

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

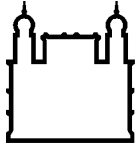
Doutorado em Medicina Tropical

***Arenavirus* no Brasil: eco-epidemiologia e os aspectos de sua ocorrência no
processo de expansão da agricultura familiar**

Jorlan Fernandes de Jesus

RIO DE JANEIRO

Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

Doutorado em Medicina Tropical

**Arenavirus no Brasil: eco-epidemiologia e os aspectos de sua ocorrência no
processo de expansão da agricultura familiar**

Jorlan Fernandes de Jesus

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de
concentração: Diagnóstico, epidemiologia e
controle de doenças infecciosas e parasitárias.**

ORIENTADOR: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

RIO DE JANEIRO

Março de 2018

Fernandes, Jorlan.

Arenavirus no Brasil: eco-epidemiologia e os aspectos de sua ocorrência no processo de expansão da agricultura familiar / Jorlan Fernandes. - Rio de Janeiro, 2018.

268 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Elba Regina Sampaio de Lemos.

Bibliografia: f. 1-254

1. Virologia. 2. Arenavírus. 3. Doenças transmitidas por roedores. 4. Febres Hemorrágicas virais. 5. Agricultura familiar. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

Doutorado em Medicina Tropical

**Arenavirus no Brasil: eco-epidemiologia e os aspectos de sua ocorrência no
processo de expansão da agricultura familiar**

Jorlan Fernandes de Jesus

ORIENTADOR: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Aprovado em: 05 / 03 / 2018

EXAMINADORES:

Dr. André dos Santos – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Jairo A. Méndez-Rico – Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) /
Organização Mundial de Saúde (OMS)

Dr. José Luis Passos Cordeiro – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dra. Nísia Trindade Lima (Presidente) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

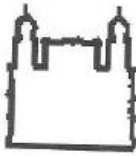
Dra. Sílvia Maria Baeta Cavalcanti (Revisor) – Universidade Federal Fluminense

Dra. Flávia Barreto dos Santos – (Suplente) – Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação
Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dra. Martha Cecília Suarez Mutis (Suplente) – Instituto Oswaldo Cruz (IOC) /
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

RIO DE JANEIRO

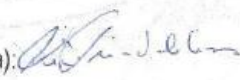
Março 2018




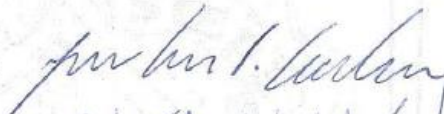
Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

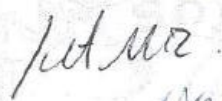
Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Jorlan Fernandes de Jesus**, sob orientação do Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos. Ao quinto dia do mês de março de dois mil e dezoito, realizou-se às treze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Arenavírus no Brasil: eco-epidemiologia e os aspectos de sua ocorrência no processo de expansão da agricultura familiar”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Nisia Verônica Trindade Lima - FIOCRUZ/RJ (Presidente), Dr^a. Silvia Maria Baeta Cavalcanti - UFF/RJ, Dr. José Luís Passos Cordeiro - FIOCRUZ/RJ, Dr. André Felipe Andrade dos Santos - UFRJ/RJ, Dr. Jairo Andrés Méndez Rico - OPAS e como suplentes: Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Flavia Barreto dos Santos - IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora a do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 05 de março de 2018


Dr^a. Nisia Verônica Trindade Lima (Presidente da Banca): 

Dr^a. Silvia Maria Baeta Cavalcanti (Membro da Banca): 

Dr. José Luís Passos Cordeiro (Membro da Banca): 

Dr. André Felipe Andrade dos Santos (Membro da Banca): 

Dr. Jairo Andrés Méndez Rico (Membro da Banca): 

Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora a do Programa): 

A todos que fizeram parte dessa jornada.

*“By appreciating the beauty of viruses, we can
better understand nature’s inventiveness”*

Carl Zimmer

AGRADECIMENTOS

À minha família que me apoiou e me deu forças para que esse, como muitos outros sonhos, pudesse se tornar realidade. Em especial, à minha esposa, Natália Lanzarini que, com todo seu amor, paciência e companherismo, sempre me apoiou e incentivou aguentando firme a distância e as saudades. Foi impossível não me apaixonar por você. Nada disso seria possível sem seu amor e seu apoio incondicionais.

Aos meus pais Maria Aparecida e Ezio. Minha mãe pelas lições diárias de bondade, dedicação ao próximo, humildade, carinho e respeito, seu amor não tem limites. Meu pai por me mostrar a importância do empenho e comprometimento com o trabalho.

À minha orientadora Dr^a Elba Lemos, que foi além do papel de orientadora. Dessa experiência eu levo muito mais do que conhecimento acadêmico, aprendi sobre profissionalismo, honestidade e comprometimento com os exemplos diários de sua dedicação aos seus alunos, colegas de trabalho, funcionários e principalmente com à saúde em todas as suas dimensões. Sua força de vontade, determinação e amor pelo que faz são um exemplo. Obrigado por fazer meus olhos brilharem.

À Renata Carvalho e a Alexandro Guterres, meus irmãos mais velhos, colegas de trabalho e conselheiros. Agradeço a dedicação, carinho e todo o tempo investidos para execução desse trabalho e com o autor do mesmo. Foram incontáveis conselhos, ajudas e enxugar de lágrimas. Esse trabalho é fruto da nossa paixão pelo o que fazemos e companherismo sem limites. Aprendo mais a cada dia compartilhado com vocês. Esse trabalho é nosso. Obrigado por tudo!

Ao Dr Roger Hewson, por acreditar nesse projeto e por se empenhar para que ele atingisse todo o seu potencial. À toda equipe do laboratório de Virologia e Patogênese do Public Health England, em especial John Chamberlain, Babak Afrough, Finn Wilson, Anitha Varghese e Dan Carter, pelo acolhimento e suporte durante os quatro meses na chuvosa Salisbury, Reino Unido.

Aos amigos Tatiana Rozental e Bernardo Teixeira, que foram primordiais na execução desse trabalho com seus conselhos e suporte durante a execução desse trabalho. Obrigado por toda ajuda e apoio ao longo dos anos. Junto com a Renata e o Alex vocês fizeram essa jornada ter um significado muito mais especial.

À Thayssa Alves, obrigado por toda ajuda e dedicação durante a execução das diferentes frentes desse trabalho. Seu apoio foi fundamental. Ter você como aluna foi um processo de aprendizagem mútuo e espero ter contribuído pelo menos um pouco para o seu futuro brilhante. Aos demais membros do LHR, a cada um de vocês muito obrigado por todos

esses 10 anos trabalhando juntos. Aos alunos Renata e Gabriel, obrigado por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às amigas Helena Medina, Lyana Lima e Thais Souza, foram quatro dissertações, três teses, três casamentos, uma sobrinha linda (Luana) e muitas histórias para contar. Cada risada, conselho e aventuras ficarão marcados para sempre. Essa jornada não seria a mesma sem vocês. Aos amigos Camila Faria, Juliana Wilhelmi e Luis Eduardo Gomes amigos de todas as horas. Ao amigo Alexandre Santos, que sempre disposto a embarcar nos mais diferentes projetos. Obrigado pela amizade.

Aos professores Namir Moreira, que me apresentou ao mundo da ciência e Jairo Barreira que me recebeu em sua sala de aula durante meu estágio docente na UNIRIO.

A todos colaboradores desse trabalho: Dr^a Silvana Levis do Instituto Nacional de Doenças Virais Humanas Dr. Júlio I. Maiztegui, Pergamino, Argentina pela parceria e doação de antígenos para realização deste projeto; Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios - IOC, em especial, à Dr^a Cibele Bonvicino e ao Dr Paulo D'Andrea pelo auxílio na captura e taxonomia dos animais desse estudo; Dr^a Sheila Araújo Teles (UFG), Dr^a Regina Maria Bringel (UFG), Dr^a Ana Rita Coimbra (UFMS), Dr^a Barbara Lago (IOC/UFMS), Dr. Cor Jesus Fernandes (UFMT), Dr^a Ana Cláudia Terças (UNEMAT), Alba Valéria (SES-MT), Dr. Marcelo Urbano (USP), Dr^a Monica da Silva Nunes (UFAC), Dr^a Cláudia Lamarca Vitral (UFF), Dr^a Jaqueline Mendes (IOC) e Dr Marcelo Alves Pinto (IOC) e suas instituições pela parceria e cessão de amostras humanas que compõe este trabalho.

A Ton Matos e a Joy Machs (Disturbiografia) pelas ilustrações que deram “vida” a nossa cartilha. Obrigado pela dedicação e atenção dadas ao nosso roteiro.

À Organização Pan America de Saúde pela colaboração e financiamento do trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Secretaria Acadêmica do Instituto Oswaldo Cruz e aos demais membros do corpo docente, muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao programa Brasil sem Miséria pelo apoio financeiro na realização do projeto.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO	1
1.1. Agricultura e doenças emergentes	1
1.2. Agricultura Familiar no Brasil	2
1.3. O Programa Brasil sem miséria e a agricultura familiar.....	4
1.4. Aspectos Viroológicos dos arenavírus.....	7
1.4.1. Morfologia e Organização Genômica	7
1.4.2. Classificação Taxonômica	9
1.4.3. Replicação	11
1.4.4. Relações Genéticas e Antigênicas.....	14
1.5. Febres Hemorrágicas Americanas	17
1.5.1. Transmissão.	18
1.5.2. Patogenia e Resposta Imunológica.	19
1.5.3. Febre Hemorrágica Argentina.....	22
1.5.4. Febre Hemorrágica Boliviana	30
1.5.5. Febre Hemorrágica Venezuelana	37
1.5.6. Febre Hemorrágica Brasileira	42
1.5.7. Febre Hemorrágica na Bolívia – Vírus Chapare	46
2- JUSTIFICATIVA.....	47
3- OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo Geral.....	49
3.2. Objetivos Específicos	49
4- MATERIAIS/MÉTODOS E RESULTADOS	51
4.1. Detecção e caracterização de mammarenavírus em animais silvestres	52
4.1.1. Artigo 1	53
4.1.2. Artigo 2	59
4.1.3 Artigo 3	68
4.1.3 Artigo 4	79
4.1.4. Artigo 5	91
4.1.6. Artigo 6	112

4.2. Estudos soroepidemiológicos em populações rurais.	123
4.2.1 Artigo 7	124
4.2.2. Artigo 8	127
4.2.3. Artigo 9	135
4.2.4. Artigo 10	147
4.3. Restituição de resultados e educação em saúde	153
4.3.1. Nota Informativa Mato Grosso	154
4.3.2. Alerta infecções por arenavírus nas Américas	158
4.3.3. Folder: <i>Como sei que tenho ratos em casa?</i>	166
4.3.4. Cartilha: <i>Orlandinho em: o enigma do rato</i>	169
5.DISSCUSSÃO	186
6.CONCLUSÕES	199
7.PERSPECTIVAS	201
8.REFERENCIAS	202
9. ANEXOS	231

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Quadro 1.1: Caracterização dos estabelecimentos agropecuários do Brasil em 2016.....	4
Figura 1.1: Estratégias de combate à extrema pobreza	5
Figura 1.2: Morfologia e estrutura do gênero <i>Arenavirus</i>	8
Figura 1.3: Esquema do ciclo de replicação dos arenavírus do Novo Mundo	12
Figura 1.4: Esquema representativo da estratégia <i>ambisense</i> dos <i>Arenavirus</i>	13
Figura 1.5: Ilustração das relações filogenéticas entre a nucleoproteína de espécies de arenavírus reconhecidas	15
Figura 1.6: Extensão progressiva da febre hemorrágica argentina.....	24
Figura 1.7: Febre hemorrágica argentina.....	25
Figura 1.8: Distribuição de casos de Febre Hemorrágica Argentina.....	30
Figura 1.9: Mapa da Bolívia	33
Figura 1.10: Casos de febre hemorrágica Boliviana.....	37
Figura 1.11: Roedor reservatório do vírus Guanarito: <i>Zygodonmys brevicauda</i>	39
Figura 1.12: Mapa da Venezuela destacando as áreas de risco para infecção pelo vírus Guanarito	41
Figura 4.1: Mapa do estado de São Paulo	44

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

%	Percentual
ALT	Alanina transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
CDC	<i>Center for Diseases Control</i> (Centro de Controle de Doenças)
cm ³	Centímetro cúbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EPI	Equipamento de proteção individual
EUA	Estados Unidos da América
G1	Glicoproteína 1
G2	Glicoproteína 2
HLA	Human Leucocyte Antigens
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodáltons
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministerio da Saúde
NP	Nucleoproteína
NB	Nível de segurança biológica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial de hidrogênio
PRNT	Neutralização por redução de placa
RdRp	RNA polimerase RNA dependente

RNPs	Ribonucleocapsídeos
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
A	Alfa
β	Beta
γ	Gama

RESUMO

Aproximadamente 84,4% dos estabelecimentos agropecuários do país são de agricultura familiar. No entanto, apesar de ser responsável por grande parte da produção de alimentos do Brasil, a agricultura familiar gera, em média, apenas 38% da receita dos estabelecimentos agropecuários do país. O Plano Brasil Sem Miséria possui estratégias específicas para essa população, com objetivo de fortalecer as atividades realizadas pelas famílias extremamente pobres da agricultura familiar, aumentando a sua capacidade produtiva e a entrada de seus produtos nos mercados consumidores. Neste contexto, os programas de incentivo à agricultura e à preservação ambiental devem ser atrelados à vigilância epidemiológica relacionada a zoonoses, como é o caso das arenaviroses. Arenavírus são responsáveis por causar graves doenças em humanos com altas taxas de letalidade. No Brasil, após a identificação do primeiro e único caso de febre hemorrágica brasileira, em 1990, nenhum estudo, até o momento, identificou o reservatório do vírus Sabiá. Considerando que o cenário de acelerada fragmentação estimulada pela agricultura foi o mesmo vivenciado em outros países com ocorrência de febres hemorrágicas por arenavírus e que este evento pode ser um fator determinante para a sua emergência, o presente estudo foi desenvolvido em três etapas distintas. A primeira, desenvolvida a partir da identificação de áreas de circulação de arenavírus em roedores silvestres de diferentes regiões do Brasil resultou na descrição de cinco arenavírus em oito diferentes espécies de roedores, com a caracterização de três novas espécies da família Arenaviridae que foram denominadas Aporé, Rio Preto e Xapuri. Co-infecção de mamarenavírus e hantavírus foi detectada no roedor da espécie *Oligoryzomys mottogrossae*, mas nenhum evento de *spillover* foi observado entre os roedores incluídos no estudo. A segunda etapa foi constituída por um inquérito sorológico para detecção de infecção por mamarenavírus em 1.099 amostras de soro de diferentes populações rurais, nos estados do Acre, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Uma prevalência total de 1,63% foi encontrada, variando de 0,64% a 2,91 %, com presença de indivíduos reativos em todas as localidades estudadas. A terceira etapa do estudo foi pautada na divulgação de resultados para órgãos de vigilância em saúde com a produção de duas notas técnicas alertando sobre a necessidade da intensificação da vigilância epidemiológica das infecções por arenavírus. Foram também gerados, com foco na prevenção das arenaviroses, um folder e uma cartilha bilíngue ilustrada voltada para o público infanto-juvenil, visando à propagação do conhecimento e apoio à instituição de um sistema de vigilância nas regiões comprovadamente com mamarenavírus circulantes, em conjunto com as ações previamente instituídas pelos diferentes programas relacionados com a agricultura familiar e com o combate à pobreza.

