupo de animal avaliado. A presença de porco no domicílio foi o fator de proteção com maior significância estatística ($p < 0,001$), seguida da presença de cachorro ($p = 0,0038$) e presença de ave ($p = 0,0428$).

Tabela 10. Relação entre a criação de animais e a soro-positividade

Presença de animal	RR	IC 95%	<i>p</i> valor
Qualquer animal	0,70	0,53 - 0,93	0,0407
Cachorro	0,56	0,41 - 0,76	0,0038
Gato	0,88	0,44 – 1,49	0,6221
Ave (silvestre ou doméstica)	0,69	0,50 - 0,94	0,0428
Gado	0,83	0,55 - 1,25	0,4499
Porco (selvagem ou de criação)	0,37	0,23 - 0,62	< 0,001

RR – Risco Relativo; IC 95% – Intervalo de Confiança; *p* valor – Significância Estatística.

5.2. Detecção molecular viral das amostras coletadas na zona urbana (Grupo 2)

5.2.1. Padronização da Extração de RNA

A extração de RNA de todas as amostras-controle foi realizada seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante do kit de extração. Após a extração foi realizada a quantificação do RNA nestas amostras. Os RNAs extraídos estavam em quantidades suficientes para a transcrição reversa. Em média, havia 6,25ng/μL de RNA nas amostras-controle.

5.2.2. Padronização da PCR

Antes de iniciar os testes com as amostras sangüíneas os protocolos descritos por Bronzoni (BRONZONI *et al.*, 2005) e Moreli (MORELI *et al.*, 2002) foram testados e adaptados visando atingir as melhores condições de amplificação.

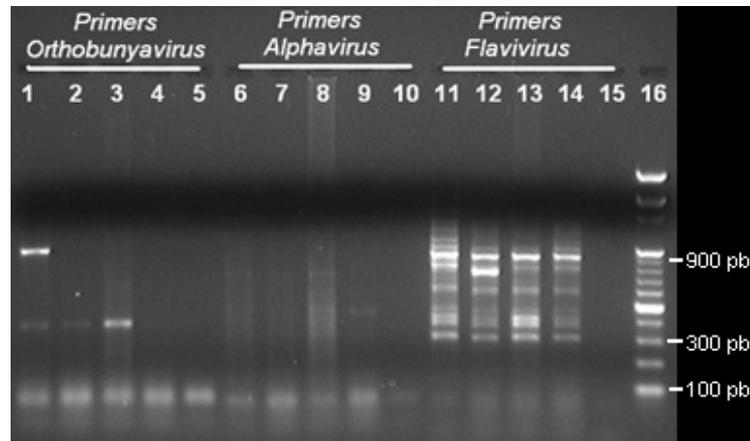
Experimento 1 – teste dos oligonucleotídeos (reação cruzada)

Inicialmente, três reações de amplificação foram realizadas em paralelo, cada uma utilizando um par de oligonucleotídeos específicos para cada gênero viral. Neste momento, os protocolos descritos por Bronzoni e Moreli não foram alterados.

Para avaliar possíveis anelamentos inespecíficos dos pares de oligonucleotídeos quatro tipos virais foram utilizados em cada reação de amplificação: DENV (*Flavivirus*), MAYV (*Alphavirus*), OROV e GUAV (*Orthobunyavirus*). A figura 18 demonstra o padrão de separação por eletroforese dos amplicons em gel de agarose [1,5%] corados com brometo de etídio [15μg/mL].

Na figura 18 pode-se observar que o resultado da amplificação não foi satisfatório. Houve amplificação de bandas inespecíficas para flavivírus e nenhuma amplificação de alfavírus ocorreu. Ademais, houve amplificação de bandas inespecíficas nas reações específicas para cada tipo viral.

Figura 18. Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 1



Colunas 1, 6 e 11: amplicons de DENV. **Colunas 2, 7 e 12:** amplicons de OROV. **Colunas 3, 8 e 13:** amplicons de GUAV. **Colunas 4, 9 e 14:** amplicons de MAYV. **Colunas 5, 10 e 15:** controles negativos (cultura celular não infectada). **Coluna 16:** marcador molecular (DNA ladder 100pb).

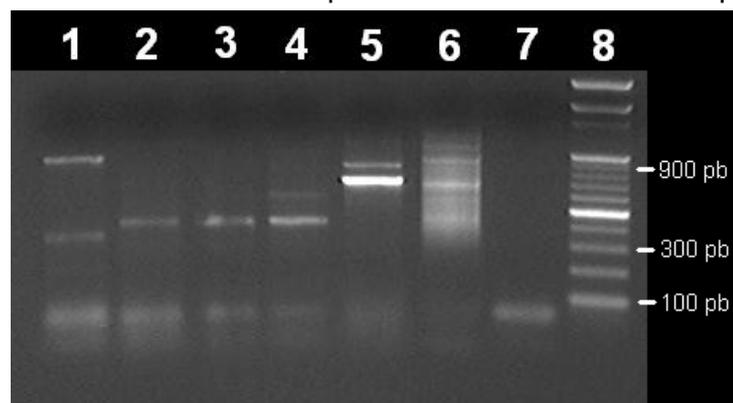
Experimento 2 – Teste com amostras liofilizadas e derivadas de cultura celular

Um novo teste foi conduzido. Amostras de DENV2, MAYV e OROV originárias de cérebro de camundongo recém nascido, liofilizadas, foram submetidas à extração de RNA, transcrição reversa e amplificação (nested-PCR). Amostras de cDNA, provenientes de cultura celular infectada, utilizados no primeiro teste realizado, foram submetidas a nova amplificação (nested-PCR). A temperatura de anelamento de oligonucleotídeos foi a mesma para todas as amostras: 54°C. A figura 19 demonstra o padrão de separação por eletroforese dos amplicons em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídio [15µg/mL].

Tanto amostras de MAYV provenientes de infecção em cérebro de camundongo recém nascido (coluna 2), quanto àquelas provenientes de sobrenadante de cultura celular infectada (colunas 3 e 4) foram amplificadas com sucesso. A amostra extraída anteriormente (coluna 4) ainda apresentou uma banda de amplificação inespecífica de aproximadamente 600pb.

A amostra liofilizada de OROV extraída para este teste (coluna 5) foi amplificada com sucesso, apesar de apresentar ainda uma banda inespecífica de aproximadamente 1kb. A amostra de sobrenadante de cultura celular de OROV extraída anteriormente (coluna 6) não foi amplificada corretamente.

Figura 19. Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 2



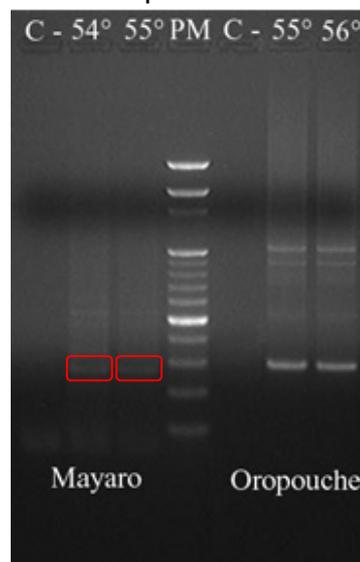
Coluna 1: DENV2 (amostra liofilizada). **Coluna 2:** MAYV (amostra liofilizada). **Coluna 3:** MAYV (sobrenadante de cultura celular). **Coluna 4:** MAYV (sobrenadante de cultura celular extraído anteriormente). **Coluna 5:** OROV (amostra liofilizada). **Coluna 6:** OROV (sobrenadante de cultura celular infectada). **Coluna 7:** controle negativo (cultura celular não infectada). **Coluna 8:** marcador molecular (*DNA ladder* 100pb).

Experimento 3 – teste dos oligonucleotídeos (temperatura de anelamento)

Um terceiro teste realizado utilizou duas temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos para estabelecer a melhor temperatura de amplificação para *Alphavirus* (54 °C e 55 °C) e *Orthobunyavirus* (55°C e 56°C). Foram utilizadas as amostras de MAYV e OROV (liofilizadas) que apresentaram boa amplificação no teste anterior. Tais amostras controle sofreram nova extração de RNA, transcrição reversa e amplificação. Para este experimento as amostras foram amplificadas com oligonucleotídeos gênero-específicos (PCR) e novamente amplificadas com oligonucleotídeos espécie-específicos (nested-PCR).

A figura 20 demonstra o padrão de separação por eletroforese dos amplicons derivados da nested-PCR em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídio [15µg/mL]. As amostras de MAYV e OROV foram amplificadas com sucesso. Bandas de amplificação inespecíficas ainda apareceram nas amostras de OROV.