ABSTRACT

Approximately 84.4% of agricultural establishments in the country are family farmers. However, despite being responsible for much of Brazil's food production, family farm generates, on average, only 38% of the income of agricultural establishments in the country. The “*Brasil sem Miséria*” program has specific strategies to help this population, with the objective of strengthening activities developed by extremely poor families, increasing their productive capacity and increasing their products sales in the consumer markets. In this context, programs that incentive agriculture and environmental preservation should be linked to epidemiological surveillance systems related to zoonosis, as arenaviruses. Arenaviruses are responsible for causing diseases in humans with high lethality rates. In Brazil, after the identification of the first and only case of Brazilian hemorrhagic fever in 1990, no study has so far identified the animal reservoir of Sabiá virus. The present study was developed in three distinct stages. The first one, identification of arenavirus circulation in wild rodents from different regions of Brazil, resulted in the description of five arenaviruses in eight different rodent species, with the characterization of three new species of the *Arenaviridae* family tentatively named Aporé, Rio Preto and Xapuri viruses. Co-infection of mammarenavirus and hantavirus was detected in *Oligoryzomys mattogrossae* rodents, but no mammarenavirus spillover event was observed in rodents included on the study. The second stage consisted of a serological survey to detect infection by mammarenavirus in 1,099 serum samples from different rural populations from Acre, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul states. An overall prevalence of 1.63% was found, ranging from 0.64% to 2.91%. The presence of reactivity was found in all the studied localities. The third stage was the dissemination of results to health surveillance agencies with a warning about the need for epidemiological surveillance intensification concerning arenavirus infections. Focusing on prevention of arenaviruses and other rodent-borne diseases, a folder and an illustrated bilingual booklet for children were produced, aiming to the spread of knowledge and support to implementation of a surveillance system in regions of conformed mammarenaviruses circulation, in conjunction with the actions previously instituted by different programs related to family farming and rural poverty in Brazil.

1- INTRODUÇÃO

1.1. AGRICULTURA E DOENÇAS EMERGENTES

Os agentes infecciosos emergentes, além dos impactos significativos na flora e fauna nativas, apresentam grande potencial de causar perdas para a indústria agrícola, representando, assim, um imenso desafio para a economia e para os sistemas de saúde tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Jones et al. 2008). Os fatores relacionados ao aumento aparente do número de agentes infecciosos associados com doenças infecciosas emergentes (DIE) vêm sendo amplamente documentados, apontando como prováveis causas, as mudanças climáticas e ambientais, sistemas agrícolas cada vez mais centralizados e um transporte global rápido, bem como altas densidades populacionais humanas e animais (Kelly et al. 2017, Woolhouse & Ashworth 2017). A confluência desses fatores levou ao surgimento de uma série de infecções virais nos últimos 40 anos, incluindo a contínua epidemia mundial do vírus da imunodeficiência humana (HIV), além daquelas causadas pelo vírus da gripe pandêmica A, como H1N1/09, MERS e SARS Coronavírus (CoV) e os surtos mais recentes do vírus Ebola na África Ocidental e do vírus Zika nas Américas (Taubenberger & Kash 2010, Geoghegan & Holmes 2017).

Uma análise realizada com todos os patógenos reconhecidos como agentes etiológicos de doença em humanos revelou que 58% das espécies possuem origem zoonóticas, das quais 73% são zoonoses (Cleaveland et al. 2001, Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005, Jones et al. 2013). Um estudo semelhante desmonstrou que 26% dos agentes patogênicos humanos também são capazes de infectar animais domésticos e selvagens (Cleaveland et al. 2001). Pelo menos 70% dessas zoonoses são mantidas em ciclos silvestres e as infecções em novos hospedeiros, assim como a sua expansão geográfica são, geralmente, uma resposta natural à pressão exercida pelo ambiente (Harper & Armelagos 2010). Embora tanto animais silvestres quanto animais domésticos possam ser considerados fontes importantes das DIE, é a influência antropogênica sobre sistemas ecológicos que determina o risco da emergência de doenças zoonóticas, principalmente na interface entre humanos e animais (Jones et al. 2013).

Estudos teóricos voltados para avaliar a previsibilidade de eventos de emergência têm como objetivo abranger as complexidades da dinâmica de aptidão evolutiva inter e intra-hospedeiro, nas quais as paisagens físicas desempenham um papel central na determinação da probabilidade de emergência (van den Hurk et al. 2009). Neste contexto, van den Hurk e colaboradores têm apontado que áreas de maior risco estão localizadas nas regiões onde há maior interface entre humanos e animais, na presença de (i) importantes alterações no uso da

terra, particularmente as relacionadas com a invasão humana em áreas florestais durante o desmatamento, (ii) exposição ocupacional a animais silvestres, domésticos ou de produção e (iii) mudanças na demografia humana, comportamento e instabilidade política que resultam em deslocamento da população (Perry et al. 2011).

Dentre essas áreas mencionadas acima se destaca a interface agrícola/florestal que desde o tempo pré-histórico, em decorrência das atividades humanas sobre o ambiente, vem sofrendo frequentes mudanças, com grande impacto na disseminação de doenças associadas a uma contínua distribuição espacial e adaptação dos patógenos (Morse 1995). Assim, o surgimento de doenças contagiosas humanas, muitas das quais de origem animal, foram decorrentes da mudança do pequeno caçador-coletor para grandes comunidades agrícolas e que posteriormente, foram também associadas às viagens intercontinentais e à colonização, com a introdução de doenças em diversas populações suscetíveis (Mathews 2009). Apesar da redução da carga de doenças infecciosas no século XX decorrente da melhoria da nutrição e da higiene, da disponibilidade de vacinas e de antimicrobianos, nas últimas décadas tem se observado um aumento do risco de emergência de doenças e do potencial de pandemias consequente, entre outros fatores, à expansão das populações humanas, de seu comportamento e da atividade agropecuária crescente (Goldberg et al. 2008, Vora 2008, Jones et al. 2013).

Em relação à atividade agrícola, a sua contínua expansão tem promovido uma crescente utilização de terras, com invasão de habitats de vida selvagem, gerando mudanças nos ecossistemas, possibilitando uma maior interação da população humana e de animais de companhia com o ambiente silvestre (Jones et al. 2013). Esta maior intensidade de interação tem facilitado a transmissão de patógenos, silvestres ou desconhecidos, para animais ou humanos com o surgimento e consequente estabelecimento de novos ciclos de transmissão (Pfeffer & Dobler 2010). Assim, neste mesmo contexto, as mudanças ambientais antropogênicas decorrentes de assentamentos e da agricultura, incluindo fragmentação do habitat, desmatamento e substituição da vegetação natural pelas plantações têm alterado a estrutura da população silvestre e os padrões de migração com redução da biodiversidade, gerando consequentemente ambientes favoráveis a hospedeiros, vetores e/ou patógenos específicos (Despommier et al. 2008).

1.2. AGRICULTURA FAMILIAR NO BRASIL

A agricultura familiar é uma das principais atividades geradoras de novas fontes de trabalho na América Latina e no Caribe, segundo o relatório elaborado pela Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (CEPAL). Na América do Sul, nos países

analisados, a participação da atividade nos empregos agrícolas é significativa, oscilando entre 53% a 77% na Argentina e no Brasil, respectivamente (Landini & Bianqui 2014, Belik 2015).

Segundo a constituição brasileira, Lei nº 11.326 de julho de 2006, considera-se agricultor familiar todo aquele que desenvolve atividades econômicas no meio rural e que atende alguns requisitos básicos, tais como: (i) não possuir propriedade rural maior que quatro módulos fiscais (o módulo fiscal é uma unidade territorial agrária, fixada por cada município brasileiro que pode variar de 5 a 100 hectares, conforme o município), (ii) utilizar, predominantemente, mão de obra da própria família nas atividades econômicas da propriedade; e (iii) possuir a maior parte da renda familiar proveniente das atividades agropecuárias desenvolvidas no estabelecimento rural (Brasil 2006, França et al. 2009).

É importante ressaltar que a agricultura familiar no Brasil é um conjunto plural formado pela pequena e média propriedade, assentamentos de reforma agrária e as comunidades rurais tradicionais - extrativistas, pescadores, ribeirinhos, quilombolas e indígenas. Caracterizada assim, por uma diversidade de raças, etnias, povos, religiões, culturas, sistemas de produções e padrões tecnológicos, segmentos sociais e econômicos, de ecossistemas e de uma rica biodiversidade (Wanderley 2014).

No ano de 2006, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) realizou o censo agropecuário brasileiro, no qual foi verificado que, aproximadamente, 84,4% dos estabelecimentos agropecuários do país são da agricultura familiar (Landini & Bianqui 2014). Em termos absolutos, são 4,36 milhões de estabelecimentos agropecuários e, apesar disso, a agricultura familiar gera 38% da receita dos estabelecimentos agropecuários nacionais, empregando em torno de 74% dos trabalhadores agropecuários do país, o que revela uma concentração fundiária e uma distribuição desigual de terras e renda no Brasil (Kamimura et al. 2010, Guanzioli et al. 2012) Esses dados exemplificam a desigualdade entre trabalho e renda, vivenciado pelas famílias que exercem esse tipo de atividade (Quadro 1.1). Apesar do cultivo ser realizado em uma área menor com lavouras e pastagens, 17,7 e 36,4 milhões de hectares, respectivamente, a agricultura familiar é responsável por garantir boa parte da segurança alimentar do país, como importante fornecedora de alimentos para o mercado interno (Schneider & Cassol, 2014).

Quadro 1.1. Caracterização dos estabelecimentos agropecuários do Brasil em 2006.

CARACTERÍSTICA	AGRICULTURA FAMILIAR		AGRICULTURA NÃO FAMILIAR	
	Nº	%	Nº	%
Número de estabelecimentos	4.367.902	84	807.587	16
Área (<i>milhões de hectares</i>)	80.3	24	249.7	76
Mão de Obra (<i>milhões de pessoas</i>)	12.3	74	4.2	26
Valor da produção (<i>R\$ bilhões</i>)	54.4	38	89.5	62
Receita (<i>R\$ bilhões</i>)	41.3	34	80.5	66

Fonte: França et al. 2009.

A participação da agricultura familiar se destaca na produção nacional de algumas culturas: 87% mandioca, 70% feijão, 46% do milho, 38% do café, 34% do arroz, 58% do leite (composta por 58% do leite de vaca e 67% do leite de cabra), 59% do plantel de suínos, 50% do de aves, 30% dos bovinos, e 21% do trigo (França et al. 2009, Guanziroli et al. 2012). A cultura com menor participação da agricultura familiar é a de soja (16%), um dos principais produtos da pauta de exportação brasileira. Apesar disso, a agricultura familiar gera, em média, como informado previamente, apenas 38% da receita dos estabelecimentos agropecuários do Brasil, empregando em torno de 74% dos trabalhadores agropecuários do país (Sabourin 2007). Na tentativa de diminuir esse tipo de desigualdade e estimular mais famílias a participarem, existem diferentes programas de auxílio e incentivo a essas atividades.

1.3. O PROGRAMA BRASIL SEM MISÉRIA E A AGRICULTURA FAMILIAR

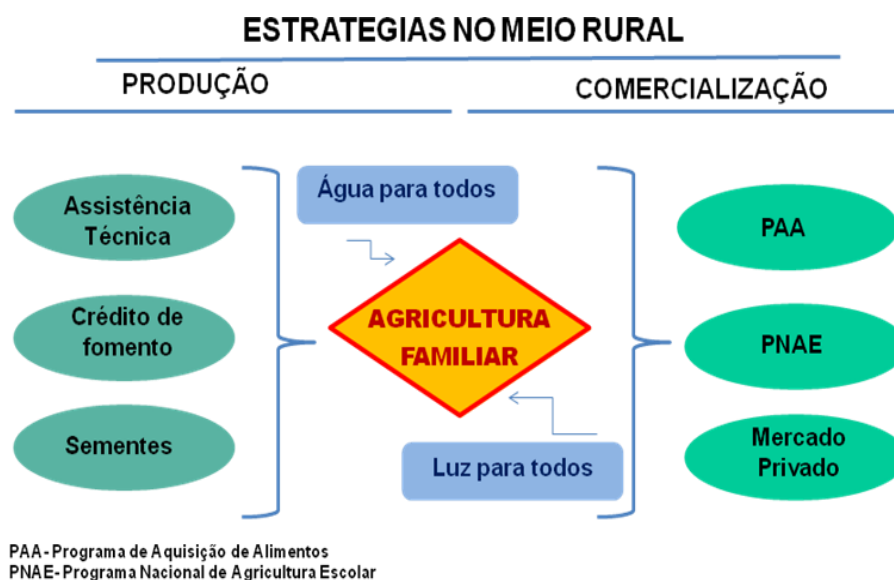
A alta incidência de pobreza no meio rural exigiu a formulação de estratégias específicas capazes de reconhecer e incorporar em suas ações, a diversidade social e econômica existente no campo. Para isso, o Plano Brasil sem Miséria (PBSM) articulou as informações do Cadastro Único para Programas Sociais do Governo Federal com as bases de dados de outros programas voltados ao atendimento da população rural, permitindo assim compreender o perfil das famílias mais pobres do país e reorientar a ação dos programas de apoio à estruturação produtiva dos agricultores familiares (Campelo et al. 2014).

As principais dificuldades dos agricultores mais pobres estão centradas, de um lado, na falta de apoio técnico para qualificar, aperfeiçoar ou mesmo dar início a suas atividades produtivas e, por outro lado, na escassez de recursos para investir na melhoria da sua produção (Falcão et al. 2014). Dessa forma, para aprimorar o processo produtivo das famílias mais pobres, foi criado no âmbito do PBSM, o Programa de Fomento às Atividades

Produtivas Rurais (PFAPR), em que os agricultores recebem acompanhamento individualizado e continuado de técnicos agrícolas, que compartilham seus conhecimentos sobre formas de aumentar a produção, a qualidade e o valor dos produtos (Mello et al. 2014).

Ao lado da garantia de renda e do acesso a serviços públicos, a inclusão produtiva representa um dos três eixos que compõem o PBSM. Esse eixo tem como objetivo propiciar o acesso da população em extrema pobreza a oportunidades de ocupação e renda com estratégias diferenciadas para o meio rural (Campelo et al. 2014, Mello et al. 2014). A sua finalidade é fortalecer as atividades realizadas pelas famílias extremamente pobres da agricultura familiar, aumentando a sua capacidade produtiva e a entrada de seus produtos nos mercados consumidores, a partir da orientação e do acompanhamento técnico, com oferta de insumos, água e acesso à eletricidade como demonstrado na Figura 1.1.

No eixo produtivo podemos destacar o programa de assistência técnica e extensão rural (Ater), um serviço de educação não formal em que agentes capacitados auxiliam agricultores familiares, quilombolas, indígenas, extrativistas e pescadores artesanais para que melhorem suas atividades produtivas. O agente da Ater acompanha a família durante a implementação do projeto, para que ele seja executado da melhor forma possível, podendo orientá-la inclusive quanto às formas de comercializar os excedentes (Campos et al. 2014).



Fonte: modificado de <http://www.brasilsemiseria.gov.br/inclusao-produtiva/inclusao-produtiva-rural>

Figura 1.1 – Estratégias de combate à extrema pobreza no meio rural, segundo o Ministério do Desenvolvimento Social e Combate a Fome (MDS), Ano 2014.

Até outubro de 2014, o programa de crédito de fomento tinha beneficiado 131 mil famílias, com aproximadamente R\$ 344 milhões de reais empenhados. Com este programa

cada família recebe R\$ 2,4 mil, divididos em duas parcelas. Os recursos não são reembolsáveis e as famílias só recebem a segunda parcela após cumprimento das etapas de desenvolvimento previstas no projeto. Os recursos podem ser usados na compra de insumos e equipamentos, como sementes, adubos, ferramentas e matrizes de animais, ou na contratação de pequenos serviços necessários à implantação do projeto (Barreto 2014).

Um dos principais canais de comercialização dos produtos da agricultura familiar é o Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), que desde 2003, compra a produção de agricultores familiares sem necessidade de licitação. Um dos maiores desafios enfrentados pela estratégia de inclusão produtiva rural é fazer com que parte de seu excedente possa ser comercializado. Para que isso fosse possível, o PAA, mesmo sendo um programa já consolidado, passou por uma série de alterações visando seu aperfeiçoamento. No âmbito do PBSM pode-se ressaltar a ampliação do percentual de participação dos mais pobres nas vendas ao PAA. Enquanto em 2010, essa taxa era de 32 %, de 2011 a 2013, cerca da metade (50%) dos produtos do PAA foram comprados de agricultores familiares (Singer et al. 2014).

Para aperfeiçoar ainda mais o PAA, em 2012 foi criada uma nova modalidade chamada Compra Institucional, que ampliou as possibilidades de mercado para a agricultura familiar ao permitir que governo federal, estados e municípios comprassem sem a necessidade de licitação a produção dos pequenos produtores para abastecer equipamentos públicos como universidades, hospitais, quartéis e penitenciárias. Só nesta modalidade já foram investidos, em menos de dois anos, cerca de R\$ 41 milhões, distribuídos entre União, estados e municípios. Os principais produtos adquiridos são itens de horti-fruti, grãos, laticínios e orgânicos (Barreto 2014).

Todas essas iniciativas, somadas à experiência já consolidada do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), melhoraram a qualidade da alimentação nas escolas e nas demais instituições públicas que receberam os alimentos comprados pelo PAA, e ainda promoveram a diversificação e qualificação da oferta de produtos da agricultura familiar. Isso viabilizou o acesso desses agricultores ao mercado institucional e privado, cujas compras o PBSM tem continuamente estimulado (Mello et al. 2014).

Uma das inovações mais recentes do PBSM foi a criação do Programa Bolsa Verde (PBV), programa que atende famílias de extrativistas, assentados e ribeirinhos que desenvolvem atividades sustentáveis em áreas com relevantes ativos ambientais e que estariam em extrema pobreza se não participassem do Programa Bolsa Família (PBF). Coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente, o PBV pretende promover a melhoria das condições de vida e a elevação de renda dessas populações, ao mesmo tempo em que incentiva a conservação dos ecossistemas (Cabral et al 2014).

As famílias que fazem parte do PBV recebem transferências trimestrais no valor de R\$300,00 por um período de dois anos, que pode ser prorrogado. Como contrapartida ao recebimento do benefício do PBV, as famílias se comprometem a manter a cobertura vegetal e a fazer uso sustentável dos recursos naturais das áreas onde vivem. O PBV beneficia famílias em praticamente todos os biomas e estados brasileiros, tendo atendido, até novembro de 2014, 69,7 mil famílias distribuídas em 68 Unidades de Conservação, 876 Projetos de Assentamento e 64 municípios com áreas ribeirinhas (Cabral et al. 2014).

Uma frente importante do PBSM foi direcionada aos assentados da reforma agrária e às famílias acampadas que demandam atendimento pelo Programa Nacional de Reforma Agrária (PNRA) do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (Incra). No caso dos acampados, as ações estiveram centradas no eixo garantia de renda, com a inclusão das famílias no PBF, além de ações voltadas para a segurança alimentar nutricional, como a distribuição de alimentos. Já em relação aos assentados, em função de serem detentores de terras para produzir, a lógica das ações guardava semelhança com as ações de inclusão produtiva voltada para o público tradicional da agricultura familiar, embora com algumas especificidades. Consideradas todas as ações de inclusão produtiva rural do PBSM, foram investidos R\$ 10 bilhões de reais desde 2011 nas regiões e na produção dos agricultores familiares mais pobres, impactando não só nas condições de vida dessas famílias, mas também na economia de regiões de baixo dinamismo (Guedes et al. 2014).

Cabe destacar neste contexto, que os programas de incentivo à agricultura e à preservação ambiental devem ser atrelados a uma intensificação da vigilância epidemiológica relacionada a zoonoses, devido à maior probabilidade do contato desses indivíduos com os animais infectados em ambientes fragmentados, geralmente na interface agrícola/rural (Cabello & Cabello 2008). Assim, passa a ser imprescindível considerar que a agricultura familiar tem um impacto direto na dinâmica de transmissão das doenças transmitidas por roedores, como é o caso das arenavirose, se adequando a necessidade de intensificar as ações de apoio à estruturação produtiva de povos e comunidades tradicionais, respeitando suas especificidades culturais, produtivas e sociais.

1.4. ASPECTOS VIROLÓGICOS DOS ARENAVÍRUS

1.4.1. Morfologia e Organização Genômica

Os arenavírus são vírus esféricos ou pleomórficos de aparência “arenosa”, com um diâmetro que varia de 50 - 300 nm e que possuem um genoma de RNA fita simples bi-

segmentado de polaridade negativa (Figura 1.2) (Murphy et al. 1970, Radoshitzky et al. 2015). Os segmentos possuem aproximadamente 3.5 kb e 7.2 kb, com o menor e o maior segmento denominados, respectivamente, S (*small*) e L (*large*), que se encontram envolvidos por uma bicamada lipídica derivada da membrana das células hospedeiras. As extremidades 5' e 3' de ambos os segmentos possuem regiões não codificantes (UTR – *untranslated region*) que contêm cerca de 19 a 30 nucleótidos conservados de complementariedade reversa em cada extremidade (Charrel et al. 2002, 2003). Essas terminações conferem uma estrutura *panhandle* a partir do pareamento das bases (Harnish et al. 1993). O segmento S codifica para nucleoproteína (NP) e para o precursor de glicoproteínas (GPC), que é clivado secundariamente nas proteínas do envelope GP1 e GP2 e o peptídeo de sinal estável (SSP – *stable signal peptide*). A RNA polimerase RNA dependente (RpRd ou proteína L) e a proteína de matriz ligada ao zinco (proteína Z) são codificadas pelo segmento L dos arenavírus (Meyer & Southern 1994, López et al. 2000).

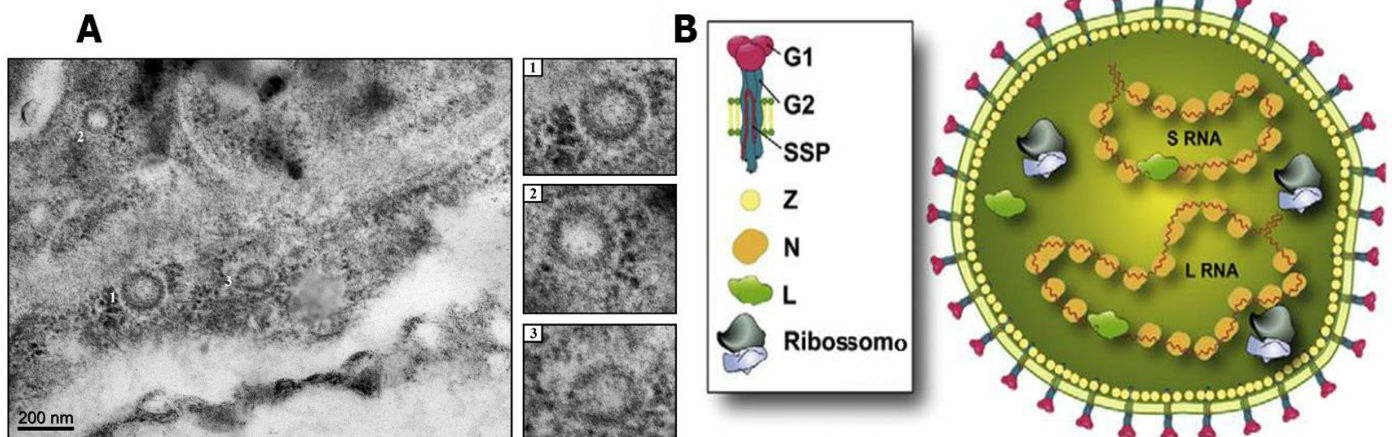


Figura 1.2. Morfologia e estrutura do gênero *Arenavirus*. (A) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas do vírus Latino (70 - 100 nm) em amostras de pulmão de roedor *Calomys callidus*. (B) Ilustração esquemática do gênero *Arenavirus* (Rodas & Salvato 2006, Gomez et al. 2011, Fernandes et al. 2017).

Projeções de 8 a 10nm de comprimento, compostas pelas duas glicoproteínas (GP) virais, GP1 (40-64 kDa) e GP2 (35-44 kDa) se encontram incorporadas à bicamada lipídica. A proteína GP1 é um tetrâmero que forma a cabeça da projeção, enquanto que o tetrâmero GP2 forma a haste ancorada na membrana do envelope viral (Figura 1.2). O SSP (5 kDa) desempenha um papel crucial no tráfico das glicoproteínas através da via secretora e é o único

componente que se mantém estavelmente associado ao complexo GP, após a clivagem pela peptidase (Eichler et al. 2003, 2004, York & Nunberg 2006).

A proteína viral mais abundante, a NP que possui cerca de 70 kDa, está associada ao RNA genômico em estruturas circulares formando o nucleocapsídeo. A RpRd (200-250 kDa), possui uma atividade de transcriptase e replicase e também está associada ao nucleocapsídeo (Iwasaki et al. 2015). A proteína Z (10-14 kDa), uma pequena proteína estrutural com um domínio de ligação de zinco (*RING finger motif*), se liga com a polimerase viral e inibe a transcrição e a replicação (Meyer & Southern 1994, Meyer et al. 2002, Shtanko et al. 2010). Os grânulos elétron-densos que fornecem aos arenavírus sua aparência de “areia” foram identificados como sendo os ribossomos das células hospedeiras, cuja função ainda não está definida (Murphy et al. 1970, Charrel et al. 2002).

1.4.2. Classificação Taxonômica

O protótipo dos arenavírus, o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), foi identificado, praticamente, ao mesmo tempo por três grupos de pesquisa distintos, na década de 1930 (Armstrong & Lillie 1934, Rivers & Scott 1936, Traub 1936). Nas décadas seguintes diversos vírus relacionados foram detectados em animais, a maioria em roedores e humanos, especialmente no continente americano (King et al. 2011, Radoshitzky et al. 2015).

No ano de 1970, Rowe e colaboradores propuseram o nome desta “nova” família viral com base no aspecto dos grânulos visualizados nas partículas virais em seções ultrafinas (*arenosus* = arenoso em latim). Originalmente proposto como *Arenovirus*, em decorrência da possibilidade de confusão com os adenovírus, o nome foi posteriormente alterado para *Arenavirus* (*arena* = areia em latim) (Rowe et al. 1970).

De acordo com o 9º relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) os critérios para definição de espécie de arenavírus são: (1) associação com uma espécie de hospedeiro específica ou um grupo de espécies interrelacionadas; (2) estar presente em uma área geográfica definida; (3) ser agente etiológico (ou não) de doença em seres humanos; (4) possuir diferença significativa na reatividade antigênica cruzada, incluindo os testes de neutralização cruzada, quando aplicáveis, e (5) possuir diferença significativa nas sequências nucleotídicas quando comparado com as demais espécies incluídas no gênero; para este último critério, as fronteiras entre espécies não são claramente determinadas (King et al. 2011, Salvato et al. 2005a). Atualmente o ICTV reconhece 36 espécies dentro da família *Arenaviridae*, divididas em dois

gêneros *Mammarenavirus* (33 espécies) e *Reptarenavirus* (três espécies) (Quadro suplementar 1.1).

Assim, um novo isolado será considerado uma nova espécie se não existir compartilhamento de quatro ou cinco características comuns com os demais membros do gênero, enquanto que uma espécie “tentativa” será proposta se o isolado apresentar no mínimo duas diferenças com qualquer outro arenavírus (Salvato et al. 2005a). No entanto, o cumprimento desses critérios nem sempre é possível, já que nem todas as espécies descritas se enquadram nos critérios acima mencionados. Alguns arenavírus foram isolados apenas de pacientes humanos, o que impossibilita a identificação do hospedeiro do vírus, como é o caso do vírus Sabiá e, posteriormente, dos vírus Chapare e Lujo (Coimbra et al. 1994, Delgado et al. 2008, Briese et al. 2009). Além disso, a reatividade antigênica cruzada de um novo isolado pode ser difícil de determinar, uma vez que requer infra-estrutura laboratorial e instalações para trabalho em condições de nível de biossegurança 4 (NB-4) para a manipulação de isolados de diferentes arenavírus para fins comparativos (Emonet et al. 2009).

Essas dificuldades levaram os diferentes grupos a adotarem critérios genéticos para definir novas espécies da família *Arenaviridae*. Bowen e colaboradores (2000) propuseram o uso de um valor de corte utilizando uma distância p não corrigida de 12% de aminoácidos da NP. A justificativa se baseia no fato de que essa é a maior distância intra-espécie relatada e a menor distância interespecies entre os arenavírus. Vale ressaltar que esse critério foi projetado para sequências completas da NP. Apesar da possibilidade de definir valores de cortes distintos para as diferentes espécies e linhagens já descritas, no presente momento, com o aumento do número de sequências disponíveis nos bancos de dados, alguns desses critérios se tornam obsoletos (Charrel & de Lamballerie 2010, Zapata & Salvato 2013, Radoshitzky et al. 2015). Portanto, em vez de propor valores de corte, alguns autores preferem recomendar uma investigação da diversidade genética das sequências homólogas entre espécies mais próximas e o uso desta informação em conjunto com outros critérios propostos pelo ICTV para desenvolver a classificação taxonômica de vírus recém-descobertos, respeitando suas especificidades (Charrel et al. 2008, Emonet et al. 2009).

Novas ferramentas têm sido propostas para o uso da classificação baseada em sequências genômicas virais, como o *PAirwise Sequence Comparison* (PASC), de acesso grátis pelo Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*), *DivErsity pArtitioning by hieRarchicalClustering* (DeMARC) ou *Species Demarcation Tool* (SDT) (Bao et al. 2008, Lauber & Gorbalenya 2012, Muhire et al. 2013). Estas ferramentas têm gerado resultados concordantes com a diversidade de arenavírus deduzida a partir de análises filogenéticas e com as características biológicas individuais dos

diferentes arenavírus (Radoshitzky et al. 2015). Tais características incluem: diferenças na especificidade do hospedeiro e, portanto, distribuição geográfica, reações sorológicas cruzadas, e a capacidade de causar doenças em humanos, citadas anteriormente.

A análise PASC tem se mostrado a mais acurada, pois ela cria histogramas para visualização das distâncias entre diferentes sequências, resultando em picos que podem representar diferentes níveis taxonômicos. As percentagens dos pontos mais baixos entre os picos ajudam a orientar a demarcação de táxons dentro de um determinado grupo de sequências (Bao et al. 2014, Radoshitzky et al. 2015). Utilizando o PASC, vários pontos de corte alternativos podem ser escolhidos para a demarcação de espécies da família *Arenaviridae*. O ICTV sugere que a abordagem mais conservadora seja tomada, ou seja, que esses valores devam ser escolhidos para proporcionar o menor número de mudanças e causar o mínimo de mudanças no esquema atual de classificação dos arenavírus. O corte de separação de gênero pelo PASC foi, portanto, ajustado para 29-40% para o segmento S, e para 30-35% para o segmento L. Conseqüentemente, 80% de identidade de sequência de nucleotídeos no segmento S e 76% de identidade no segmento L foram escolhidas como valores para arenavírus que deveriam pertencer à mesma espécie (Radoshitzky et al. 2015).

Apesar de uma importante ferramenta, o PASC ou métodos similares por si só não podem necessariamente justificar a classificação das espécies e assim, sempre que possível, outros critérios devem ser considerados para confirmar ou rejeitar os resultados da análise. Esses critérios de classificação das espécies incluem aquelas citadas no 9º relatório do ICTV (King et al. 2011).

1.4.3. Replicação

Os arenavírus possuem um ciclo de replicação restrito ao citoplasma da célula. Cada segmento de RNA genômico utiliza uma estratégia de codificação *ambisense* para a síntese de dois polipeptídios em orientações opostas, separados por uma região intergênica não codificante (IGR – *intergenic region*) que forma uma estrutura estável, semelhante a um grampo de cabelo (Figura 1.3) (Meyer et al. 2002, Buchmeier et al. 2007, Kiening et al. 2017). Os mRNAs virais são não poliadenilados e possuem um número extra de nucleotídeos não “*templates*” nas extremidades 3’ e um “*Cap*” nas suas extremidades 5’. O mapeamento de diversas regiões da IGR levou à proposta de que estas servem como um autêntico sinal de término da transcrição, fato que foi confirmado por estudos utilizando a tecnologia genética reversa (Meyer & Southern 1994, Tortorici et al. 2001, López & Franze-Fernández 2007, Qi et al. 2010).