Figura 20. Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 3

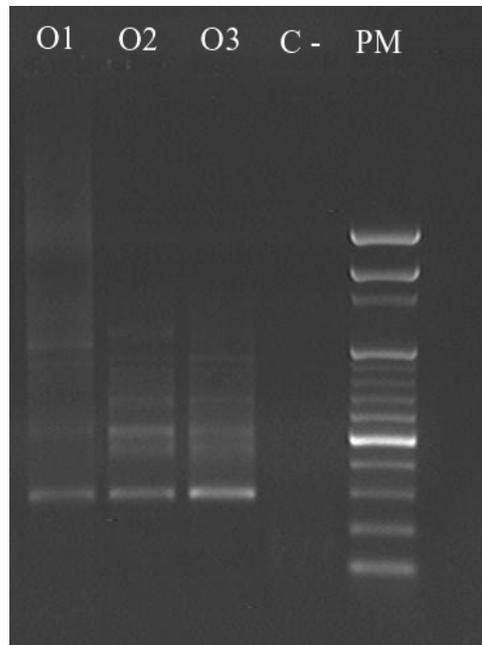


Coluna 1: Controle Negativo (água) . **Coluna 2:** MAYV (anelamento a 54°C). **Coluna 3:** MAYV (anelamento a 55°C). **Coluna 4:** marcador molecular (*DNA ladder* 100pb). **Coluna 5:** Controle Negativo (água). **Coluna 6:** OROV (anelamento a 55°C). **Coluna 7:** OROV (anelamento a 56°C).

Experimento 4 – Novo teste com as amostras de OROV

Um novo teste foi conduzido com o objetivo de re-amplificar as amostras de OROV que não foram amplificadas com sucesso no experimento 2. Para este ensaio foi utilizada a temperatura de anelamento de oligonucleotídeos de 55°C, temperatura esta estabelecida no experimento 3. A figura 20 demonstra o padrão de separação por eletroforese dos amplicons em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídio [15µg/mL]. As amostras foram amplificadas com sucesso.

Figura 21 Eletroforese dos amplicons da nested-PCR – Experimento 4



Coluna 1: OROV (amostra liofilizada). **Coluna 2:** OROV (sobrenadante de cultura celular). **Coluna 3:** OROV sobrenadante de cultura celular). **Coluna 4:** Controle Negativo (cultura celular não infectada). **Coluna 5:** marcador molecular (DNA ladder 100pb).

5.2.3. Detecção de fragmentos genômicos virais em amostras clínicas

Uma vez estabelecidas as condições para identificação das amostras-controle por PCR foram testadas as amostras de soro coletadas pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas no primeiro trimestre dos anos de 2007 e 2008.

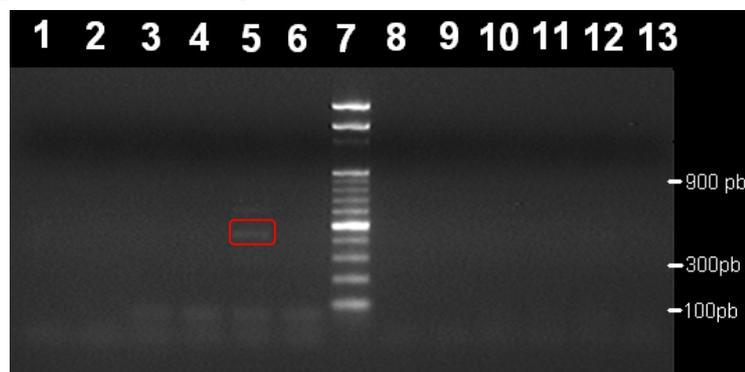
As amostras foram submetidas a três reações de amplificação nucleotídicas distintas, visando à detecção de fragmentos genômicos de vírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*.

A temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos utilizada para as reações de amplificação de fragmentos genômicos pertencentes à alfavírus e flavivírus foi de 54°C.

Para a detecção de fragmentos genômicos pertencentes aos *Orthobunyavirus* foi utilizada para anelamento dos oligonucleotídeos a temperatura de 56°C.

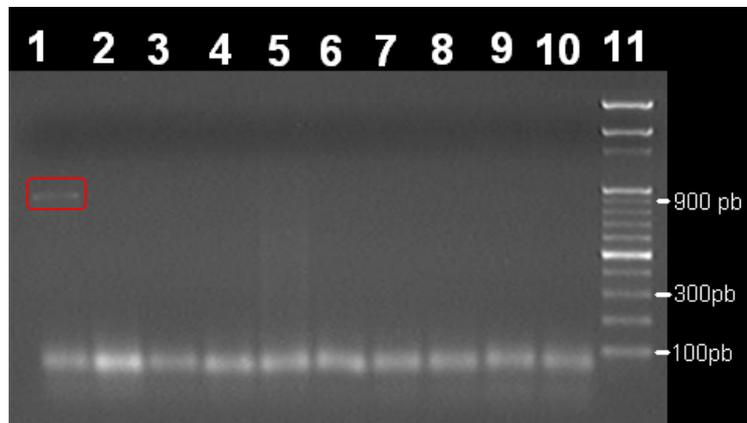
Um total de duzentas e novena e seis (296) amostras de soro foram submetidas à pesquisa de fragmentos genômicos virais, compreendendo cento e dezesseis (116) amostras coletadas entre os meses de janeiro e março de 2007 e cento e oitenta (180) amostras coletadas entre os meses de janeiro e março de 2008. Nas amostras analisadas não ocorreu amplificação dos fragmentos genômicos esperados. As figuras 22, 23 e 24 demonstram a eletroforese em gel de agarose [1,5%] de algumas amostras testadas para *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* respectivamente.

Figura 22 Detecção de *Alphavirus* em amostras de soro



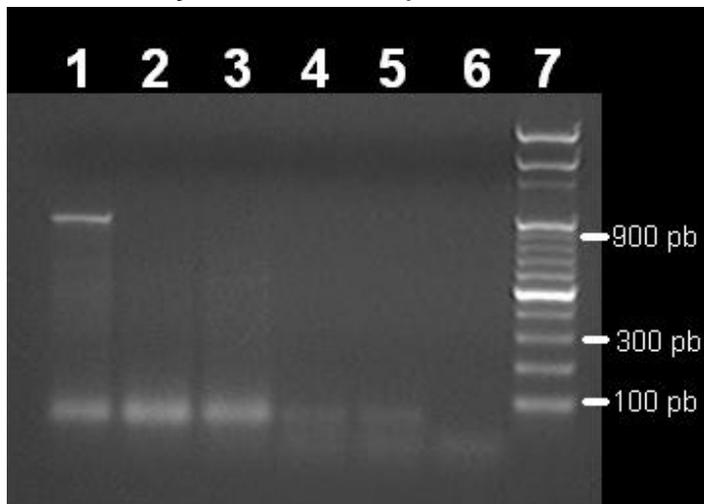
Colunas 1 - 4: Amostras de soro. **Coluna 5:** Controle positivo (MAYV). **Coluna 6:** Controle negativo (cultura celular não infectada). **Coluna 7:** Marcador molecular (DNA ladder 100pb). **Colunas 8 - 13:** Amostras de soro.

Figura 23 Detecção de *Flavivirus* em amostras de soro



Coluna 1: Controle positivo (DENV2). **Coluna 2:** Controle negativo (cultura celular não infectada). **Colunas 3 - 10:** Amostras de soro. **Coluna 11:** Marcador molecular (DNA ladder 100pb).

Figura 24 Detecção de *Orthobunyavirus* em amostras de soro



Coluna 1: Controle positivo (OROV). **Coluna 2 - 5:** Amostras de soro. **Coluna 6:** Controle negativo (cultura celular não infectada). **Coluna 7:** Marcador molecular (DNA ladder 100pb).

6. DISCUSSÃO

As arboviroses constituem há tempos uma preocupação dos serviços de saúde do Brasil. A febre amarela, conhecida no Brasil desde o século XVI, foi o principal ícone representativo das arboviroses até meados do século XX, quando esforços iniciados em 1901, na América Latina, para erradicação do vetor urbano da febre amarela, o *Aedes aegypti*, e para vacinação da população – em especial nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo – resultaram em uma significativa redução dos casos de febre amarela urbana (BERTOLLI FILHO, 2002).

A dificuldade enfrentada na erradicação dos insetos vetores, a falha nos sistemas de detecção de doenças e o constante desmatamento que expõe populações humanas a animais reservatórios silvestres constituem atualmente as principais causas para a emergência de arboviroses (MESLIN; STOHR; HEYMANN, 2001).

A OMS reconhece que a emergência/re-emergência de doenças infecciosas é um problema global. Encontros entre instituições de saúde de diversos países são realizados periodicamente com o objetivo de estabelecer planos de ação para contenção e atualização acerca das doenças emergentes/re-emergentes (OPAS, 1998; OPAS, 1999; OPAS, 2000; OPAS, 2004).

Um documento publicado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) em 1992 resume as grandes linhas de atuação e metas para controle da dispersão das doenças infecciosas. Neste documento a vigilância, a pesquisa aplicada, a prevenção e o controle são os principais objetivos determinados para contenção das doenças emergentes/re-emergentes (SCHATZMAYR, 2001).