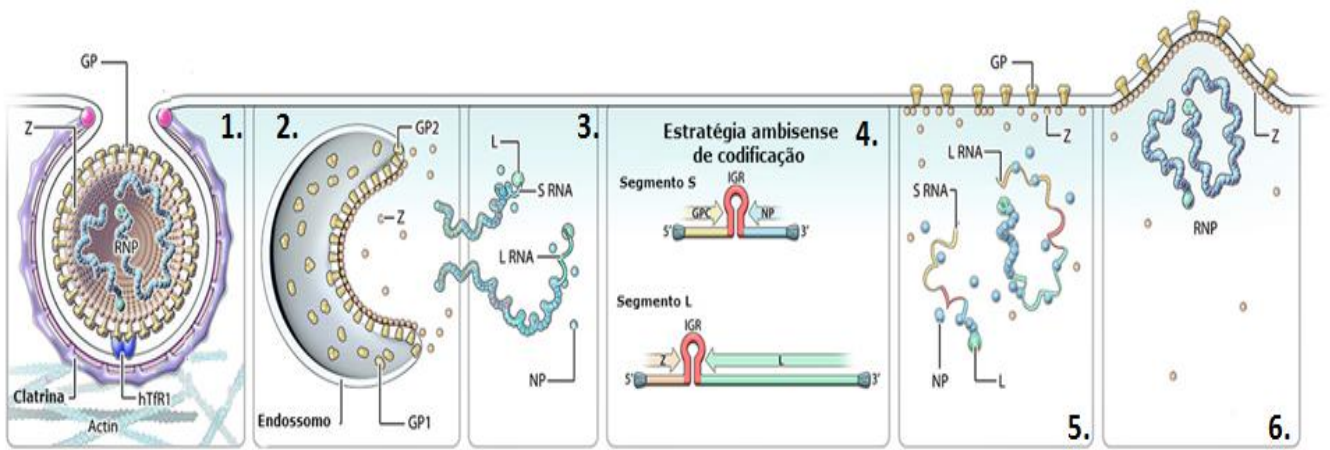


Figura 1.3. Esquema do ciclo de replicação dos arenavírus do Novo Mundo, (1) Aaglicoproteína 1 (GP1) interage com o receptor de transferrina humana 1 (hTfR1) - o vírus é internalizado pela célula por endocitose mediada por clatrina; (2) fusão entre o vírus e o endossomo - mediado pela GP2 com liberação da GP1; (3) desnudamento;(4) transcrição, tradução e replicação dos dois segmentos genômico;(5) montagem da partícula viral e (6) morfogênese e egresso do vírus da célula por brotamento (Radoshitzky et al. 2012).

A projeção GP1 está localizada na parte superior da partícula viral e é responsável por mediar interação dos arenavírus com os receptores de superfície das células alvo. O receptor celular para os vírus LCM e Lassa é o α -dístroglicano (α -DG), uma glicoproteína que liga a célula à matrix extracelular (Cao et al. 1998, Spiropoulou et al. 2002). Recentemente as famílias TAM (Axl e Tyro3), lectina tipo C (DC-SIGN e LSECtin), a proteína transmembranar neuropilina 2 (NRP2 - *transmembrane protein neuropilin 2*) e a tetraspanina CD63 também foram caracterizadas como receptores para os vírus Lassa e Lujo, respectivamente (Shimojima & Kawaoka 2012, Raaben et al. 2017). Após a ligação inicial à célula alvo, os arenavírus do Velho Mundo (VM) e os membros da Clade C do Novo Mundo (NM), que caracteristicamente não estão associados com clatrina, são envolvidos por vesículas de parede lisa (Borrow & Oldstone 1994). Em contraste, os arenavírus da Clade B do NM podem utilizar o receptor de transferrina humana 1 (hTfR1) como receptor celular (Radoshitzky et al. 2007) e a endocitose parece ser dependente de clatrina (Martinez et al. 2007). A fusão entre as membranas viral e celular é desencadeada pela acidificação do ambiente do endossoma, o que parece alterar a conformação das GPs dos arenavírus, expondo um peptídeo fusogênico (Castilla et al. 1994, Di Simone et al. 1994, Di Simone & Buchmeier

1995, York & Nunberg 2006), evento que auxilia a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (Gallaher et al. 2001, Eschli et al. 2006).

Após liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula infectada, a polimerase viral inicia os processos biossintéticos envolvidos na replicação do RNA e na transcrição gênica (Figura 1.4). A transcrição primária se inicia na região promotora do genoma localizada na extremidade 3', resultando na síntese dos mRNA da NP e da proteína L do segmentos S e L, respectivamente (López et al. 2001). Posteriormente, a polimerase viral pode adotar a função de replicase se movendo através da IGR para gerar uma cópia antígenoma da molécula RNA (agRNA). Este agRNA servirá como molde para a síntese dos mRNAs das proteínas GPC (segmento S) e Z (segmento L). As moléculas de agRNA vão servir também como moldes para a amplificação de RNA correspondentes ao genoma dos arenavírus (Buchmeier et al. 2007, Emonet et al. 2009).

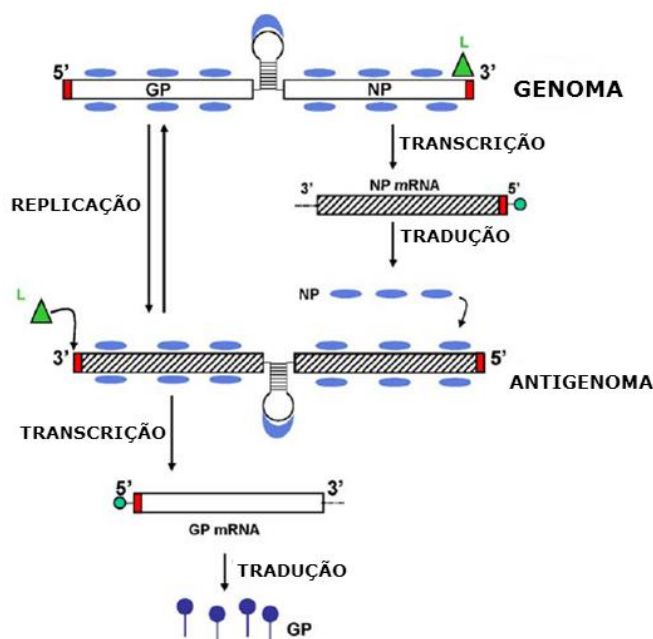


Figura 1.4. Esquema representativo da estratégia de replicação *ambisense* dos *Arenavirus* (Adaptado de Emonet et al. 2009). GP= glicoproteína; NP= nucleoproteína; L= Proteína L (polimerase).

O transporte do complexo GPC ocorre através do retículo endoplasmático e pelo Golgi seguido pela clivagem pós-traducional do GPC com a geração dos três componentes que formam o complexo GPC: o SSP, GP1 e GP2 (Buchmeier et al. 2007, Urata & Yasuda 2012). A geração de GP1 e GP2 parece ser mediada pela protease celular SKI-1/S1P para os arenavírus do VM (Lassa e LCMV) e para os vírus causadores de febre hemorrágica nas Américas, isto é, para os vírus Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá e Chapare, membros da

Clade B do Novo Mundo (Beyer et al. 2003, Kunz et al. 2003, Pinschewer et al. 2003a, b, Rojek et al. 2008). Os trimeros de GP1/GP2 se associam a partir das interações iônicas para formar as projeções da superfície viral. Assim como a maioria dos vírus de RNA de polaridade negativa, os arenavírus são liberados por brotamento da ribonucleoproteína (RNP) virais, cuja montagem associada à superfície das membranas de células infectadas possibilita a expressão das GPs virais dos arenavírus as mesmas (Figura 1.3) (Perez & de la Torre 2003, Strecker et al. 2003, Urata et al. 2006, Wolff et al. 2013).

1.4.4. Relações Genéticas e Antigênicas

Os arenavírus, de acordo com sua distribuição geográfica, propriedades antigênicas e variabilidade genética, têm sido historicamente classificados em dois grandes grupos: (i) o grupo do VM (sorocomplexo Lassa - vírus da coriomeningite linfocítica - LCMV) composto principalmente por vírus detectados no continente africano e (ii) o grupo do NM (sorocomplexo Tacaribe), composto por todos os arenavírus identificados nas Américas (Salvato et al. 2005b).

O grupo do VM, que por muitos anos foi composto pelos mammarenavírus Lassa, LCMV, Ippy, Mobala, Mopeia, Lujo e Luna, vem se expandindo devido à descoberta de novos membros do grupo no continente asiático e africano incluindo agora os mammarenavírus Gairo, Loei River, Lunk, Mariental, Merino Walk, Okahandja, Solwezi, Wenzhou que estão relacionados principalmente aos roedores da família *Muridae*, subfamília *Murinae* (Figura 1.5) (Radoshitzky et al. 2015, Blasdel et al. 2016).

Os arenavírus do NM, filogeneticamente, se dividem em quatro linhagens, conhecidas como Clade A, A-rec (ou D) B e C (Figura 1.5). Enquanto a Clade C inclui apenas os mammarenavírus Oliveros e Latino, a situação é mais complexa para as outras clades. A Clade B possui oito membros (mammarenavírus Machupo, Junín, Tacaribe, Sabiá, Guanarito, Amaparí, Cupixi e Chapare). Todos os vírus reconhecidamente patogênicos identificados no Novo Mundo, até o momento, estão incluídos nessa clade, não importando o gene utilizado na análise. A clade A pode ser dividida em A e A-recombinante (A-rec), devido à origem quimérica do segmento S dos arenavírus norte-americanos. Fazem parte desta clade os mammarenavírus Pichindé, Pirital, Paraná, Flexal, Allpahuayo (Clade A) e os mammarenavírus Tamiami, Whitewater Arroyo, Bear Canyon que fazem parte da Clade A-rec ou Clade D como vem sendo recentemente proposto (Radoshitzky et al. 2015). Até o momento, os arenavírus do NM identificados estão relacionados aos roedores da subfamília *Sigmodontinae* e *Neotominae*, com exceção dos vírus Tacaribe primeiramente isolado de

morcegos e recentemente detectado também em carrapatos (Charrel et al. 2002, 2008, Salvato et al. 2005b, Charrel & de Lamballerie 2010, Sayler et al. 2014).

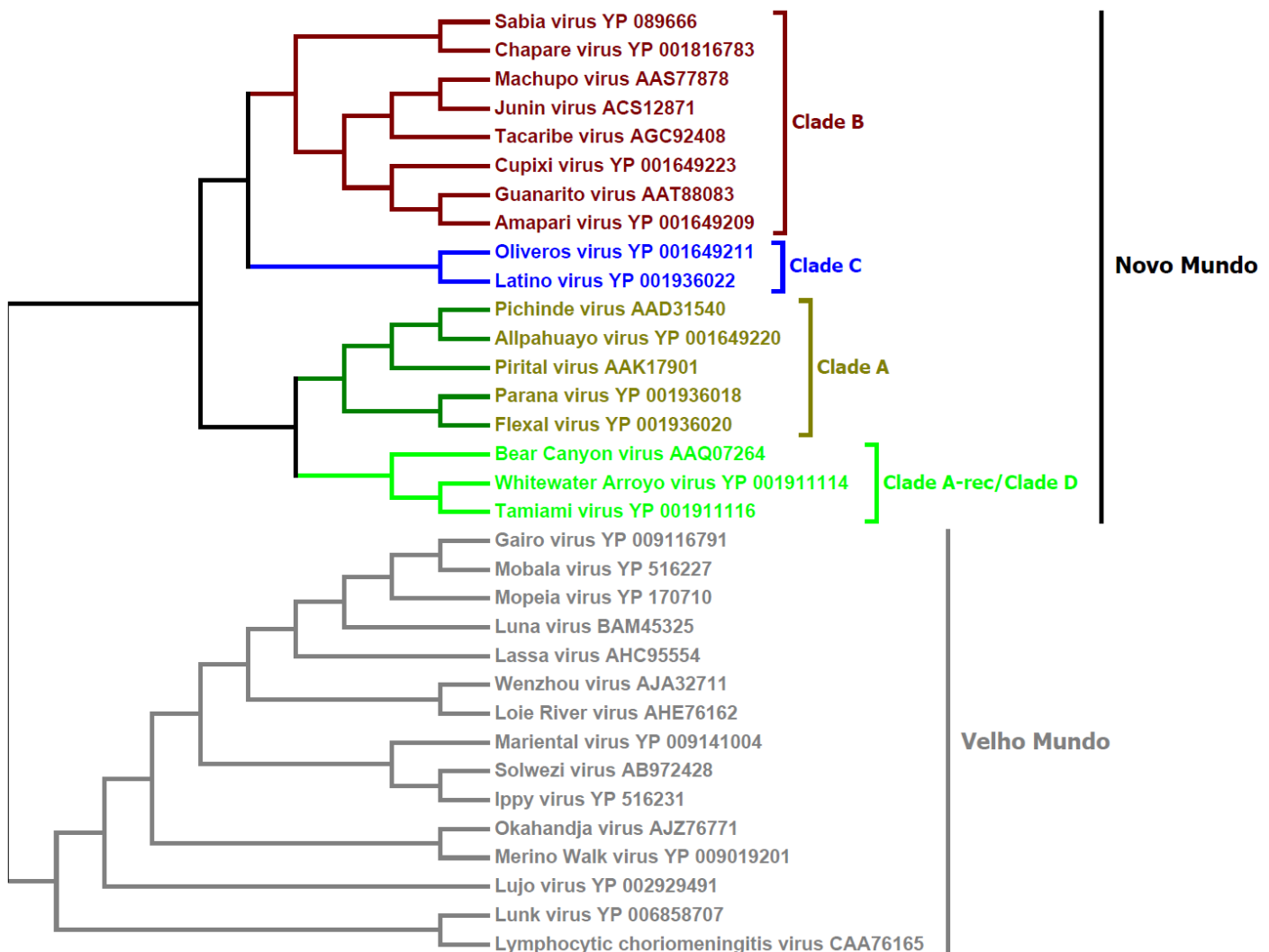


Figura 1.5. Ilustração das relações filogenéticas entre a nucleoproteína dos representantes do gênero *Mammarenavirus* reconhecidas pelo *International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV), Ano 2017.

Os arenavírus, assim como outros vírus de RNA, são altamente divergentes devido às altas taxas de mutação, consequência de uma RdRp viral de baixa fidelidade e dos possíveis eventos de recombinação e rearranjo que podem contribuir para a diversificação viral durante a evolução (Albariño et al. 1998, Charrel et al. 2003). Embora seja possível produzir rearranjo de arenavírus *in vitro*, até o momento, não há registros mammarenavírus produto de rearranjo entre diferentes espécies virais *in vivo* (Lukashevich 1992). Palacios e colaboradores (2008) acreditam ter encontrado um mammarenavírus detectado em três casos humanos de LCM após doação de órgãos e o vírus aparentemente parece ser fruto de um rearranjo entre diferentes

variantes do LCMV, indicando que este evento é raro com ocorrência apenas entre vírus filogeneticamente relacionados (Archer & Rico-Hesse 2002, Charrel et al. 2002, Palcios et al. 2008).

Neste cenário, é possível deduzir que o principal motor da evolução dos arenavírus é a alta frequência de erros de transcrição viral, considerando que a taxa de mutação estimada dos vírus de RNA podem variar de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,7 \times 10^{-4}$ por nucleotídeo incorporado durante a replicação (Holland et al. 1992, Drake & Holland 1999, Grande-Pérez et al. 2002, 2016). Estes resultados são consistentes com a heterogeneidade genética observada entre os arenavírus (Sevilla & de la Torre 2006). A comparação de sequências de segmentos genômicos e de proteínas dos diferentes arenavírus demonstrou identidades específicas que variam de 90-95% entre isolados da mesma região geográfica e 78 a 86% de vírus isolados de diferentes regiões (Fulhorst et al. 2001, Charrel et al. 2008). A diversidade genética dentro e também entre os grupos de arenavírus isolados sugere que essa heterogeneidade está refletida na gama de hospedeiros e na capacidade de causar doença no homem sobre diferentes formas clínicas (Blasdell et al. 2008).

Diante desta diversidade, considerando que as proteínas com propriedades imunogênicas mais acentuadas são a NP e as GPs, estudos têm revelado que existe uma reação sorológica cruzada entre os anticorpos usados para identificar os arenavírus do NM e do VM em testes de neutralização cruzada e ou fixação de complemento (Webb et al. 1969, J Casals 1975). Os anticorpos monoclonais produzidos contra o GP2 de dois arenavírus africanos reagiram amplamente contra arenavírus americanos, demonstrando epítomos altamente conservados nesta família (Ruo et al. 1991). De uma forma mais estrita, anticorpos monoclonais contra a NP do vírus Junín reagiram apenas com arenavírus do NM ou reagiram apenas com isolados locais, o que sugere uma forte estabilidade antigênica desses vírus em certas áreas (Sanchez et al. 1989). Apesar desses resultados, várias tentativas falharam para definir de forma clara as diferenças sorológicas entre arenavírus de maneira a auxiliar a classificação das espécies (Howard 1993, Fukushi et al. 2012).

Recentemente, novos arenavírus foram identificados em serpentes (*Boa constrictor* e *Corallus annulatus*) e as evidências apontam que estes vírus seriam os agentes etiológicos de uma doença “comum” entre serpentes mantidas em cativeiro nos Estados Unidos, chamada corpúsculo de inclusão (Stenglein et al. 2012). A identificação e o estudo desses arenavírus em serpentes em cativeiro na Europa corroboraram e ampliaram esse achado. A dinâmica da infecção desses vírus nestes animais e o possível risco de infecção em humanos ainda são pouco conhecidos (Bodewes et al. 2013, Hepjoki et al. 2015). Este grupo parece ser ancestral aos demais membros da família e estudos mostram que a grande diferença entre os

reptarenavírus e os mammarenavírus está na origem do gene GPC, já que o gene dos vírus de serpentes está relacionado ao gene da glicoproteína de filovírus e de alguns retrovírus aviários (Gallaher et al. 20010, Stenglein et al. 2012, Koellhoffer et al. 2013). Ainda há muito do que se entender sobre esse novo grupo de vírus, mas estudos realizados até o momento sugerem que a evolução dos reptarenavírus é baseada em eventos de recombinação e rearranjos generalizados com uma acumulação desequilibrada de vários genótipos virais distintos em infecções individuais (Stenglein et al. 2015).

1.5. FEBRES HEMORRÁGICAS AMERICANAS

Os arenavírus são responsáveis por doenças de elevada letalidade, caracterizadas por febres hemorrágicas e/ou meningites em humanos. São conhecidas pelo menos 10 espécies, mundialmente distribuídas, capazes de causar doença em humanos e a maioria delas foi identificada na América do Sul (J Casals 1975, Briese et al. 2009).

A coriomeningite linfocítica (LCM) é uma doença febril muitas vezes sem sinais neurológicos, que pode evoluir para uma meningite asséptica. Sua distribuição mundial se deve à associação entre o agente etiológico (LCMV) e o roedor cosmopolita *Mus musculus*. A doença ocorre em forma de pequenos surtos esporádicos, geralmente acometendo crianças e adultos jovens, como registrado nos EUA e na Alemanha, onde as fontes de infecção foram roedores revendidos como animais de estimação (Fischer et al. 2006, Amman et al. 2007, Palacios et al. 2008, Knust et al. 2014).

A febre do Lassa, outra doença causada por arenavírus, ocorre de forma endêmica em países da África Ocidental, mas que tem geograficamente se expandindo no continente africano. Estima-se que ocorram aproximadamente 100.000 infecções pelo vírus Lassa (LASV) todos os anos na África, com cerca de 5.000 óbitos (Bowen et al. 2000). Em surtos hospitalares a letalidade pode atingir taxas de 50%, considerando a capacidade do vírus Lassa de ser transmitido de pessoa-pessoa e que mais de uma vez este vírus já causou surtos em hospitais na África, atingindo médicos e enfermeiras que assistiram aos pacientes infectados (Monath et al. 1973). Casos importados de febre do Lassa já foram notificados nos EUA, Inglaterra, Japão e Alemanha, fato que reforça a importância do conhecimento da doença por clínicos fora do continente africano (Günther et al. 2000, Macher & Wolfe 2006, Hewson 2017).

Em 2008, um novo arenavírus emergiu na África do Sul, causando um surto de uma grave doença febril. O vírus Lujo, como ficou conhecido, levou ao óbito quatro dos cinco pacientes infectados (Briese et al. 2009, Paweska et al. 2009). O caso index contraiu a

infecção a partir de uma fonte desconhecida no Zâmbia e foi transferido de helicóptero para a África do Sul onde infectou médicos, enfermeiras e profissionais da limpeza do hospital. Isolado dos casos humanos de febre hemorrágica na África, o vírus Lujo foi reconhecido como um novo membro dos arenavírus do VM (Briese et al. 2009). Apesar de inúmeras investigações o reservatório natural desse vírus ainda é desconhecido.

As febres hemorrágicas americanas causadas por arenavírus (FHA) são zoonoses com altas taxas de letalidade (15-30%) e com grande impacto na saúde pública (Ambrosio et al. 2011). Essas doenças vêm sendo identificadas na América do Sul desde 1959 e são caracterizadas como doenças sistêmicas graves com alterações na permeabilidade vascular e na vasorregulação, com manifestações neurológicas e trombocitopenia (de Manzione et al. 1998). Até o momento, cinco espécies de arenavírus patogênicas já foram descritas na América do Sul: o vírus Junín na Argentina, os vírus Machupo e Chapare na Bolívia, o vírus Guanarito na Venezuela o vírus Sabiá no Brasil (Arribalzaga 1955, Mackenzie et al. 1964b, Salas et al. 1991, Lisieux et al. 1994, Delgado et al. 2008). Existem, também, investigações de casos de FHA causada pelo vírus Ocozocoautla de Espinosa no México e pelo vírus Whitewater Arroyo nos EUA (Fulhorst et al. 1996, Cajimat et al. 2012).

1.5.1. Transmissão

Os reservatórios naturais dos mammarenavírus são roedores, com exceção do vírus Tacaribe que foi encontrado em morcegos do gênero *Artibeus* (Downs et al. 1963). Diferentes espécies de roedores da subfamília Murinae são os reservatórios dos arenavírus do Velho Mundo, enquanto roedores das subfamílias Sigmodontinae e Neotominae são infectados por vírus do Novo Mundo (Hugot et al. 2001).

Os ciclos enzoóticos na natureza são mantidos a partir da transmissão horizontal por exposição de animais suscetíveis às excretas infectadas, por transmissão vertical e principalmente por encontros agonísticos entre esses animais (Childs & Peters 1993, Buchmeier et al. 2007). Os roedores, considerados reservatórios primários, na dependência da espécie viral envolvida e da idade em que o animal foi infectado, podem apresentar: (i) uma infecção crônica, com capacidade de transmitir o vírus vertical e horizontalmente, ou (ii) podem eliminar a infecção através de uma resposta imune efetiva contra o vírus (Charrel & de Lamballerie 2010). A capacidade de sobreviver às infecções é interpretada como um longo processo evolutivo de adaptação entre o vírus e seu hospedeiro. Acredita-se que cada arenavírus está associado a uma determinada espécie de reservatório em particular, e por isso, a distribuição geográfica do vírus está condicionada à distribuição do seu reservatório

(Salazar-Bravo et al. 2002). No entanto, estudos demonstram que existem exceções e que uma espécie de roedor pode albergar mais de um arenavírus, como por exemplo, *Mastomys natalensis* que pode ser reservatório dos vírus Lassa, Morogoro e Gairo, assim como, um arenavírus pode possuir mais de um reservatório, como é o caso do vírus Bear Canyon que pode infectar os roedores *Neotoma macrotis* e *Peromyscus californicus* (Childs & Peters 1993, Fulhorst et al. 2002, Cajimat et al. 2007, Gryseels et al. 2017). O único arenavírus com distribuição mundial é o LCMV, que, como referido previamente, tem como hospedeiro o roedor cosmopolita *Mus Musculus* (Charrel & de Lamballerie 2008, Yama et al. 2012).

Acredita-se que a exposição humana aos arenavírus ocorre, principalmente, a partir da inalação de aerossóis contendo partículas virais procedentes de urina, fezes ou saliva de roedores silvestres infectados, ou mordeduras (Charrel & de Lamballerie 2010). Existem relatos de transmissão pessoa-pessoa, por contato íntimo ou por infecção nosocomial, por transplante de órgãos (Briese et al. 2009, Amman et al. 2007). Pessoas com contato direto ou indireto com vida silvestre, trabalhadores rurais, operadores de tratores ou máquinas de colheitas, profissionais de saúde e laboratoristas são particularmente susceptíveis a infecções por arenavírus (Fulhorst et al. 2007).

1.5.2. Patogenia e Resposta Imunológica

Diante da escassez de informações sobre as febres hemorrágicas causadas por arenavírus no Brasil, onde existe um grande número de doenças endêmicas com características clínicas e epidemiológicas semelhantes às arenaviroses, entre elas, a dengue, febre amarela e malária, neste tópico, serão abordados, além da patogenia e da imunologia, aspectos históricos das arenaviroses americanas, com descrição dos casos e surtos identificados desde a década de 1950.

O conhecimento sobre a patogenia e a imunologia em resposta à infecção por arenavírus ainda é escasso e controverso. O principal modelo de FHA por arenavírus na América do Sul é o vírus Junín (JUNV), que será utilizado como modelo nesta seção para exemplificar o conhecimento existente sobre a patogenia e a resposta imune das FHAs.

A transmissão dos arenavírus ocorre principalmente pela inalação de aerossóis. A inalação de partículas virais parece resultar na infecção de macrófagos alveolares, seguida pela migração destes macrófagos infectados para os linfonodos. À medida que o vírus se replica, ele se dissemina pelo sistema vascular para os rins, suprarrenais, pulmões, endotélio vascular, sistema nervoso central e para órgãos linfóides (Grant et al. 2012).

Os arenavírus do NM invadem as células a partir da ligação com os receptores hTfR1, expressos em uma grande variedade de tipos de células, cuja função é mediar a endocitose de transferrina ligada ao ferro e transportar o ferro através da membrana celular, para a sua subsequente liberação no citoplasma. Este evento, conseqüentemente, permite a infecção pantrópica observada durante as infecções por arenavírus do NM (Andrews et al. 1978, Radoshitzky et al. 2007).

Os macrófagos são alvos celulares principais na infecção por arenavírus (McKee et al. 1987). Na década de 1980, em uma série de casos de FH Argentina (FHAr) foi possível demonstrar os efeitos citopáticos nos macrófagos, nos quais foi identificado brotamento viral a partir da membrana plasmática, além da detecção de antígenos virais por imunofluorescência. A destruição dos linfonodos e de algumas áreas do baço também foi observada em casos fatais FHAr, demonstrando o tropismo viral para o tecido linfático (González et al. 1980, Ambrosio et al. 1986, 1990). Desta forma, o tropismo do JUNV por macrófagos pode ser um importante mecanismo de evasão do sistema imunológico e também por desempenhar um papel na síndrome de choque fatal que ocorre em alguns graves de FHAr (Mclay et al. 2013).

Embora uma imunossupressão generalizada seja a principal característica da infecção pelo vírus Lassa (LASV), o que se observa predominantemente nos pacientes infectados pelo JUNV são os elevados níveis de citocinas. Indivíduos com FHAr apresentam aumentos nos níveis de TNF, IFN, IL-6 e IL-10 (Levis et al. 1985, Heller et al. 1992, Marta et al. 1999). Os pacientes com a doença mais grave e casos fatais apresentam consistentemente níveis elevados de TNF e IFN (Levis et al. 1985, Heller et al. 1992). Curiosamente, embora estes níveis aumentados de citocinas sejam observados em pacientes infectados JUNV, macrófagos infectados *in vitro* não apresentam qualquer aumento na produção de citocinas, tais como IFN, TNF, IL-10, IL-6 e IL-12 (Groseth et al. 2011). Assim, a partir deste estudo foi possível concluir que o aumento dos níveis de citocinas observado em pacientes com FHAr deve ser proveniente de outra fonte, possivelmente de células dendríticas, cujo o papel na produção de citocinas induzidas pelo vírus JUNV ainda não foi estabelecido (Mclay et al. 2013). Uma teoria proposta é de que as citocinas possam ser importantes no controle da replicação do vírus nas fases iniciais da infecção e que uma resposta atrasada possa contribuir para uma evolução mais grave da doença (Groseth et al. 2011).

Inversamente ao que se observa com os pacientes com quadro hemorrágico, a presença de dano vascular limitado é frequente e característico nos pacientes que sofrem de FH causada pelo JUNV (Weissenbacher et al. 1987). O receptor para JUNV, o TfR1, é altamente expresso

em células endoteliais vasculares e estas células suportam elevados níveis de replicação do vírus, como observado *in vitro* (Andrews et al. 1978, Radoshitzky et al. 2007).

Embora os arenavírus não sejam citopatogênicos e não causem lesões vasculares *in vivo* (Weissenbacher et al. 1987, Gomez et al. 2003), a infecção experimental das células endoteliais tem demonstrado um aumento na produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandina PGI₂ (Gomez et al. 2003). Assim, a liberação destes mediadores vasoativos pode ser a causa do aumento da permeabilidade vascular durante a infecção de células endoteliais pelo JUNV que contribuem para o choque posterior observado nos pacientes com a forma grave da FHAr (Mclay et al. 2013).

Células endoteliais experimentalmente infectadas pelo JUNV apresentam um aumento da expressão de moléculas de adesão celular - ICAM-1 e VCAM-1- e níveis reduzidos do factor de coagulação de von Willebrand (FVW), embora, contraditoriamente, os pacientes com FHAr apresentam níveis de FVW aumentado em amostras de soro (Molinas et al. 1989, Gomez et al. 2003). Esta discrepância sugere que o FVW seja proveniente de outra fonte e não das células endoteliais. Em adição, considerando a capacidade do plasma de pacientes com FHAr em inibir a agregação de plaquetas normais *in vitro*, uma característica também encontrada em pacientes infectados por outros arenavírus, tem sido hipotetizada a existência de um desconhecido inibidor da agregação de plaquetas no plasma (Cummins et al. 1990). Ainda no contexto do quadro hemorrágico observado nos indivíduos infectados pelo JUNV, a trombocitopenia, as atividades do complemento e de coagulação do sangue se apresentam reduzidas e contribuem para a coagulopatia e edema observado na FHAr (de Bracco et al. 1978, Heller et al. 1995).

Em estudos experimentais de infecção em macacos rhesus, saguis e porcos-da-índia pelos arenavírus causadores de febres hemorrágicas, foi possível reproduzir lesões semelhantes a casos humanos notificados de FHAr. Os achados mais comuns foram: hemorragia, necrose da medula óssea, necrose hepatocelular leve e encefalomielite (Kastello et al. 1976, Green et al. 1987). Embora muitas vezes haja necrose de linfócitos adjacentes, os macrófagos são as células mais frequentemente envolvidas (González et al. 1980). No rim, um grande número de partículas intracitoplasmáticas semelhantes aos arenavírus foram encontradas nos túbulos distais, em concordância com a necrose tecidual grave e a presença de grande quantidade de antígeno de JUNV que foram demonstradas em estudos morfológicos (Cossio et al. 1975). Por fim, estudos morfológicos realizados com tecido da medula óssea demonstraram que existe um sequestro agudo e transiente de hematopoiese, com hipocelularidade, mas sem sequelas hematológicas permanente em sobreviventes (Ponzinibbio et al. 1979).

1.5.3. Febre Hemorrágica Argentina: O protótipo das Febres Hemorrágicas por arenavírus nas américas.

A FHAr, uma doença febril aguda com manifestações hemorrágicas e neurológicas, foi descrita por Arribalzaga em 1955 na região agrícola da Argentina. Essa doença ocorria de forma epidêmica ao redor do município de Junín desde 1943. No entanto, o JUNV só foi descoberto oito anos, após sua descrição inicial por Parodi e colaboradores (1958) e confirmado por Pirotsky e colaboradores uma década depois (1959), quando surtos anuais de FHAr vinham sendo registrados sem interrupção (Enria et al. 1998a).

O principal reservatório natural do JUNV é o roedor *Calomys musculus*, embora esse vírus também já tenha sido isolado dos órgãos e fluidos corporais de outros roedores como *C. laucha* e *Akodon azarae* e, ocasionalmente, de *Mus musculus*, *Necromys obscurus* e *Oligoryzomys flavescens* (Mills et al. 1991, Sabbatini et al. 1997). A espécie *C. musculus* apresenta hábitos generalistas e, embora mais frequentemente capturado em ambientes de fronteira estável, pode ser encontrada em campos de cultivo e pós-colheita se alimentando de grãos de milho e soja. Este roedor é raramente capturado dentro ou ao redor das habitações humanas, embora possa habitar parques e as redondezas de áreas subdesenvolvidas adjacentes aos pampas argentinos (Mills et al. 1992, Ellis et al. 1997).

A área endêmica da FHAr inclui apenas uma parte da distribuição geográfica das espécies *C. musculus*, que é comum e amplamente distribuído na Argentina central e noroeste. A incidência anual de HFAr está diretamente associada com densidades populacionais locais do reservatório, que atinge sua densidade máxima durante o outono, coincidindo com a colheita das principais plantações iniciadas no verão (Nowak 1991, Mills et al. 1992).