O presente estudo utilizou amostras de soro de pessoas residentes em localidades rurais e urbanas do Estado do Amazonas para determinar, através de técnicas sorológicas e moleculares, a incidência e a prevalência de infecções por arbovírus não investigadas pelos serviços de saúde brasileiros. As amostras foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo compreendeu indivíduos residentes em uma comunidade rural localizada a cerca de 140 km da capital do Estado. O segundo grupo foi composto por amostras de soro de indivíduos febris residentes em diversas

localidades do Estado do Amazonas, diagnosticados negativamente para malária e dengue e coletadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em Manaus.

Devido à disparidade de características entre as amostras e metodologia utilizadas, a análise dos resultados não pôde ser comparada, e será apresentada separadamente.

6.1. Sorologia das amostras coletadas na zona rural (Grupo 1)

Os resultados encontrados a partir da análise sorológica dos indivíduos residentes na zona rural do Estado do Amazonas serão discutidos em quatro partes: comparação dos dados encontrados com outros estudos semelhantes realizados na Amazônia Legal, fatores de risco para arboviroses, fatores de proteção para arboviroses e, por fim, fatores que não influenciaram nos resultados encontrados.

Com relação à soro-positividade detectada nas amostras de soro dos indivíduos moradores da Comunidade de Rio Pardo, os resultados sorológicos obtidos indicaram somente a presença de arbovírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* naquela localidade, MAYV e VEEV. Os três indivíduos soropositivos para VEEV eram do sexo feminino, pertenciam a faixas etárias distintas, não faziam parte da mesma família e habitavam diferentes unidades geográficas amostrais. Ainda, destes três casos, dois foram reativos também para MAYV.

A reatividade cruzada entre alfavírus já foi reportada em alguns estudos (XIAO *et al.*, 1986; MCCLAIN *et al.*, 1998). Os resultados de Xiao e colaboradores (1986) demonstram que a reatividade imunogênica cruzada ocorre especificamente entre vírus do mesmo gênero, contudo, não há evidências de que esta reatividade aconteça entre vírus de gêneros diferentes. McClain e colaboradores (1998) afirmam que “(...) a imunidade contra *Alphavirus* preexistente em humanos interfere com a resposta de anticorpos neutralizantes para uma vacina de vírus atenuado, heteróloga”.

Estudos que utilizaram ensaios de inibição da hemaglutinação (IH) e fixação do complemento (FC) demonstraram que os alfavírus partilham sítios antigênicos em comum. As reações antigênicas cruzadas provavelmente ocorrem como consequência de sítios conservados na proteína C e glicoproteína E1 dos alfavírus, conferindo a

proteção cruzada e interferindo em imunizações subseqüentes contra outros arbovírus (GRIFFIN, 2007).

É possível observar nos últimos 30 anos diversos estudos que utilizaram a metodologia do EIA-ICC para realizar investigações sorológicas acerca de arbovírus. De acordo com McClain e colaboradores (1998), “Os resultados de reação cruzada nos EIA-ICC demonstram que este método pode distinguir o grupo togavírus – ou antígenos espécie-específicos, com maior precisão que o ELISA”.

Considerando as informações disponíveis na literatura científica atual, acredita-se que estes três casos isolados ocorreram em consequência de reação imunológica cruzada entre anticorpos para MAYV e antígenos de VEEV. Tais casos foram, portanto, desconsiderados das análises estatísticas do presente estudo.

Quanto à soroprevalência de infecção por MAYV detectada na população do Assentamento de Rio Pardo (41,5%) e apresentada na tabela 4, observa-se que esta taxa está acima da média encontrada em outros estudos realizados na Região Amazônica.

Em estudo realizado durante o primeiro semestre de 1978, a investigação epidemiológica acerca de um surto febril no Estado do Pará determinou uma soroprevalência de aproximadamente 20% para MAYV. Na ocasião, mais de 4000 pessoas moradoras de Belterra foram infectadas; a maioria residente de áreas próximas à floresta (LE DUC; PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1981).

De Figueiredo e colaboradores (2004) descreveram um inquérito sorológico realizado durante epidemia de dengue no Estado do Amazonas, entre os meses de março de 1998 e dezembro de 1999. Na ocasião, das 55 amostras indicadas para diagnóstico de arbovirose, foram detectados 8 casos de infecção por MAYV e 3 casos de infecção por OROV, representando uma prevalência de 14,5% e 5,4%, respectivamente naquela população amostral.

Em 2004, um estudo epidemiológico sobre arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* foi realizado em 357 moradores de uma comunidade rural do Estado do Acre. Através do teste de IH verificou-se que 42,6% destes indivíduos apresentavam soro-reatividade para pelo menos um dos arbovírus

dos gêneros estudados. Destas 152 amostras, 5,6% apresentaram reação monotípica (anticorpos para um único tipo viral de um mesmo gênero) para *Alphavirus*; 18,2% apresentaram reações heterotípicas para *Flavivirus*; e 4,2% apresentaram reações monotípicas e heterotípicas para *Orthobunyavirus*. A maior incidência detectada para infecções por *Alphavirus* foi para o MAYV. A soro-reatividade para *Flavivirus* detectou anticorpos para o YFV selvagem e os quatro sorotipos de DENV. Das amostras soro-reativas para o gênero *Orthobunyavirus* o OROV foi detectado em maior quantidade (SILVA-NUNES *et al.*, 2006).

Visto que a imunidade é duradoura, a alta soroprevalência para MAYV encontrada neste estudo pode estar ligada à exposição periódica da população ao MAYV. Portanto, foi realizada a análise da soro-reatividade frente às diversas faixas etárias encontradas na população em questão.

Com base na distribuição de soropositivos (IgG) entre as faixas etárias e a duração da imunidade conferida pelo contato com o MAYV é possível estimar quando ocorreu a infecção dos indivíduos. Observa-se na tabela 6 que indivíduos soropositivos estão distribuídos entre todos os grupos etários, alcançando um mínimo de 39,8% em crianças e máximo de 47,1% em idosos. Cerca de 20% da população estudada é constituída por indivíduos soropositivos para mayaro e possuem idade entre 18 e 64 anos.

As vacinas contra arbovírus autorizadas para imunização de humanos YFV (YF-17D) e VEEV (TC-83 e C-84) são capazes de manter uma titulação de anticorpos protetores maior ou igual a 1:20; suficiente para conservar uma imunização por pelo menos 10 anos (PITTMAN *et al.*, 1996; ROUKENS & VISSER, 2008). Ademais, observações descritas em trabalhos realizados com VEEV demonstram que as cepas epizoóticas deste vírus causam surtos epidêmicos em intervalos de 10 a 20 anos em países da Região Amazônica, refletido pelo aumento da população de indivíduos imunologicamente desprotegidos (HART *et al.*, 2001).

Não há na literatura científica, até o momento, estudos acerca da duração da imunidade protetora por contato de um indivíduo com o MAYV. No entanto, considerando as observações acerca da duração da imunidade conferida por cepas

selvagens e vacinais de diferentes arbovírus, pode-se admitir que as infecções por MAYV ocorreram há uma década ou menos, visto que 39 crianças abaixo de 10 anos de idade apresentaram anticorpos contra este vírus.

A soro-reatividade também foi analisada quanto aos gêneros masculinos e femininos, uma vez que homens e mulheres possuem papéis diferentes na sociedade e, portanto, podem ser expostos aos vetores de maneira distinta.

A tabela 5 demonstra que a distribuição de soropositivos entre homens (42,6%) e mulheres (40,5%) é semelhante à média de distribuição de soropositivos da população estudada (41,5%).

A soroprevalência maior em um gênero ou grupo etário específico poderia indicar um provável fator de risco para infecção, relacionado talvez à atividade cotidiana do indivíduo. A faixa etária, por exemplo, pode determinar a atividade exercida pelo indivíduo (escolar, trabalhador, aposentado), bem como o gênero (agricultor, dona de casa, etc.); portanto, o local que o indivíduo frequenta habitualmente. No entanto, à luz destes dados, não é possível definir um grupo de risco à soro-positividade.

A relação entre os casos de SFI reportados pelo posto de saúde local e os resultados sorológicos encontrados neste estudo foi analisada. A ocorrência de síndrome febril indiferenciada pode ser relacionada aos casos de arboviroses não diagnosticados, uma vez que não há detecção destas viroses rotineiramente pelos sistemas de saúde.

Os dados obtidos do banco de dados sócio-epidemiológicos e apresentados na tabela 7 demonstraram que 76,2% dos casos de síndrome febril indiferenciada (SFI) que ocorreram durante o decorrer do inquérito sorológico no Assentamento de Rio Pardo foram diagnosticados como não maláricos. Este dado foi confirmado através da análise do banco de dados oficial do posto de saúde local. Cruzando este dado com os resultados do inquérito sorológico observa-se que, entre os indivíduos não diagnosticados, 40,7% obtiveram resultado reativo no teste sorológico para MAYV.