Acredita-se que o JUNV se mantenha nas populações de roedores em ciclos enzoóticos principalmente a partir da transmissão horizontal por encontros agonistas e que, quando transmitido verticalmente, podem ter efeitos deletérios importantes sobre esses animais (Mills et al. 1994). Os recém-nascidos da espécie *C. musculus* experimentalmente infectados com o JUNV têm alta mortalidade (70%), os sobreviventes apresentam baixo desempenho e fecundidade reduzida com viremia e virúria persistentes (Vitullo et al. 1987, Vitullo & Merani 1988). Em contrapartida, os animais adultos infectados demonstram padrões diferentes de resposta: (i) metade dos animais desenvolvem anticorpos com *clearence* viral, (ii) o restante desenvolve viremia crônica com eliminação persistente do vírus na urina e na saliva, sem nenhum efeito deletério aparente (Vitullo & Merani 1990).

Estudos de populações de roedores silvestres demonstram que a infecção em *C. musculus* é mais frequente entre machos do que fêmeas e está diretamente correlacionada com a idade e a presença de feridas, ou cicatrizes, nesses animais, sugerindo que encontros agressivos entre os machos adultos possam ser um importante mecanismo de transmissão dentro das populações de reservatórios. Embora a infecção no roedor reservatório possa ser alta, ela geralmente é baixa, mesmo em locais com um alto número de casos FHAr (Mills et al. 1991). Estudos eco-epidemiológicos têm demonstrado que há uma predominância de *C. musculus* em habitats lineares, como beiras de estradas, apontando para um diferente padrão, no que diz respeito ao ambiente da infecção, levando a crer que as infecções humanas ocorrem no contato com roedor ao longo das bordas dos campos ou beiras de estradas, ao entrar ou ao sair dos campos, e não durante a realização atividades agrícolas (Mills et al. 1992).

Outros fatores, além da presença do roedor infectado, estão associados à incidência de FHAr. Fatores climáticos são importantes por sua influência direta na densidade populacional dos roedores. Nos pampas argentinos, a precipitação e a temperatura têm sido documentadas e os dados demonstram que os verões mais quentes e secos seguidos de invernos rigorosos e chuvosos contribuem para a diminuição da densidade de roedores e conseqüente diminuição do número de casos de FHAr (Mills et al. 1991, 1992). Alterações nos principais tipos de grãos cultivados na região, alterações antropogênicas (queimadas, desmatamentos) no habitat natural de *C. callosus*, e variação na intensidade do uso de inseticidas e herbicidas de acordo com as condições econômicas do produtor são outros fatores de importância que têm sido implicados no aumento ou diminuição da incidência da doença (Maiztegui & Sabattini 1977).

A FHAr ocorre nos pampas úmidos, a área mais fértil da Argentina, que dependem da agricultura para a sua prosperidade. A área endêmica da FHAr é em grande parte uma colcha de retalhos de campos de cultivo, cortada por linhas lineares de habitats de fronteiras relativamente estáveis a partir de estradas, rodovias, linhas de cercas e ferrovias (Figura 1.6) (Enria et al. 1998b).

Uma característica epidemiológica marcante da FHAr é a sua expansão geográfica constante e progressiva, que ocorreu rapidamente nos anos seguintes à sua descoberta e que continua até o presente. Em 1958, os casos estavam limitados a uma área de aproximadamente 16.000km², com cerca de 270.000 pessoas vivendo em áreas de risco. Atualmente, a região endêmica/epidêmica abrange uma área de cerca de 150.000 km² com 3 milhões de habitantes, abrangendo as províncias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé e La Pampa (Figura 1.6) (Maiztegui et al. 1986, Enria et al. 1998b, Ambrosio et al. 2011).

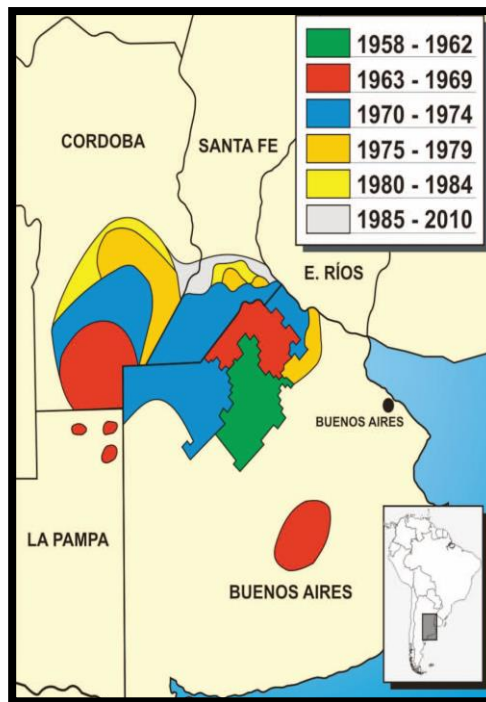


Figura 1.6. Extensão progressiva da febre hemorrágica argentina no período de 1958 a 2010 (Adaptado de: Ambrosio et al. 2011).

A incidência da FHA não é a mesma em diferentes áreas dos pampas argentinos ou em diferentes anos. Em geral, é mais elevada durante um período de 5 a 10 anos nas áreas recém- envolvidas e depois tende a diminuir (Enria et al. 1998b). A extensão geográfica da FHA na última década tem sido menor do que a observada anteriormente. No entanto, verifica-se um aumento, contínuo e moderado, da extensão geográfica rumo ao norte seguindo a distribuição do roedor reservatório, assim como um reemergência nas áreas históricas onde a doença clínica não havia sido notificada nos últimos 10 anos (Garcia et al. 1996).

As epidemias de FHA ocorrem anualmente com um número variável de casos, de históricos 3.500 a 30-50 casos confirmados, atualmente, por ano (Ambrosio et al. 2011). Casos da doença ocorrem ao longo do ano, predominantemente, durante o outono e inverno, o principal período de colheita na Argentina, com um pico de incidência no mês de maio (Garcia et al. 1996).

A doença é quatro vezes mais prevalente em homens do que em mulheres e entre trabalhadores rurais, na faixa etária ampla de 15 a 65 anos. Crianças menores de 14 anos de idade constituem cerca de 10% dos casos anuais, sendo rara em indivíduos com menos de 4 anos de idade e, excepcional, naqueles com menos de 2 anos de vida. A distribuição sazonal da doença e a alta prevalência em trabalhadores rurais masculinos refletem a exposição ocupacional dos seres humanos ao roedor reservatório do JUNV. A incidência anual dentro da área endêmica pode ser tão baixa quanto 1 em 100.000 , mas nas áreas de maior atividade que

atinge 140 por 100.000 habitantes e 355 por 100.000 homens adultos (Enria et al. 1986, 1998b).

Nos primeiros anos do reconhecimento da FHAr, os indivíduos infectados trabalhavam em contato direto com a terra com as colheitas realizadas manualmente. Com o avanço da tecnologia na agropecuária, as práticas agrícolas mecanizadas tornaram-se comuns na região, mas os trabalhadores do campo, especialmente os motoristas de trator, continuaram a se infectar (Enria et al. 1998a). A infecção dessa população parece estar associada com a inalação de aerossóis infecciosos gerados durante o processo de colheita mecanizada ou com exposição a aerossóis primários de urina de roedores infectados ou contato com materiais contaminados. De uma forma geral, a FHAr não é contagiosa, apesar da transmissão pessoa-pessoa já ter sido documentada com o contato íntimo entre pacientes convalescentes e suas parceiras (Briggiler et al. 1987).

A FHAr possui um início insidioso, após um período de incubação que pode variar, em média, de 4 a 21 dias. Inicialmente o indivíduo infectado apresenta calafrios, mal-estar, anorexia, cefaleia, mialgias e hipertermia moderada. Depois de dias, surgem manifestações gastrointestinais, neurológicas, cardiovasculares, além de sinais e sintomas constitucionais caracterizados por dores nas costas, dor retro-orbitária, náuseas ou vômitos, fotofobia e tonturas. Na primeira semana de doença, ao exame físico se observa rubor de face, pescoço e da parte superior do tórax, hiperemia conjuntival e edema periorbital. As membranas da orofaringe estão congestionadas e as gengivas podem sangrar espontaneamente ou sob uma ligeira pressão. Um enantema caracterizado por petéquias e pequenas vesículas é quase sempre encontrada no palato mole (Figura. 1.7) (Maiztegui 1975, Harrison et al. 1999).

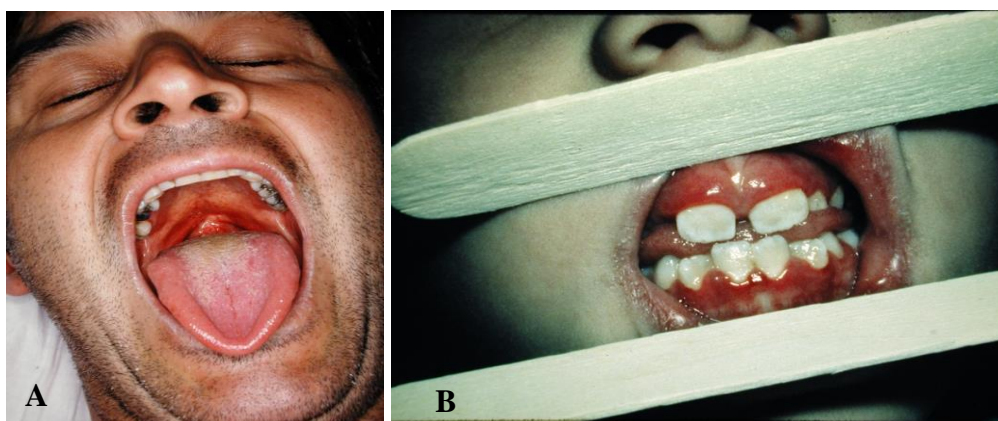


Figura 1.7. Febre hemorrágica argentina: (A) Enantema em palato mole e (B) gengivas hiperemiadas com sangramento espontâneo. Fotos gentilmente cedidas pela Dr^a Silvana Levis (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Dr. Julio I. Maiztegui (INEVH) /Argentina).

A maioria dos pacientes tem petéquias cutâneas nas regiões axilares, parte superior do tórax e braços. Os gânglios linfáticos tornam-se maiores, principalmente nas regiões cervical e lateral. Bradicardia e hipotensão ortostática são comuns. Geralmente não há hepatomegalia ou esplenomegalia e a icterícia é muito rara. No fim da primeira semana de evolução, oligúria e diferentes graus de desidratação podem ocorrer. Sinais neurológicos como irritabilidade, letargia, leves tremores da mão e língua são comuns. Ataxia moderada, hiperestesia cutânea e uma diminuição dos reflexos e da tonicidade muscular também podem estar presentes. Nas mulheres infectadas é comum uma metrorragia leve ou moderada e, em alguns casos, pode ser o primeiro sinal clínico da doença (Ambrosio et al. 1990, Enria et al. 1998b, Harrison et al. 1999).

Durante a segunda semana da doença, embora cerca de 70% a 80 % dos doentes apresentem melhora clínica, o quadro clínico pode se agravar, entre o 8º e 12º dia após o início da doença, com surgimento de hemorragias graves como hematêmese, melena, hemoptise, epistaxe, hematomas, metrorragia, ou hematúria, além de manifestações neurológicas, choque e infecções bacterianas secundárias como pneumonia e septicemia. As manifestações neurológicas graves geralmente começam com confusão mental, aumento da irritabilidade e da intensidade dos tremores, que são seguidos de delírio, convulsões generalizadas, edema cerebral e coma. A maioria dos casos graves de FHAr apresenta manifestação neurológica. A insuficiência renal aguda é rara, mas pode ocorrer em casos terminais ou após períodos prolongados de choque, conseqüente à necrose tubular aguda (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988, Enria et al. 1998a, Harrison et al. 1999).

Evolutivamente, entre a segunda e a terceira semana de doença, passando por um período de convalescença prolongada, ocorre a recuperação do paciente que pode evoluir com alopecia, astenia, irritabilidade e alterações de memória que desaparecem gradualmente ao longo de um período de 1 a 3 meses (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988).

Casos de FHAr durante a gravidez não são comuns, mas a letalidade pode ser maior do que 50% em mulheres que contraem a doença no último trimestre da gestação, devido ao reconhecimento tardio da doença e à incapacidade de administrar o tratamento específico. Malformações congênitas, morte fetal e morte dos recém-nascidos também foram relatadas (Briggiler et al. 1990). Crianças tendem a ter um curso clínico mais brando e, assim, casos fatais e graves são pouco comuns nessa faixa etária. O tratamento da FHAr consiste em terapia específica e de suporte (Enria et al. 1998a).

O tratamento específico disponível para FHAr é a transfusão de plasma imune nos primeiros oito dias do início dos sintomas. Este tratamento reduz a taxa de letalidade para menos de 1% e é normalizado com base na quantidade de anticorpos neutralizantes contra

JUNV infundidos (Maiztegui et al. 1979, Enria et al. 1984, Mahmutovic et al. 2015). A eficácia do tratamento com plasma hiperimune parece ser devido à capacidade de neutralização viral dos anticorpos já que os níveis de viremia de pacientes se apresentam reduzidos após a transfusão com plasma imune e os pacientes tratados com plasma, geralmente possuem títulos mais baixos na fase convalescente (Mahmutovic et al. 2015). Neste contexto, bancos de plasma foram criados em áreas endêmicas, a fim de coletar o soro de indivíduos que sobreviveram, considerando, no entanto, que o tratamento com plasma imune não acarreta nenhum benefício para os pacientes quando administrado oito dias após o início da doença (Enria & Maiztegui 1994, Mahmutovic et al. 2015).

Ainda, durante a fase convalescência, 10% dos pacientes tratados com plasma imune desenvolvem uma síndrome neurológica tardia. Esta síndrome aparece depois de um período médio de 20 dias (de 7 a 80 dias), caracterizada por febre sinais cerebelares e paralisia do nervo craniano, no qual o paciente não apresenta nenhuma manifestação semelhante às do período agudo FHAr. (Maiztegui et al. 1979, Enria et al. 1985, Mahmutovic et al. 2015). Durante a síndrome neurológica tardia, o líquido pode conter dezenas a centenas de células com níveis normais de açúcar e proteínas ou níveis ligeiramente aumentados. A utilização de ribavirina endovenosa também pode ser útil no tratamento de pacientes com FHAr e talvez seja uma importante alternativa, uma vez que o número de indivíduos infectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatite C nos pampas esta cada vez maior, fazendo com que a seleção de doadores se torne mais difícil (Enria et al. 1987, Enria & Maiztegui 1994).

Em relação ao tratamento, medidas de suporte devem ser realizadas considerando a importância de uma hidratação adequada e a necessidade de controle das alterações neurológicas, da hemorragia, do choque e das infecções bacterianas secundárias. As injeções intramusculares e subcutâneas são totalmente contra-indicadas por causa do risco de hematomas e, embora as transfusões de plaquetas sejam realizadas, a natureza complexa da coagulopatia e a experiência clínica têm demonstrado que elas não são úteis (Maiztegui 1975).

Exames laboratoriais podem auxiliar no diagnóstico clínico precoce. Durante a fase aguda, é possível observar leucopenia e trombocitopenia com uma taxa de sedimentação normal ou reduzida. Quase invariavelmente, há proteinúria e sedimento urinário hialinos contendo hemácias. A creatinina sérica e uréia estão dentro dos limites normais ou aumentadas em proporção à desidratação e ao choque dos pacientes graves. Elevações discretas da aspartato transaminase (AST), creatina fosfoquinase (CPK) e lactato desidrogenase (LDH) são comuns e hiperbilirrubinemia ou hiperamilasemia são raros. Durante a doença aguda o líquido cefalorraquidiano é normal, mesmo em pacientes com doença neurológica grave (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988, Harrison et al. 1999).

Na FHAr, assim como nas outras FHA, a viremia ocorre durante todo o período febril agudo e o arenavírus pode ser facilmente isolado a partir de sangue e de tecidos linfóides de casos fatais. O isolamento, geralmente, é realizado em células Vero e a co-cultura de células mononucleares do sangue periférico melhora a sensibilidade na recuperação do vírus (Ambrosio et al. 1986).