A relação entre os casos reportados de síndrome febril indiferenciada e a soro-positividade não foi estatisticamente significativa, porém, os índices encontrados neste estudo são semelhantes às taxas encontradas na sede do Município de Presidente

Figueiredo (79,6% dos casos de SFI não foram diagnosticados como malária) e do Município de Manaus (75,1% dos casos de SFI não foram diagnosticados como malária e 22,5% dos casos de SFI foram diagnosticadas como arbovirose) no mesmo período deste inquérito sorológico (DATASUS, 2006; DATASUS, 2007).

Acredita-se, portanto, que o fenômeno observado no Assentamento de Rio Pardo está inserido em uma janela de diagnóstico das síndromes febris não detectadas (entre 20% e 30%) pelos sistemas de saúde. É importante lembrar que de acordo com a Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas cerca de 30% dos casos anuais de síndromes febris de etiologia não-malárica/não-bacteriana permanecem sem diagnóstico.

A vacinação contra a febre amarela pôde ser analisada sob duas perspectivas distintas: interferência de anticorpos induzidos por vacinação contra febre amarela no exame sorológico (EIA-ICC) e situação vacinal da população estudada.

Com relação à interferência daqueles anticorpos produzidos em consequência do desafio imunológico incitado pela vacina contra febre amarela pôde-se verificar, a partir da análise estatística, que não houve influência no resultado sorológico (gráfico 3). Como citado anteriormente, a soro-reatividade cruzada é observada em arbovírus pertencentes à mesma família, portanto, anticorpos com sítios de ligação específicos para YFV (*Flaviviridae: Flavivirus*) não influenciam em testes sorológicos para *Bunyaviridae* ou *Togaviridae*.

Quanto à situação vacinal da população estudada, observa-se que 15,1% dos indivíduos não estavam vacinados. Este é um dado importante, visto que tais pessoas vivem em área endêmica para o YFV. No entanto, deve-se esclarecer que este dado não foi confirmado por métodos de detecção de anticorpos contra o YFV. Estes valores foram obtidos pela observação dos cartões de vacinação individuais, quando não, por relato pessoal ao entrevistador.

O acúmulo de lixo próximo às residências poderia relacionar a transmissão viral aos insetos hematófagos domiciliados. A presença de lixo próximo à residência pode ser fator de atração para culicídeos devido à abundância de matéria orgânica e/ou

criadouro em embalagens que acumulam água. Portanto, o destino dos dejetos produzidos pelo domicílio foi analisado como fator de risco à soro-positividade.

É possível observar no gráfico 5 que apenas treze (13) domicílios, contendo um total de trinta e cinco (35) residentes, relataram o descarte inadequado dos dejetos produzidos. Destas, cerca de 40% possuem pelo menos um morador soropositivo para MAYV. Com relação ao descarte adequado, cerca de 50% das residências possuem pelo menos um morador soropositivo para MAYV. A análise estatística da relação entre o descarte de dejetos e a soro-positividade não demonstrou relação estatisticamente significativa com relação à soro-reatividade.

Os reservatórios de água também foram observados nas residências. Embora acúmulos de água forneçam um ambiente propício à reprodução de culicídeos, não foi observada na análise estatística qualquer relação significativa entre possuir um poço ou cacimba e a soro-reatividade (gráfico 6).

Com a intenção de investigar um foco de infecção na comunidade verificou-se a soroprevalência encontrada nas estradas e na área de rio.

A análise estatística da distribuição de soropositivos por unidades geográficas (UG) demonstra que as unidades mais urbanizadas, UG-2 e UG-4, concentram a maior parte de indivíduos soropositivos. Com base nos dados deste trabalho, acredita-se que a proximidade destas residências com a floresta pode ser um fator determinante à exposição dos moradores destas áreas aos vetores silvestres, uma vez que tais insetos encontram sítios de reprodução acessíveis e suprimentos de sangue abundantes. Outro fator que pode contribuir para a alta soroprevalência encontrada nestas duas localidades é a proximidade entre as residências, visto que um indivíduo infectado serviria como reservatório para a transmissão viral a outros vetores.

As residências localizadas na UG-6 apresentam uma localização próxima à floresta semelhante à UG-2 e UG-4. A UG-6 também apresentou índice de soroprevalência alto (53,8%). Observa-se que a UG-6 é a localidade com maior exploração vegetal, fato que provavelmente expõe os residentes aos vetores silvestres.

Já as estradas UG-1, UG-5 e UG-3 estão mais afastadas do limite com a floresta. Tais estradas apresentaram uma prevalência de 30,7%, 16,3% e 0%, respectivamente.

Nessas três localidades, a organização dos moradores para a agricultura e pecuária permitiu um maior desmatamento e conseqüente distanciamento das residências frente os limites da floresta. Acredita-se que esta distância pode ser fator importante para promover um menor índice de indivíduos infectados. Ademais, o registro de nenhuma ocorrência de infecção na UG-3 pode ser explicado pelo número e comportamento da população residente na localidade. Tal população é a menor registrada no Assentamento de Rio Pardo (12 moradores) e está em maior movimento para fora da comunidade (50% da população estão na localidade a trabalho). Embora a amostragem da localidade seja significativa (12 moradores/12 indivíduos analisados), o número total de indivíduos estudados pode estar abaixo da capacidade de detecção da infecção.

O acesso exclusivo por via fluvial torna a UG-7 uma localidade particular. As residências estão localizadas em áreas distantes umas das outras, o que dificulta a circulação das pessoas. As residências, diferentemente daquelas localizadas nas estradas, estão inseridas na floresta e, no entanto, a UG-7 apresentou um dos índices mais baixos de soroprevalência (4,5%). Acredita-se que esta inserção não provoca um desequilíbrio ambiental suficiente para deslocar o vetor de seu habitat natural e alterar sua preferência alimentar. Contudo, a circulação inevitável pelas matas – seja por trânsito apenas, ou na agricultura – expõe os moradores aos vetores silvestres.

Com relação à dinâmica de interferência do homem no meio ambiente pode-se afirmar que as modificações ambientais afetam a distribuição das doenças infecciosas, proporcionando por vezes a proliferação de vetores e parasitas. De acordo com estudo realizado em 2004, intervenções como o desmatamento rápido promove o deslocamento de vetores ou de agentes etiológicos, os quais atingem tanto os indivíduos envolvidos em tal prática, quanto às populações localizadas próximas da área (PIGNATTI, 2004).

Contudo, é importante ressaltar que as observações feitas acerca da relação entre a soroprevalência e as unidades geográficas amostrais carecem de experimentações entomológicas para avaliar a real distribuição de vetores silvestres conhecidos, bem como analisar o potencial de transmissão de outros insetos, sejam eles silvestres ou domiciliados.

Observações realizadas durante este estudo acerca da presença de culicídeos em ambientes com as características descritas para os toaletes constataram grande quantidade de insetos alados no interior destes. Em sua maioria culicídeos.

A presença de toaleta dentro do domicílio, ou até 20 metros deste, foi considerada fator de risco estatisticamente significativo à soro-positividade. Observa-se no gráfico 4 que apesar de poucas residências possuírem toaleta a soroprevalência para MAYV em indivíduos residentes nestas casas foi maior em comparação àqueles que não possuem toaleta.

Estudos acerca do comportamento de culicídeos adultos são baseados principalmente em observações que se destinam a flagrar o comportamento destes insetos. Certas características são freqüentemente notadas nos abrigos usualmente utilizados pelas formas adultas. O abrigo, em geral, se localiza próximo ao criadouro, é pouco iluminado, apresenta certo teor de umidade e ausência de movimentação do ar. De acordo com Forattini (2002a), (...) “tais condições são encontradas tanto em situações naturais como artificiais. Dentro de tal multiplicidade, é possível mencionar as vegetações de todos os tipos e as edículas construídas pelo homem.”

O abrigo pós-prandial (repouso do inseto após o repasto sanguíneo) é interessante para o estudo epidemiológico, visto que os mais importantes vetores permanecem no ambiente antrópico após a alimentação (FORATTINI, 2002a).

De acordo com Tesh e colaboradores (1999) o MAYV possui capacidade de infectar diversas espécies de culicídeos. A observação de quantidades consideráveis de culicídeos, aliada ao resultado estatístico, reforça, portanto, a idéia de que a transmissão do MAYV estaria ocorrendo nas proximidades do domicílio e talvez em seu interior. No entanto, esta afirmação só pode ser comprovada com estudos entomológicos nestes locais. A captura, identificação e detecção viral nestes insetos configuram um importante estudo para elucidação do ciclo de transmissão que ocorre na localidade.