A presença do vírus pode também ser detectada pelo ELISA ou pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) e, nos casos fatais, também pela imunohistoquímica (Peters et al. 1973, 1987). Embora os testes de neutralização apresentem maior sensibilidade e sejam importantes para confirmar as espécies de arenavírus em soros de pacientes, a dificuldade em sua execução, em decorrência da necessidade da manutenção de diferentes espécies de arenavírus em laboratório NB-4 (Sanchez et al. 1989), faz com que o teste ELISA seja o método de escolha para o diagnóstico sorológico. A RT-PCR tem sido aplicada com sucesso e pode desempenhar um papel no estabelecimento de diagnóstico etiológico em doentes que evoluíram para o óbito antes do surgimento dos anticorpos específicos (Lozano et al. 1993, 1995).

Desde a identificação da FHAr, estratégias de controle e prevenção vêm sendo planejadas e desenvolvidas. Considerando, no entanto, a impossibilidade da eliminação de todos os roedores que funcionam como reservatórios do vírus JUN, esforços para reduzir a incidência FHAr foram voltados para obtenção de uma vacina.

Como resultado de um projeto internacional colaborativo, em 1979, uma cepa viral do JUNV foi desenvolvida e usada como princípio ativo para uma vacina chamada *Candid#1* (Barrera Oro & McKee 1991, McKee et al. 1993, Enria & Maiztegui 1994, Enria et al. 1998b). Os ensaios clínicos de fase I, II e III, realizados entre 1985 e 1990 demonstraram que a vacina *Candid#1* é segura imunogenicamente, com, aproximadamente, 95% de soroconversão em homens entre 15 e 65 anos e que a resposta imunológica específica a partir da detecção de anticorpos neutralizantes se mantém por até 13 anos após a imunização em mais de 90 % dos vacinados (Levis et al. 1993, Maiztegui et al. 1998, Enria et al. 2010).

Até o momento, aproximadamente 450.000 doses da vacina *Candid#1* foram distribuídas em quatro províncias da Argentina: Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé e La Pampa (Briggler et al. 2015). No entanto, a *Candid#1* é considerada uma vacina "órfã", por seu baixo apelo comercial, já que apenas um número restrito de doses é distribuído anualmente e por seu uso limitado a uma região específica da Argentina, fazendo que não houvesse interesse comercial da indústria farmacêutica (Lang & Wood 1999).

Neste contexto, a vacina não foi aprovada pelo FDA, devido não somente à falta de documentação adequada, mas também pela falta de composição genética detalhada da

linhagem vacinal, pela associação da vacina com a doença de pé e boca em várias regiões da Argentina, e pelo desconhecimento da base molecular do fenótipo atenuado da *Candid#1* (Maiztegui et al. 1998, Ambrosio et al. 2011, Saavedra et al. 2017). A única mudança de resíduo, F427I, no domínio da glicoproteína G2 de transmembrana parece ser responsável pelo fenótipo atenuado, embora o mecanismo para este efeito continue por se resolver. Acredita-se que esta substituição não afete a capacidade do vírus de utilizar o receptor TfR1, mas possivelmente interfira na fusão ou na maturação viral (Albariño et al. 2011).

Com a falta de interesse das companhias farmacêuticas, o governo argentino decidiu patrocinar e investir na produção da vacina *Candid#1*, capacitando o *Instituto de Doenças Virais Dr. Julio I. Maiztegui* (INEVH) que assumiu a produção nacional da vacina (Ambrosio et al. 2006). Em 1991, decidiu-se vacinar populações adultas de alto risco para infecção pelo JUNV, em áreas selecionadas por uma alta incidência FHAr nos cinco anos anteriores à vacinação. As campanhas ocorreram até o ano de 2007, quando a vacina foi instituída no calendário nacional de vacinação argentino. A vacina é disponível para indivíduos maiores de 15 anos, de ambos os sexos, que residem ou exercem atividades em localidades onde tenham ocorrido casos de FHAr nos últimos anos. A vacina é contra indicada para imunossuprimidos, gestantes ou mulheres que ainda estejam amamentando e indivíduos que tenham recebido vacinas ou mesmo gamaglobulinas a menos de um mês (Enria et al. 2010, Brigiller et al. 2015, Saavedra et al. 2017).

A vacinação de adultos em alto risco de exposição ao JUNV em 1991 e a introdução da vacina no calendário nacional em 2007 resultaram num declínio significativo do número de casos de FHAr (Figura 1.8). Estudos realizados pelas autoridades de saúde argentina demonstraram que de um total de 221 confirmados, entre 2001 e 2010, 147 (67%) eram do sexo masculino e 74 (33%) mulheres, 30 casos (14%) tinham menos de 15 anos e 179 (81%) tinham entre 15 e 65 anos. Uma análise das ocupações por parte dos pacientes, no momento da doença, sugere que apenas 15% eram, exclusivamente, trabalhadores rurais. Dos 20 casos fatais, apenas quatro (20%) trabalhavam no campo (Brigiller et al. 2015). Em comparação com o padrão clássico da FHAr, a proporção de mulheres e menores de 15 anos infectados aumentou e a prevalência de ocupações não agrícolas diminuiu (Ambrosio et al. 2011). Este novo cenário epidemiológico indica a necessidade de adaptar as estratégias de cuidados de saúde primários, a fim de alcançar o diagnóstico precoce e o tratamento da doença, além da necessidade e da importância de se ajustar o programa de vacinação à disponibilidade de vacina e ao risco-benefício de sua aplicação.

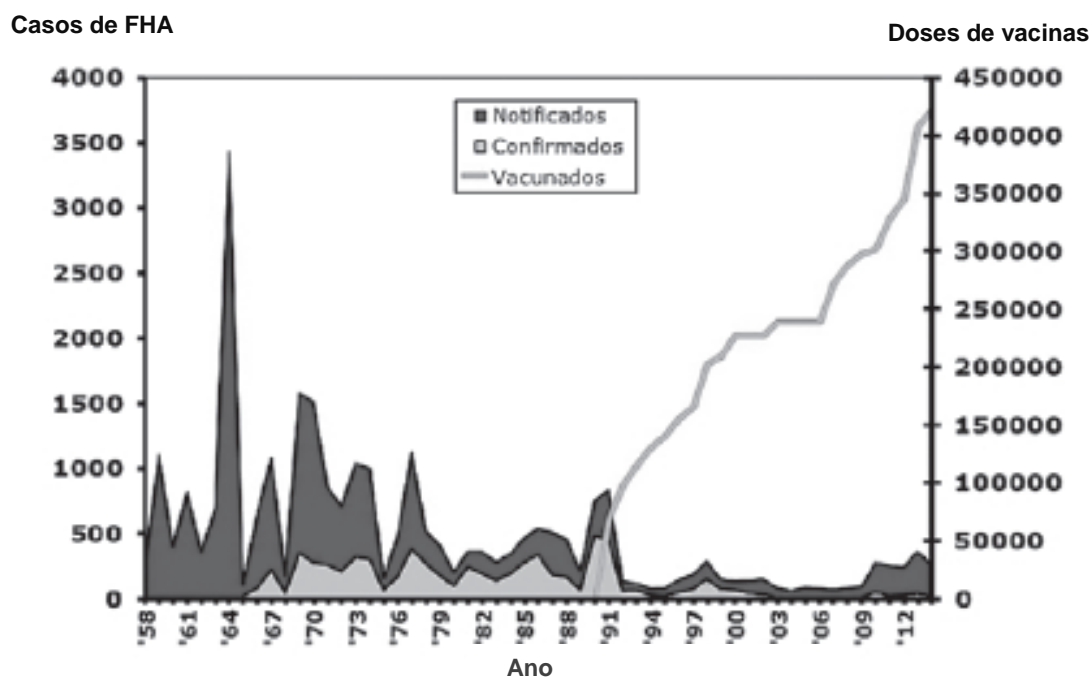


Figura 1.8. Distribuição de casos de febre hemorrágica argentina (FHA) e doses de vacinas distribuídas em áreas endêmicas, 1958-2012 segundo Briggiler et al. 2015.

1.5.4. Controle do roedor reservatório - lições aprendidas com a Febre Hemorrágica Boliviana

Durante os anos de 1959-1962, casos isolados de uma doença conhecida como "tifo negro" foram observados principalmente entre os homens em áreas remotas do departamento de Beni na Bolívia. Os primeiros casos dessa doença ocorreram no início do ano de 1959 nos arredores da cidade de San Joaquín. No final da década de 1950, com a tentativa sistemática, por parte do governo, de estabelecer nesse departamento a agricultura de subsistência, houve aumento do número de casos da doença, culminando, em 1962, com a ocorrência de 107 casos e 44 óbitos (41% de letalidade) em uma vila de 600 habitantes, na cidade de Orobayaya. Os moradores abandonaram as suas residências, casas foram queimadas, animais e terras foram deixados para trás, já que as investigações do Ministério da Saúde boliviano e dos médicos locais não foram capazes de identificar a etiologia e de desenvolver uma estratégia de controle (Mackenzie et al. 1964a, Peters 2006). Até 1962, numa população de 4.000 a 5.000 habitantes das províncias de Itinez e Mamoré, aproximadamente 407 casos e 142 óbitos foram relatados ao Ministério da Saúde boliviano. No ano seguinte, a doença ultrapassou os arredores e avançou para o interior da cidade de San Joaquín, uma cidade que, na época, possuía cerca de 3.000 habitantes. Num período de um ano (1963 a 1964), ocorreram 637 casos (21% dos

habitantes infectados), em pessoas de diferentes sexos, idades e ocupações, com aproximadamente 18% de letalidade (Mackenzie et al. 1964b, Vainrub & Salas 1994b).

Com o aumento do investimento nas pesquisas e com o auxílio de instituições internacionais, em 1963, o vírus Machupo (MACV), agente etiológico da febre hemorrágica boliviana (FHBo), foi isolado do baço de um caso fatal (Johnson et al. 1965).

Com características antigênicas semelhantes ao JUNV, os estudos tomaram novos rumos a procura de padrões semelhantes aos da FHAr (Wiebenga 1965). Extensos estudos foram realizados com capturas de pequenos mamíferos e artrópodes, mas o vírus foi apenas isolado de roedores da espécie *Calomys callosus*. Assim, foi possível concluir que o MACV infecta cronicamente estes roedores e que a transmissão ocorre diretamente para os seres humanos, da mesma forma que o JUNV na Argentina (Johnson et al. 1966). A ligação definitiva entre o roedor e a FHBo foi realizada quando os roedores foram removidos em metade da cidade de San Joaquín, com o conseqüente desaparecimento da doença nesta região, cerca de duas semanas mais tarde, ao mesmo tempo em que os casos da FHBo continuaram sendo notificados na área sem remoção dos roedores (Kuns 1965, Mercado 1975).

A distribuição do roedor *C. callosus* inclui áreas secas e subúmidas do leste da Bolívia, norte da Argentina, Paraguai e no centro-oeste do Brasil (Nowak 1991). Independentemente do status taxonômico do gênero *Calomys*, estudos demonstram que as espécies de roedores reservatórios do MACV coletadas em Beni, possuem uma história evolutiva diferente, formando uma linhagem monofilética independente das outras encontradas na América do Sul, o que poderia explicar por que essa doença só ocorre no nordeste da Bolívia e não em toda a extensão onde essa espécie de roedor é encontrada e confirma o elevado grau de especificidade de hospedeiro encontrado entre arenavírus e seus mamíferos reservatórios (Salazar-Bravo et al. 2002). Corroborando com esses dados, uma análise de sequências do Tfr1 de roedores identificou resíduos que parecem ter sido selecionados positivamente e esses resíduos estão localizados no domínio de Tfr1 que interage com a GP do vírus MAC. Essas mutações que ocorrem naturalmente são capazes de prevenir a ligação do MACV, mantendo a funcionalidade Tfr1 (Demogines et al. 2013). Fato que chama a atenção, pois a maioria das mutações que conferem proteção contra a infecção faz isso com algum dano para o hospedeiro, devido à perda de funcionalidade da proteína. Estas variações são capazes de conferir proteção em roedores e variantes similares da infecção pelo MACV (Demogines et al. 2013).

Em estudos utilizando colônias de *C. callosus* criados em laboratório, os animais infectados ao nascerem com o MACV permaneceram infectados durante toda a vida, com

viremia e virúria persistentes, sem soroconversão. Esses animais também apresentaram uma diminuição da massa corporal e sua capacidade de reprodução foi reduzida em cerca de 95% (Justines & Johnson 1969, Webb et al. 1975a). Curiosamente, quando infectados na fase adulta, 50% dos animais foram capazes de eliminar a infecção enquanto a outra metade se manteve cronicamente infectada (Justines & Johnson 1969). Um achado interessante é que a maioria dos roedores *C. callosus* naturalmente infectados pelo vírus MAC apresenta esplenomegalia (Mercado 1975).

Roedores dos gêneros *Oryzomys* e *Proechimys* infectados experimentalmente desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o MACV, sem sinais aparentes de doença ou de cronificação da infecção (Johnson et al. 1965). O mesmo não foi encontrado durante as pesquisas em pequenos mamíferos da região onde, além do roedor *C. callosus*, nenhum outro animal foi encontrado naturalmente infectado pelo MACV (Johnson et al. 1966). Tentativas de infectar outros animais como gatos, galinhas, porcos, marsupiais e cavalos também não resultaram em infecção aparente e anticorpos neutralizantes foram encontrados apenas em cavalos e gatos (Webb et al. 1967).

As atividades agrícolas dominam a economia do norte da Bolívia, onde muitos trabalhadores estão empregados na agricultura e pecuária (Kilgore et al. 1995). Trabalhadores rurais residem por períodos prolongados em áreas rurais também habitadas por *C. callosus*, em casas de fazenda construídas com paredes parcialmente abertas que podem facilitar o acesso dos roedores ao domicílio. Assim, a exposição humana a roedores infectados pode ocorrer em torno de abrigos dos trabalhadores agrícolas ou durante o trabalho nos campos e pradarias da região onde a FHBo é endêmica (Mackenzie et al. 1964b, Kuns 1965, Kilgore et al. 1995).

Dentro dessa região, os animais infectados com o MACV foram encontrados em partes das províncias de Itenez, Mamoré e Yacuma do departamento de Beni, na Bolívia. Assim, como um problema de saúde pública, o controle de *C. callosus* foi restrito a uma parte do departamento medindo cerca de 28.000 km² e habitado, na década de 1960, por cerca de 50.000 pessoas. A criação de gado e a agricultura de subsistência eram, e ainda são, as principais ocupações da população residente nessa região. O transporte era feito por via fluvial, aéreo, a cavalo ou carro de bois. As quatro cidades onde o a maioria dos casos ocorreu são: Magdalena, San Joaquín, San Ramon, e Santa Ana, todas com populações entre 2000 e 5000 pessoas (Figura 1.9) (Kuns 1965).

No ano de 1964 a transmissão da FHBo diminuiu abruptamente, de uma média de 1,1 casos por dia para 0.24, após a implementação do controle dos roedores reservatórios no município de San Joaquín. Um total de 3.020 roedores (2.896 *C. callosus*) foi capturado, nas

primeiras três semanas do programa, e muitos mais, morreram em decorrência do uso, pelos agentes de controle, de fosfato de zinco (Kuns 1965). Com o sucesso deste procedimento, um programa regular foi mantido no qual cada casa foi inspecionada com 15 armadilhas por três noites consecutivas de cada mês. Cerca de 80 roedores do gênero *Calomys* foram capturados por mês, de agosto 1964 a março de 1965 (Mercado 1975).

No início de 1965, 24 novos casos de FHBo ocorreram em San Joaquín e todos foram fortemente correlacionados com as casas onde o maior número de roedores foram capturados. A maioria dessas casas estava localizada na área noroeste da cidade. A partir de março 1965 foram feitos intensos esforços para eliminar roedores nestas casas. O número de armadilhas triplicou, fosfato de zinco foi novamente utilizado por um curto período e cartolinas polvilhadas com talco foram colocados sob telhas curvas ao longo de potenciais caminhos de roedores e em torno das casas. Quando os agentes detectavam roedores do gênero *Calomys* que não foram capturados ou envenenados, expedições à noite eram realizadas, verdadeiras “caças” a esses animais, com armas de chumbinho (Mercado 1975).