Outro fator que sugere que a transmissão viral ocorreu através de vetores domiciliados é a proteção conferida pelo uso de mosquiteiro.

Como esperado, a análise estatística demonstrou que o uso freqüente de mosquiteiro ao dormir é fator de proteção contra a soro-positividade. De acordo com os

dados obtidos apenas 26,5% dos indivíduos que relataram utilizar mosquiteiro apresentaram resultado sorológico positivo. Dos indivíduos que relataram não utilizar mosquiteiro ao dormir 47,0% apresentaram resultado sorológico positivo (tabela 9).

Este resultado demonstra que o uso de mosquiteiro é uma prática eficaz contra a transmissão do MAYV.

A ocorrência de infecção de arbovírus por vetores domiciliares ou peridomiciliares é também sugerida pelo resultado demonstrado pela análise estatística da presença de animais domésticos ou selvagens criados próximos aos domicílios.

Os resultados encontrados indicam que a presença de suínos, cachorros e aves reduzem significativamente a incidência de infecção por MAYV na localidade estudada.

Em revisão literária acerca das arboviroses emergentes e re-emergentes Gubler afirma que os suínos atuam como amplificadores da infecção, uma vez que tais animais servem de reservatórios assintomáticos, aumentando assim o risco de infecções humanas. Entretanto os trabalhos citados por Gubler em seu artigo desconsideram a questão entomológica, em que os vetores seriam atraídos pela presença destes animais e alimentar-se-iam nos mesmos, reduzindo o contato com o humano (GUBLER, 2002).

Desde a década de 1970 trabalhos destacam o uso de animais como modelos para estudo epidemiológico de arboviroses (DICKERMAN *et al.*, 1973).

Já em 2001, Komar e colaboradores evidenciam um efeito “zooprofilático” que a presença de cachorros e cavalos no peridomicílio promove, reduzindo a incidência arbovirose, especificamente a febre causada por WNV. Naquele trabalho é demonstrado que a alta soroprevalência nestas espécies indica uma grande exposição aos vetores infectados. No entanto, é incerto o motivo pelo qual tais animais apresentam altas taxas de soro-positividade. Maior atratividade para os insetos hematófagos ou exposição noturna são fatores ponderados pelos autores. Komar e colaboradores ainda destacam a possibilidade de utilizar estes animais como sentinelas para controle de infecções humanas (KOMAR; PANELLA; BOYCE, 2001).

6.2. Detecção molecular viral das amostras coletadas na zona urbana (Grupo 2)

As amostras de soro coletadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas diferem por completo daquelas analisadas na comunidade de Rio Pardo. Fundamentalmente, são amostras de soro de pacientes sintomáticos (apresentando temperatura axilar $\geq 38^{\circ}\text{C}$) indicados para o exame da gota espessa em busca de plasmódio e sorologia para dengue, com resultado negativo para ambos os testes. Tais amostras, embora coletadas no ambulatório da Instituição, são provenientes de diversas localidades do Estado do Amazonas, visto que a FMTAM é o centro de referência para tratamento de enfermidades tropicais da Amazônia Ocidental. Portanto, a busca por fragmentos genômicos de arbovírus em tais amostras teve como objetivos disponibilizar um protocolo de diagnóstico molecular de arboviroses no principal centro de tratamento de doenças tropicais da região e detectar possíveis infecções causadas por arbovírus não-dengue atendidos pela Instituição.

Para atingir tais objetivos optou-se por seguir dois protocolos de amplificação descritos na literatura científica (MORELI *et al.*, 2002; BRONZONI *et al.*, 2005) e adaptá-los para as condições laboratoriais disponíveis. Foi selecionado também um kit comercial de extração rápida de RNA a partir de amostras de sangue, eliminando o aparato necessário à extração pelo método clássico de fenol/clorofórmio, o que dificultaria extrações na rotina do laboratório de arbovirologia local. Determinados os processos de extração e amplificação do genoma viral iniciaram-se os ensaios para adaptação dos protocolos descritos às condições laboratoriais.

De acordo com o manual disponibilizado pelo fabricante o kit de extração é capaz de recuperar até 90% do RNA presente na amostra. O manual ainda alerta que a concentração de RNA viral isolado a partir de amostras biológicas é normalmente menor que $7\text{ng}/\mu\text{L}$. Este valor pode variar de acordo com o volume da amostra, condições de estocagem e título viral (QIAGEN, 1999). Portanto, a extração de RNA tanto das amostras-controle, quanto das amostras de soro foram eficientes, apresentando em média $6,25\text{ng}/\mu\text{L}$.

Apesar das dificuldades iniciais em estabelecer um protocolo eficiente para a amplificação as amostras-controle foram identificadas corretamente após a correção das temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos. A escolha de amostras liofilizadas para controle da PCR foi fundamental para validação do ensaio, visto que as amostras provenientes de cultura celular infectada apresentaram por vezes rastros de DNA que dificultavam a observação das bandas esperadas para cada tipo viral.

No entanto, nenhuma amostra de soro contendo os fragmentos genômicos pesquisados foi encontrada. Diversos fatores podem inviabilizar a detecção de fragmentos genômicos, principalmente os genomas compostos por moléculas de RNA.

Um estudo sorológico acerca de arboviroses em pacientes febris atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas estima que a soroprevalência para MAYV seja de apenas 4,7%, refletindo uma baixa detecção deste vírus nas amostras de soro que chegam à instituição. Além disso, as moléculas de RNA constituintes dos genomas dos arbovírus apresentam-se em fita simples, característica essa que torna a molécula mais lábil às variações de temperatura e ação enzimática, dificultando a detecção destas moléculas por PCR.

Outro fator determinante para a falha na detecção destes fragmentos consiste no período curto de viremia registrado para os arbovírus em geral. Para uma detecção satisfatória seria necessário realizar a coleta de sangue durante a fase aguda da infecção, fato este que não pode ser controlado quando se trata de pacientes vindos de localidades distantes da FMTAM. Por vezes, tais pacientes se deslocam de municípios distantes buscando tratamento na capital do Estado, Manaus. Ao chegar para o atendimento a viremia, que se estende por no máximo cinco dias, já não é suficiente para detecção pela técnica de PCR. Com exceção aos surtos e epidemias, nos quais um maior número de pacientes busca atendimento, a identificação de infecções eventuais é prejudicado.

Alguns trabalhos publicados recentemente alertam para tais dificuldades. Em estudo realizado com eqüinos, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Corrêa discorre sobre as dificuldades em identificar amostras positivas para nove arbovírus distintos, pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, pela técnica de PCR, em amostras de sangue de eqüinos e em carrapatos (CORRÊA, 2008).

Portanto, embora não tenha sido possível a identificação do RNA destes arbovírus nas amostras de soro analisadas, a otimização da detecção molecular, bem como os insumos iniciais para a realização da técnica (oligonucleotídeos iniciadores, enzima polimerase, controles virais, etc.) estão disponíveis para a continuação da vigilância destas arboviroses na Região da Amazônia Ocidental.

7. CONCLUSÃO

- A alta soroprevalência para MAYV em uma região próxima a capital do Estado do Amazonas, Manaus, alerta para a necessidade de uma vigilância epidemiológica acerca dos arbovírus não diagnosticados pelos sistemas de saúde da região;
- A detecção de soro-positividade para o vírus mayaro (MAYV) em crianças com idade inferior a 10 anos evidencia a circulação recente deste vírus na região;
- A localização geográfica de residências próximas a áreas de mata densa, e a presença de toaletes foram fatores de risco para a soroprevalência do MAYV;
- O uso de mosquiteiro e a criação de animais no peridomicílio foram fatores de proteção para a infecção do MAYV;
- O protocolo de detecção de fragmentos genômicos de arbovírus baseado na técnica de PCR para complementar os testes sorológicos já está em uso em duas unidades de pesquisa e vigilância de arbovírus em Manaus. São elas a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM e o Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ;
- A não detecção de anticorpos para os vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e vírus oropouche (OROV) não descarta a circulação destes vírus na região.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, P. V.; ROBICH, R. M.; TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; KLEIN, T. A.; HUAMAN, A.; GUEVARA, C.; RIOS, Z.; TESH, R. B.; WATTS, D. M.; OLSON, J.; WEAVER, S. C. Endemic eastern equine encephalitis in the Amazon region of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76, 293-298, 2007.

AMARO, F.; CIUFOLINI, M. G.; VENTURI, G.; FIORENTINI, C.; ALVES, M. J. Phleboviruses laboratory diagnosis (Toscana virus). **Acta Medica Portuguesa**, 20, 341-346, 2007.

ANDERSON, C. R.; DOWNS, W. G.; WATTLEY, G. H.; AHIN, N. W.; REESE, A. A. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent: II. Isolation from Blood of Patients in Trinidad, B.W.I. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 6, 1012-1016, 1957.

ANDERSON, C. R.; SPENCE, L.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 10, 574-578, 1961.

AZEVEDO, R. S.; NUNES, M. R.; CHIANG, J. O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H. B.; PINTO, A. Y.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, H. A.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 13, 912-915, 2007.

BECK, C. E.; WYCKOFF, R. W. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. **Science**, 88, 530, 1938.

BERTOLLI FILHO, Claudio Por uma história renovada da febre amarela e da vacina anti-amarela no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, 9, 213-220, 2002.

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

BRONZONI, R. V.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and

identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 696-702, 2005.

CASALS, J. Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-challenge tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 587-596, 1963.

CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent: III. Investigation of an Epidemic of Acute Febrile Illness on the River Guama in Para, Brazil, and Isolation of Mayaro Virus as Causative Agent. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 6, 1017-1023, 1957.

CDC. Venezuelan Equine Encephalitis -- Colombia, 1995. **44** Atlanta, Georgia. 39. 1995.

CHARREL, R. N.; ATTOUI, H.; BUTENKO, A. M.; CLEGG, J. C.; DEUBEL, V.; FROLOVA, T. V.; GOULD, E. A.; GRITSUN, T. S.; HEINZ, F. X.; LABUDA, M.; LASHKEVICH, V. A.; LOKTEV, V.; LUNDKVIST, A.; LVOV, D. V.; MANDL, C. W.; NIEDRIG, M.; PAPA, A.; PETROV, V. S.; PLYUSNIN, A.; RANDOLPH, S.; SUSS, J.; ZLOBIN, V. I.; DE, Lamballerie, X Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. **Clinical Microbiology Infections**, 10, 1040-1055, 2004.

COIMBRA, T. L.; SANTOS, C. L.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S. M.; BISORDI, I.; NAGAMORI, A. H.; MARTI, A. T.; SANTOS, R. N.; FIALHO, D. M.; LAVIGNE, S.; BUZZAR, M. R.; ROCCO, I. M. Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 49, 221-224, 2007.

CORRÊA, Alex Pauvolid (2008) *Estudo Sobre Arbovírus Em Populações De Eqüinos e Artrópodes Na Sub-Região Da Nhecolândia No Pantanal De Mato Grosso Do Sul*. Instituto Oswaldo Cruz.

DATASUS. **SIVEP-malária**. Resumo Epidemiológico por local de notificação - Estadual. 2006. Disponível em:

<http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_e?Ano_e=2006&UF_e=AM>. Acessado em:

DATASUS. **SIVEP-malária**. Resumo Epidemiológico por local de notificação - Estadual. 2007. Disponível em:

<http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_e?Ano_n=2007>. Acessado em:

DE FIGUEIREDO, R. M.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; SOUZA, V.; MOURAO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 14, 667-669, 2008.

DE FIGUEIREDO, R. M.; THATCHER, B. D.; DE LIMA, M. L.; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. Exanthematous diseases and the first epidemic of dengue to occur in Manaus, Amazonas State, Brazil, during 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37, 476-479, 2004.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8, 390-398, 2004.

DE THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, 9, 1326-1329, 2003.

DEUBEL, V.; HUERRE, M.; CATHOMAS, G.; DROUET, M. T.; WUSCHER, N.; LE, Guenno B.; WIDMER, A. F. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. **Journal of Medical Virology**, 53, 212-217, 1997.

DIAZ, L. A.; OCCELLI, M.; ALMEIDA, F. L.; ALMIRON, W. R.; CONTIGIANI, M. S. Eared dove (*Zenaida auriculata*, Columbidae) as host for St. Louis encephalitis virus (Flaviviridae, Flavivirus). **Vector. Borne. Zoonotic. Dis**, 8, 277-282, 2008.

DIAZ, L. A.; RE, V.; ALMIRON, W. R.; FARIAS, A.; VAZQUEZ, A.; SANCHEZ-SECO, M. P.; AGUILAR, J.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; VISINTIN, A.; GARCIA, J.; MORALES, M. A.; TENORIO, A.; CONTIGIANI, M. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. **Emerg. Infect. Dis**, 12, 1752-1754, 2006.

DICKERMAN, R. W.; SCHERER, W. F.; NAVARRO, E.; ORDONEZ, M.; ORDONEZ, J. V. The involvement of dogs in endemic cycles of Venezuelan encephalitis virus. **Am J Epidemiol.**, 98, 311-314, 1973.

FERREIRA, M. S. Hantaviruses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36, 81-96, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and

Rhabdoviridae families. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 23, 13-18, 1990.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infections**, 2, 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40, 224-229, 2007.

FMTAM. Dengue. In: MOURAO, M.P.G.; ALECRIM, W.D.; ALBUQUERQUE, B.C.; LACERDA, M.V.G. **Rotinas da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas**. Manaus, Amazonas: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 2003. v. 61-70.

FORATTINI, O. P. Biologia das formas adultas. In: FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2002a. v. 2. p. 97-130.

FORATTINI, O. P. Outras Arboviroses. In: FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2002b. v. 2. p. 507-549.

FRANCO, O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. **Revista Brasileira de malariologia e Doenças Tropicais**, 13, 43-48, 1961.

GOULD, E. A.; HIGGS, S.; BUCKLEY, A.; GRITSUN, T. S. Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, 12, 549-555, 2006.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 1023-1067.

GU, W.; UNNASCH, T. R.; KATHOLI, C. R.; LAMPMAN, R.; NOVAK, R. J. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102, 817-822, 2008.

GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, 4, 442-450, 1998.

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

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives in Medical Research**, 33, 330-342, 2002.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 1153-1252.

HART, Mary Kate; LIND, Cathleen; BAKKEN, Russell; ROBERTSON, Michelle; TAMMARIELLO, Ralph; LUDWIG, George V. Onset and duration of protective immunity to IA/IB and IE strains of Venezuelan equine encephalitis virus in vaccinated mice. **Vaccine**, 20, 616-622, 2001.

HAYES, E. B.; KOMAR, N.; NASCI, R. S.; MONTGOMERY, S. P.; O'LEARY, D. R.; CAMPBELL, G. L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, 11, 1167-1173, 2005.

HENCHAL, E. A.; POLO, S. L.; VORNDAM, V.; YAEMSIRI, C.; INNIS, B. L.; HOKE, C. H. Sensitivity and Specificity of a Universal Primer Set for the Rapid Diagnosis of Dengue Virus Infections by Polymerase Chain Reaction and Nucleic Acid Hybridization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 45, 418-428, 1991.

HERVÉ, J. P.; DÉGALIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Arbovírus - Aspectos Ecológicos. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. **50 anos de Contribuição às Ciências biológicas e à Medicina Topical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v. 1. p. 409-437.

HOWE, D. K.; VODKIN, M. H.; NOVAK, R. J.; SHOPE, R. E.; MCLAUGHLIN, G. L. Use of the polymerase chain reaction for the sensitive detection of St. Louis encephalitis viral RNA. **Journal of Virological Methods**, 36, 101-110, 1992.

KERR, P. J.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Ross River virus variants selected during passage in chick embryo fibroblasts: serological, genetic, and biological changes. **Virology**, 193, 446-449, 1993.

KLEIBOEKER, S. B.; SCOLES, G. A. Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. **Animal Health Research and Reviews**, 2, 121-128, 2001.

KOMAR, N.; PANELLA, N. A.; BOYCE, E. Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. **Emerg. Infect. Dis**, 7, 736-738, 2001.

KUHN, R. J. Togaviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 1001-1022.

LE DUC, J. W.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil: II. Epidemiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 30, 682-688, 1981.

LENNETTE, E. H.; KOPROWSKI, H. Human infection with Venezuelan equine encephalomyelitis virus: a report on eight cases of infection acquired in the laboratory. **JAMA**, 13, 1088-1095, 1943.

LIMA, V. L.; RANGEL, O.; ANDRADE, V. R.; SILVEIRA, N. Y.; OLIVEIRA, S. S.; FIGUEIREDO, L. T. Dengue: sero-epidemiological survey and virological surveillance in Campinas, Sao Paulo, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, 23, 669-680, 2007.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H-J; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 1101-1152.

LINDQUIST, L.; VAPALAHTI, O. Tick-borne encephalitis. **The Lancet**, 371, 1861-1871, 2008.

MAHESHWARI, Anurag; RAY, Stuart; THULUVATH, Paul J. Acute hepatitis C. **The Lancet**, 372, 321-332, 2008.

MCCLAIN, D. J.; PITTMAN, P. R.; RAMSBURG, H. H.; NELSON, G. O.; ROSSI, C. A.; MANGIAFICO, J. A.; SCHMALJOHN, A. L.; MALINOSKI, F. J. Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. **Journal of Infectious Diseases**, 177, 634-641, 1998.

MCCORMACK, J. G.; ALLWORTH, A. M. Emerging viral infections in Australia. **Medical Journal Australia**, 177, 45-49, 2002.

MERCADER, S.; FEATHERSTONE, D.; BELLINI, W. J. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. **Journal of Virological Methods**, 137, 140-149, 2006.

MERCER, D. R.; CASTILLO-PIZANGO, M. J. Changes in relative species compositions of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and an outbreak of Oropouche virus in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, 42, 554-558, 2005.

MESLIN, F. X.; STOHR, K.; HEYMANN, D. Public health implications of emerging zoonoses. **Rev. Sci. Tech.**, 19, 310-317, 2001.

MILLER, B. R. Arboviruses. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. **Encyclopedia of Virology**. Oxford: Academic Press, 2008. v. 170-176.

MINISTÉRIO DA SAÚDE & SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico - Adulto e Criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

MONDINI, A.; CARDEAL, I. L.; LAZARO, E.; NUNES, S. H.; MOREIRA, C. C.; RAHAL, P.; MAIA, I. L.; FRANCO, C.; GONGORA, D. V.; GONGORA-RUBIO, F.; CABRERA, E. M.; FIGUEIREDO, L. T.; DA FONSECA, F. G.; BRONZONI, R. V.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 13, 176-178, 2007.

MONROY, A. M.; SCOTT, T. W.; WEBB, B. A. Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of Eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. **Journal of Medical Entomology**, 33, 449-457, 1996.

MORELI, M. L.; AQUINO, V. H.; CRUZ, A. C.; FIGUEIREDO, L. T. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. **Journal of Medical Virology**, 66, 139-142, 2002.

MORILLA-GONZALES, A.; DE MUCHA-MACIAS, J. Estudio de una epizootia de encefalitis equina de Venezuela ocurrida en Tamaulipas, Mexico. **Revista de Investigacion en Salud Publica**, 3-20, 1969.

MORITA, K. Dengue vaccines. **Japanese Journal of Clinical Medicine**, 66, 1999-2003, 2008.

NALCA, A.; FELLOWS, P. F.; WHITEHOUSE, C. A. Vaccines and animal models for arboviral encephalitides. **Antiviral Research**, 60, 153-174, 2003.

NATHANSON, N. Epidemiology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 423-446.

NICHOL, S. T.; BEATY, B. J.; ELLIOT, R. M.; GOLDBACH, R.; PLYUSNIN, A.; SCHMALJOHN, C. S.; TESH, R. B. Family Bunyaviridae. In: **Virus Taxonomy.VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academy Press, 2005. v. 1. p. 1259.

O'GUINN, M. L.; LEE, J. S.; KONDIG, J. P.; FERNANDEZ, R.; CARBAJAL, F. Field detection of eastern equine encephalitis virus in the Amazon Basin region of Peru using reverse transcription-polymerase chain reaction adapted for field identification of arthropod-borne pathogens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70, 164-171, 2004.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Fact sheet N°94**. Malaria. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acessado em: 3-9-2008

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Fact sheet N°117**. Dengue and dengue haemorrhagic fever. 1-5-2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acessado em: 3-9-2008

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde. Meeting to Establish a Network of Laboratories for the Surveillance of Emerging Infectious Diseases (EID) in the Amazon Region. **106** Manaus, Brazil. 1998.

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde. Second Meeting of a Surveillance Network for Emerging Infectious Diseases (EID) in the Southern Cone Region. **154** Brasília, Brazil. 1999.

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde. Third meeting of the surveillance networks for emerging infectious diseases in the Amazon and Southern Cone Regions. **178** Atlanta, Georgia. 2000.

OPAS - Organização Pan Americana de Saúde. Recommendations of Third Joint Meeting of the Regional Surveillance Networks. **319** 2004.

PARKER, S. P.; CUBITT, W. D. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. **Journal of Clinical Pathology**, 52, 633-639, 1999.

PIGNATTI, M. G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil. **Ambiente & Sociedade**, VII, 133-148, 2004.

PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; GABBAY, Y. B.; MELLO, W. A.; LE DUC, J. W. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil: I. Clinical and Virological Findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 30, 674-681, 1981.

PINHEIRO, F. P.; LE DUC, J. W. Mayaro virus disease. In: MONATH, T.P. **The arboviroses: epidemiology and ecology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1998. v. 137-150.

PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E. Epidemia de Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, 12, 15-23, 1962.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; VASCONCELOS, P. F. Arbovírus - Aspectos Clínico-Epidemiológicos. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. **50 Anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v. 1. p. 375-408.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; VASCONCELOS, P. F. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighbor countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F. **An overview of Arbovirology in Brazil and Neighbor Countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. v. 1. p. 186-192.

PITTMAN, Phillip R.; MAKUCH, Richard S.; MANGIAFICO, Joseph A.; CANNON, Timothy L.; GIBBS, Paul H.; PETERS, Clarence J. Long-term duration of detectable neutralizing antibodies after administration of live-attenuated VEE vaccine and following booster vaccination with inactivated VEE vaccine. **Vaccine**, 14, 337-343, 1996.

POIDINGER, M.; ROY, S.; HALL, R. A.; TURLEY, P. J.; SCHERRET, J. H.; LINDSAY, M. D.; BROOM, A. K.; MACKENZIE, J. S. Genetic Stability Among Temporally and Geographically Diverse Isolates of Barmah Forest Virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 57, 230-234, 1997.

POWERS, A. M.; BRAULT, A. C.; SHIRAKO, Y.; STRAUSS, E. G.; KANG, W.; STRAUSS, J. H.; WEAVER, S. C. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, 75, 10118-10131, 2001.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, 88, 2363-2377, 2007.

QIAGEN . **QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook**. 1999. Qiagen.
Ref Type: Generic

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

RICO-HESSE, R.; WEAVER, S. C.; DE SIGER, J.; MEDINA, G.; SALAS, R. A. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 92, 5278-5281, 1995.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L.; BISORDI, I.; PETRELLA, S. M.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L.; BESSA, T. A.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B.; CERRONI, M. P.; MARTI, A. T.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 47, 281-285, 2005.

ROUKENS, Anna H.; VISSER, Leo G. Yellow fever vaccine: past, present and future. **Expert Opinion on Biological Therapy**, 8, 1787-1795, 2008.

SCHATZMAYR, H. G. Emerging and reemerging viral diseases. **Cadernos de Saude Publica**, 17 Suppl, 209-213, 2001.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 2. p. 1741-1789.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE .**Situação Da Febre Amarela Silvestre No Brasil, 2007 e 2008**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

SILVA-NUNES, M.; MALAFRONTA, R. S.; LUZ, B. A.; SOUZA, E. A.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA,

M. U. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Cadernos de Saude Publica**, 22, 1325-1334, 2006.

SMITHBURN, K. C.; HADDOW, A. J.; MAHAFFY, A. F. A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki forest. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 189-208, 1946.

STRAUSS, J. H.; CALISHER, C. H.; DALGARNO, L.; DALRYMPLE, J. M.; FREY, T. K.; PETTERSSON, R. F.; RICE, C. M.; SPAAN, W. J. M. Family Togaviridae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGUER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy. VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academy Press, 2005. v. 1. p. 1259.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, 58, 491-562, 1994.

SUDIA, W. D.; NEWHOUSE, V. F.; BEADLE, I. D.; MILLER, D. L.; JOHNSTON, J. G. Jr.; YOUNG, R.; ET.AL. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in North America in 1971: vector studies. **American Journal of Epidemiology**, 17-35, 1975.

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

THIEL, H-J; COLLETT, M. S.; GOULD, E. A. Family Flaviviridae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGUER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy. VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academy Press, 2005. v. 1. p. 979-996.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; PINHEIRO, F. P.; VASCONCELOS, P. F. Arboviroses. In: FREIRE, G.; FREIRE, A.R.C. **Doenças Infeciosas e Parasitárias - Enfoque Amazônico**. Belém: Editora CEJUP, UEPa, 1997. v. 207-225.

VASCONCELOS, P. F. Yellow Fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36, 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F.; BRYANT, J. E.; DA ROSA, T. P.; TESH, R. B.; RODRIGUES, S. G.; BARRETT, A. D. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 10, 1578-1584, 2004.

VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R. E.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; RODRIGUES, S. G.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F. **An overview of Arbovirology in Brazil and Neighbor Countries**. Belem: Instituto Evandro Chagas, 1998. v. 1. p. 72-99.

VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saude Publica**, 17 Suppl, 155-164, 2001.

VOROU, R. M.; PAPAVALASSILOU, V. G.; TSIODRAS, S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. **Epidemiology of Infections**, 135, 1231-1247, 2007.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 299, 285-314, 2006.

WEAVER, S. C.; SALAS, R.; RICO-HESSE, R.; LUDWIG, G. V.; OBERSTE, M. S.; BOSHELL, J.; TESH, R. B. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. **The Lancet**, 348, 436-440, 1996.

XIAO, Z. S.; JIA, L. L.; QU, X. S.; ZHANG, Y. H. Application of enzyme immunoassay on infected cells (EIA-IC) for arboviruses. **Acta Virologica**, 30, 487-493, 1986.

9. ANEXOS

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (GRUPO 1)

15 12 08 05:15a

CLAVES/ENSP/FIOCRUZ

(21) 22904893

P. 1

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: ECOLOGIA E SAÚDE NA AMAZÔNIA: MAPEAMENTO INTEGRADO E PARTICIPATIVO DAS DINÂMICAS SÓCIO-AMBIENTAIS E DE INCIDÊNCIA DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS NA AMAZÔNIA CENTRAL.

Responsável: SERGIO LUIZ BESSA LUZ

Data da Versão

Cadastro 384/07

Data do Parecer 20/08/2007

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Implantar um processo participativo de mapeamento integrado das características e dinâmicas sócio-ambientais e do perfil de incidência de arbovírus e de doenças de veiculação hídrica em uma área com baixo grau de antropização na Amazônia central.

Sumário do Projeto

O projeto é um estudo piloto em uma comunidade rural da Amazônia central com baixa antropização do meio ambiente, tendo como objetivo geral o mapeamento integrado e participativo das dinâmicas sócio-ambientais e de incidência de dois grupos selecionados de doenças (bactérias, vírus e parasitos transmitidos pela água e arbovírus). Esse mapeamento integrado e participativo incluirá a elaboração da história social da ocupação do espaço comunal, através da identificação da antropização da história local, dos caminhos da água, da saúde e da doença na comunidade. O levantamento sócio sanitário incluirá dados sobre habitações, saneamento básico, manejo de resíduos, acesso à água, infra-estrutura, sistema e serviços de saúde e organização comunitária. A análise ambiental incluirá unidades locais de paisagem e de uso social. Serão ainda avaliadas a qualidade das águas, a estrutura das comunidades de vetores de arbovírus. Os dados epidemiológicos serão levantados, primeiramente, a partir de dados secundários (SUS e unidade de saúde), posteriormente, serão realizados exames para o diagnóstico etiológico de síndromes diarreicas agudas e de análise integrada dos dados ambientais, sociais e epidemiológicos. Os dados levantados permitirão uma análise integrada e uma avaliação das relações dos perfis de risco e condições moduladoras ambientais e sociais que podem favorecer ou inibir a circulação de determinados patógenos, e ainda determinar diferentes níveis de exposição nos grupos humanos. Esta análise permitirá dar suporte à construção de ferramentas de gestão e manejo do risco baseadas em um processo participativo de pesquisa. O projeto faz parte de um programa de pesquisa sobre saúde, sociedade e endemias na Amazônia.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequado
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessária
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de identificação

Introdução	Adequada
Comentários sobre a introdução	

Objetivos	Adequados
Comentários sobre os objetivos	

Pacientes e Métodos	Adequado
Delimitação	Total
Tamanho de amostra	Local

Página 1 de 1

15 12 06 05:15a

CLAVES/ENSP/FIOCRUZ

1211 2007000

P. 4

Calculo do tamanho da amostra	Não necessário (pesquisa quali)
Participantes pertencentes a grupos especiais	Menores de 18 anos
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão do uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Comentário
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Tempo de Consentimento	Comentário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos	

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	não há previsão
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Outras fontes
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	

Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Após análise por este colegiado, das respostas às pendências no parecer emitido em 28/05/07, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela APROVAÇÃO do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.



Marlene Braz
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO II – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (GRUPO 2)



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
Cep: 69040-000
Manaus – Amazonas - Brasil



APROVAÇÃO Nº 1828

Registro CEP Nº 2460-06

CAAE – 0058.0.114.000-06

Processo Nº2460/2006-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Detecção e Caracterização Molecular de Arbovirus em pacientes atendidos na Rotina da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Pesquisador responsável: Gustavo Henrique Nolasco Grimmer Davis

Instituição Sediadora: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Instituição Vinculada: Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

Área Temática Especial: Não se aplica

Patrocinador: Fundação Oswaldo Cruz

Registro para armazen. de mat. Biológico humano: 0004/06

Após a análise relativa do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão do dia 13 de dezembro de 2006 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 13 de dezembro de 2006


Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira
Coordenador de Ética em Pesquisa
FMT-AM

Obs: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page..

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



PROJETO ECO-SAÚDE NA AMAZÔNIA Comunidade Rio Pardo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados do participante:

NOME: _____
 IDADE: _____ anos. Sexo: Masculino () Feminino ()

Estamos aqui na Comunidade de Rio Pardo para realizarmos nosso trabalho em parceria com os moradores. Nesta etapa do projeto, como combinado com a comunidade, pretendemos fazer o exame sorológico para ARBOVÍRUS em todos os moradores desta comunidade.

A ARBOVIROSE é uma doença causada por um vírus transmitido pela picada de carapanã e que causa febre, dor de cabeça e dores no corpo (no cotovelo, nas mãos e atrás do joelho, por exemplo). As arboviroses mais conhecidas são: a Febre Amarela e a Dengue, que podem causar a morte se não forem tratadas.

Existem algumas arboviroses que não conhecemos muito bem. A malária, a gripe e algumas diarreias podem também causar febres e dores no corpo, mas não são arboviroses. Sabemos que na Comunidade existem alguns casos de febres que não são causadas por malária, gripe ou diarreias. É importante identificar o que está causando a doença para tratar corretamente a pessoa. Para sabermos se estas febres são causadas por algum arbovírus precisamos estudar o sangue da pessoa.

Participando desta etapa sua família vai responder algumas perguntas (nome, idade, se tem febre, dores etc.). Depois, vamos coletar 3 gotas de sangue de cada pessoa da casa. Um dos dedos da mão será limpo com algodão e álcool, furado com uma lanceta estéril e as gotas de sangue serão absorvidas em um retângulo de papel de filtro. No momento da picada pode ocorrer dor e desconforto!

Retirar o sangue não causa riscos para a saúde! A participação de sua família é voluntária. O (a) Senhor (a) pode desistir a qualquer momento de participar, mesmo depois de ter retirado o sangue. Caso o (a) Senhor (a) ou sua família venham sofrer qualquer tipo de dano resultante da participação, que esteja previsto ou não neste termo, além do direito à assistência integral, o (a) Senhor (a) ou sua família tem direito a indenização.

Será feito um exame em busca de algum arbovírus no sangue. O exame vai ser entregue em uma das próximas visitas à Comunidade. O resultado do exame poderá ser mostrado a alguns médicos e pesquisadores, mas o nome da pessoas não será revelado.

Qualquer dúvida que o (a) Senhor (a) tiver pode perguntar a quem está te atendendo ou a pessoa responsável por este trabalho: Dr. Sérgio Luz nos telefones (92) 3621-2337 e (92) 3621-2401.

Eu, _____,
 declaro que após ter entendido o Termo de Consentimento aprovo a minha participação e de minha família neste projeto de pesquisa destinando uma amostra de sangue para análise.

LOCAL E DATA: Presidente Figueiredo, _____/_____/ 2007.

 Assinatura do Participante/Responsável

 Assinatura do Pesquisador

ANEXO IV – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Data da entrevista: ____ / ____ / 2007.

FICHA Nº.

Ramal: _____.

GPS: S _____ W _____

Nome: _____.

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____.

Idade: ____ anos.

Sexo: M [1] F [2]

Quando apresentou a última febre?

[1] de 1 a 7 dias [2] de 8 a 15 dias [3] mais de 15 dias [99] Não sabe

Era malária? [1] Não [2] Sim [99] Não sabe

Você já teve dengue? [1] NÃO [2] SIM Em que ano? _____.

Alguém já teve dengue na sua casa?

[1] NÃO [2] SIM Quem? _____ Em que ano? _____.

Existe alguém com febre na sua casa?

[1] NÃO [2] SIM Quem? _____.

Você foi vacinado contra a Febre Amarela?

[1] NÃO [2] SIM Em que ano? _____.

Está fazendo uso de algum medicamento?

[1] NÃO [2] SIM Qual? _____.

ANEXO V – INFORMAÇÕES DO BANCO DE DADOS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICOS

Fatores de Risco		Variáveis
Informações Individuais	Gênero	Masculino Feminino
	Faixa Etária	0-10 11-17 18-64 ≥ 65
	Relato de SFI com resultado negativo para malária	Sim Não
	Local de Residência (Unidade Geográfica)	UG-1 UG-2 UG-3 UG-4 UG-5 UG-6 UG-7
	Uso de freqüente de mosquiteiro	Sim Não
	Vacina contra a febre amarela	Sim Não
	Resultado sorológico	Positivo Negativo
Informações Coletivas	Local fechado que restringe o acesso à fossa	Sim Não
	Descarte dos dejetos do domicílio	Próprio Impróprio
	Reservatório de água próximo ao domicílio	Sim Não
	Presença de animais	Cachorro Gato Aves Porcos Gado