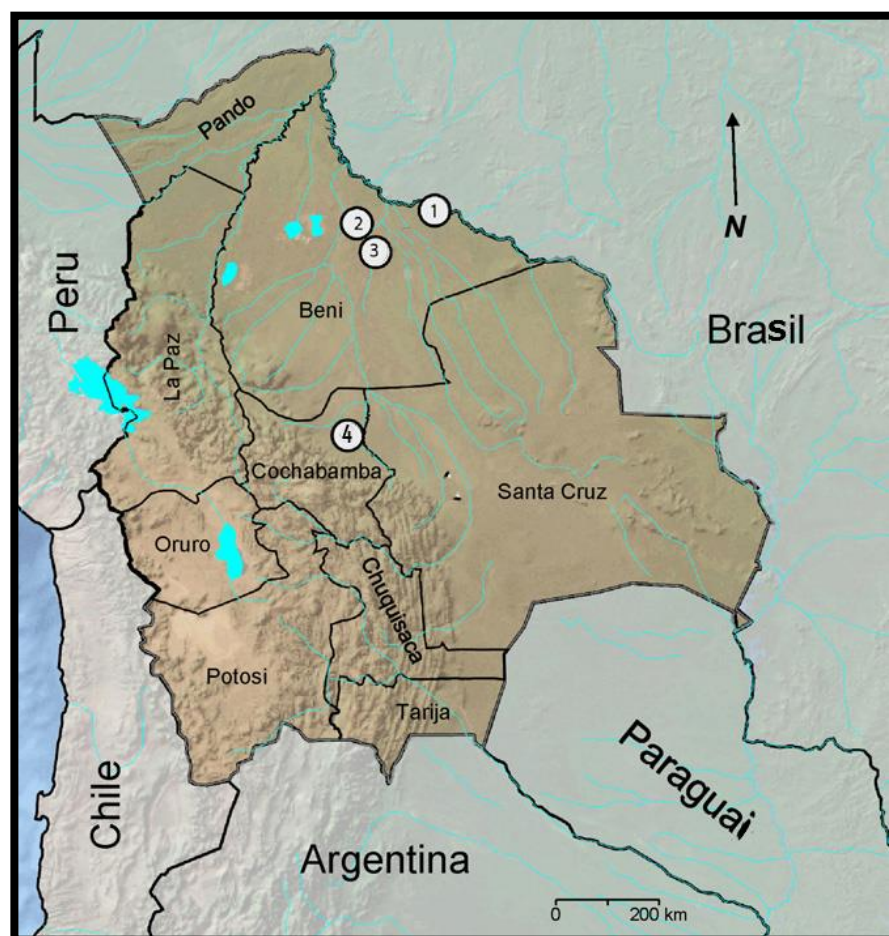


Figura 1.9. Mapa da Bolívia, os nove departamentos e as localidades (1) Magdalena (2) San Joaquín (3) San Ramón e (4) Chapare, onde ocorreram os casos de Febre hemorrágica boliviana (Adaptado de Cajimat et al. 2009).

O período de 1966 a 1968 representou uma fase de baixa atividade do MACV. Poucos roedores do gênero *Calomys* foram encontrados em San Joaquín e apenas dois possíveis casos, mas não comprovados, ocorreram. Em 1966, treze pacientes foram admitidos no hospital municipal, provenientes de quatro pequenas localidades ao sul da cidade. Oito deles eram da aldeia de Rio Negro (Anuário epidemiológico Boliviano, 2000). A maioria dessas pessoas negou ter tido uma doença grave num período prévio de um a dois meses. Um grande número de *C. callosus* foi capturado e mais de 30% dos animais testados apresentaram anticorpos específicos. Atividades de captura e envenenamento foram intensificadas nas regiões onde os casos ocorreram (Mercado 1975).

De 1966 a 1969 menos de 300 roedores *Calomys* foram capturados, provavelmente pelos seguintes fatos: (i) o principal e talvez o único reservatório natural do vírus Machupo seja o roedor *C. callosus*; (ii) *C. callosus* se adapta facilmente ao ambiente peridoméstico, com capacidade de invadir casas e jardins, alcançando densidades populacionais nestas circunstâncias que nunca são observadas na ausência do homem; (iii) uma vez que as densidades *Calomys* foram intensamente reduzidas, por conta das capturas e envenenamento, a população desse roedor foi mantida abaixo do limiar de infecção do vírus, necessária para a transmissão ao homem em uma cidade (Mercado 1975).

É importante mencionar que em San Joaquín, situado a cerca de uma milha do porto no rio Machupo, nenhum roedor da espécie *Rattus rattus* e pouquíssimos exemplares da espécie *Mus musculus* foram capturados. Mais do que 95% de todos os mamíferos capturados foram classificados taxonomicamente como *C. callosus* (Mercado 1975).

O ano de 1969 marcou o advento da segunda fase no desenvolvimento do programa de controle. Em janeiro e fevereiro de 1969, 10 casos de FHBo com seis mortes ocorreram na comunidade de La Cayoba, uma área de cultivo de arroz, 40 km ao norte de Magdalena. Muitos fugiram da comunidade e as pessoas restantes foram transferidas para uma fazenda de propriedade do governo, a 5 km de Magdalena. Acredita-se que Magdalena, ao contrário de San Joaquín, estava infestada de roedores da espécie *Mus musculus* (um fato descoberto em 1964 durante uma pesquisa realizada para determinar o motivo pelo qual só esta cidade não tinha epidemias de FHBo), fato que impediria a entrada dos roedores *C. callosus* (Kuns 1965, Mercado 1975). No entanto, a partir de março de 1969, a doença apareceu em Magdalena, com 22 casos naquele ano e 12 em 1970. Os casos ocorreram inicialmente em casas na periferia da cidade nos 24 blocos onde *C. callosus* foram predominantemente capturados enquanto *Mus musculus* eram muito mais numerosos nos 23 blocos internos. As autoridades responsáveis então decidiram adotar medidas de controle de base, liberando todos os roedores do gênero *Mus* e priorizando a captura apenas de *Calomys* (Mercado 1975).

O raciocínio era que o extermínio de *Mus musculus* poderia abrir o caminho para a penetração do *Calomys* para o centro da cidade. O rápido aumento de mais de uma espécie de roedores silvestres e o aparecimento de gambás nas periferias de Magdalena, durante a década de 1970, mostraram que a migração de outros animais para os limites da cidade representa um fenômeno recorrente (Mercado 1975). A ausência de epidemias de FHBo, nos anos seguintes, sugere que o controle de roedores focado em cidades da região endêmica impediu grandes surtos urbanos.

Em 1971 foi registrado o primeiro surto fora da área endêmica de FHBo, no departamento de Cochabamba localizado em áreas de maior altitude (aproximadamente 2,700 metros acima do nível do mar) onde não existe a descrição do roedor *C. callosus*. O caso índice foi uma estudante de enfermagem, com histórico de viagem para um rancho em Fortaleza e para capital do país (áreas não endêmicas), no departamento de Beni. Um total de cinco pessoas foi infectado, incluindo dois familiares que acompanharam o caso índice e três profissionais de saúde, duas enfermeiras e um patologista. Apenas um dos infectados sobreviveu, após semanas de doença grave. Altas concentrações do vírus foram detectadas no sangue e secreções dos pacientes infectados. Outra característica interessante deste surto foi a presença de icterícia em quatro pacientes, o que não é comum na FHBo (Peters et al. 1971). Estudos posteriores, concluíram que, possivelmente, o vírus envolvido nesse surto de Cochabamba tenha sido uma variante do vírus MAC, com a capacidade de causar doença com características imunológicas e histopatológicas semelhantes à FHBo clássica (Terrell et al. 1973, Patterson et al. 2014).

De 1975 a 1992 nenhum caso de FHBo foi notificado. Em março de 1993, um caso fatal foi registrado e em 1994, um surto foi identificado entre os membros de uma mesma família, residentes no município de Magdalena localizado no centro-norte da província de Itenez (Anuário epidemiológico Boliviano, 2000).

Durante o período de 4 de julho a 12 de agosto de 1994, sete membros da família, com idades entre 10 meses e 50 anos, desenvolveram uma doença caracterizada por febre, hipotensão, hemorragia subconjuntival e gengival, epistaxe, petéquias e tremores. Seis dos sete indivíduos infectados morreram e o caso índice foi o único sobrevivente. O diagnóstico de FHBo foi confirmado pelo isolamento do vírus MAC e pela detecção de antígenos virais em todos os cinco pacientes para os quais estavam disponíveis amostras. A captura de roedores na região, onde a provável exposição do caso índice a roedores infectados poderia ter ocorrido, resultou na captura de 84 roedores, apenas nove *C. callosus*, e nenhum roedor foi reativo para os testes realizados, demonstrando que a estratégia de controle de roedores implementada nas décadas anteriores ainda tinha efeito sobre a população de roedores daquela

região. Após a identificação desse surto familiar, um caso adicional envolvendo uma técnica de laboratório foi notificado às autoridades sanitárias bolivianas. Acredita-se que um tubo de ensaio contendo amostra sangue de um dos membros da família quebrou em uma centrífuga e expos uma técnica de laboratório de 37 anos de idade, em Santa Cruz. Em 11 dias a técnica desenvolveu uma doença febril aguda, mas o quadro retrocedeu após administração de ribavirina endovenosa. No mesmo ano, mais dois casos, não relacionados ao surto familiar, foram diagnosticados no departamento de Beni (Aguilar et al. 2009). Acredita-se que o reaparecimento da FHBo na década de 1990 tenha sido provocado pelas inundações que ocorreram em 1992 (Patterson et al. 2014) que provocaram a dispersão dos roedores reservatórios para novas áreas e a sua aglomeração em locais mais altos.

Nos anos seguintes, casos esporádicos de FHBo correram na área endêmica da doença. De 2007 a 2008, mais de 200 casos suspeitos, dos quais 15 fatais foram notificados ao serviço de saúde do departamento de Beni (Figura 1.10). Os casos confirmados eram em sua maioria homens com idades entre 19 e 46 anos, fazendeiros, provenientes das províncias de Itinez e Mamoré (Aguilar et al. 2009). A reemergência da FHBo nas décadas de 1990 e anos 2000, pode, em parte, ser explicada pela diminuição dos recursos alocados para o controle da FHBo devido à ausência de casos durante um período prolongado e também pelo aumento da demanda de outros problemas de saúde pública enfrentados pelo país como tuberculose, doença de Chagas e infecções sexualmente transmitidas (Kilgore et al. 1995). Outra explicação para este fato é que dado o crescimento econômico projetado para a Bolívia, é provável que o risco dos trabalhadores agrícolas para a exposição de *C. callosus* esteja aumentando à medida que o desenvolvimento modifica o habitat natural do roedor reservatório e aumenta a frequência do contato humano com estes animais (Kilgore et al. 1995).

Esforços para controlar a FHBo têm sido realizados com base na experiência da Argentina, onde o trabalho de vigilância epidemiológica em curso no país levou ao controle da FHAr, causada pelo JUNV, um arenavírus geneticamente relacionado ao MACV (Cajimat et al. 2009). O uso de uma vacina eficaz contra FHAr apresenta evidências de proteção cruzada contra o vírus MAC (Kilgore et al. 1995, Buchmeier et al. 2007) o que sugere que a vacinação pode desempenhar um papel importante na prevenção de FHBo para as pessoas com maior risco, como os profissionais do programa controle dos roedores reservatórios e trabalhadores agrícolas de áreas endêmicas.

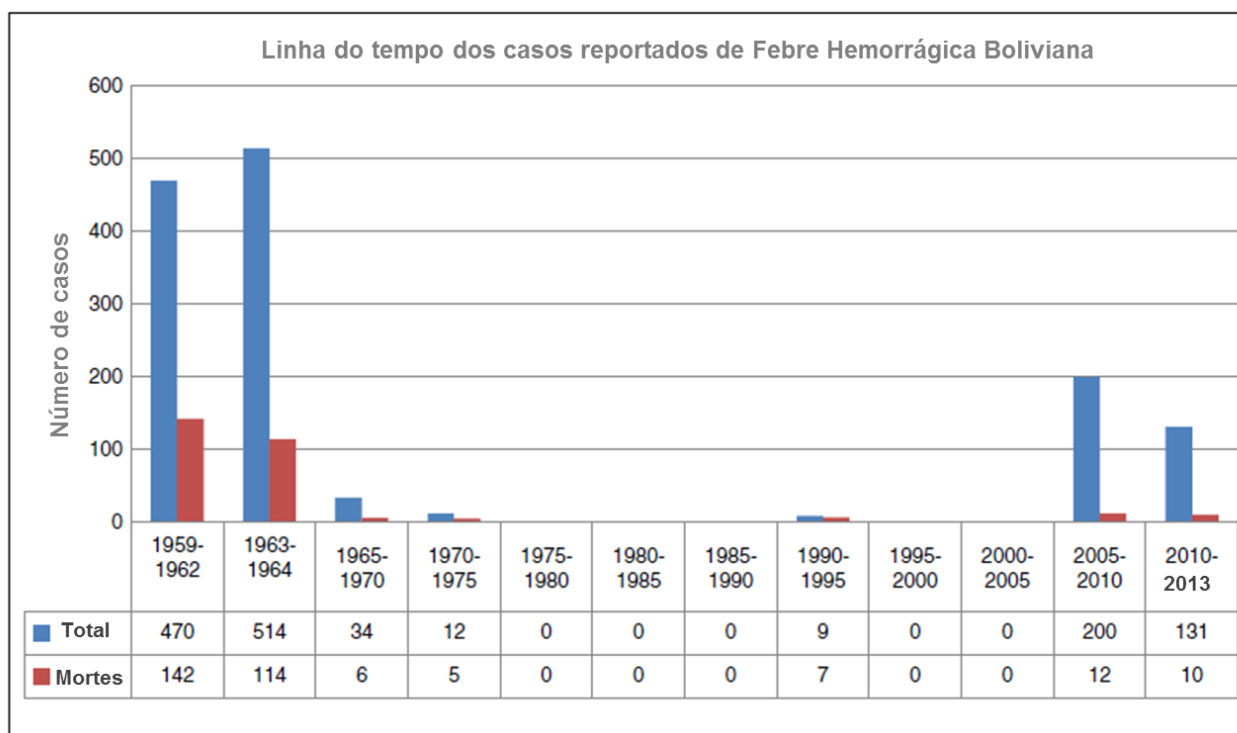


Figura 1.10. Casos de Febre Hemorrágica Boliviana de 1959 - 2013, Bolívia.
(Adaptado de Patterson et al. 2014).

O tratamento da FHBo é realizado com o suporte do paciente e a administração de plasma hiperimune e de ribavirina endovenosa. Assim, casos prováveis de FHBo podem se beneficiar do tratamento com plasma imune de outros casos de FHBo, se administrado logo após o início dos sintomas clínicos. A avaliação rigorosa da eficácia do plasma imune para a terapia de BHF tem sido limitada, em parte, pelo baixo número de doadores qualificados (Eddy et al. 1975, Villagra et al. 1994). Os anticorpos monoclonais, incluindo anticorpos monoclonais murinos humanizados, podem representar uma alternativa eficaz e segura para a terapia com plasma hiperimune. Obviamente, a fase inicial do desenvolvimento de anticorpos monoclonais para a terapia de FHBo deve incluir estudos para avaliar a capacidade dos anticorpos monoclonais individuais para neutralizar as diferentes variantes regionais de MACV e o potencial para o surgimento de mutantes de escape de neutralização *in vivo* (Cajimat et al. 2009, Radoshitzky et al. 2012).

1.5.5. Expansão de agricultura e descoberta da Febre Hemorrágica Venezuelana

Em setembro de 1989, no estado de Portuguesa na Venezuela, um surto de uma doença hemorrágica febril grave foi reconhecido. Os pacientes eram em sua maioria agricultores provenientes do município de Guanarito e apresentavam um quadro clínico

sugestivo de infecção viral, caracterizado por hemorragia e com manifestações neurológicas. Inicialmente, a maioria dos casos relacionados a esse surto foi diagnosticado como casos de dengue, já que em outubro do mesmo ano, o país enfrentava a sua primeira epidemia de dengue com manifestação hemorrágica causada pelos sorotipos 1, 2 e 4, com predomínio do tipo 2 (Salas et al. 1991).

No ano seguinte, 1990, quando os casos de dengue diminuíram, foi possível perceber a manutenção dos casos no município de Guanarito que, semelhante a diversas áreas rurais do estado de Portuguesa, apresentava uma evolução demográfica com alterações ecológicas que resultaram no aumento significativo na frequência de contato entre seres humanos e roedores. Neste cenário, foi possível observar que na Venezuela, ocorreu um acentuado aumento da utilização de campos nativos e das áreas florestadas para fins agrícolas ao mesmo tempo em que a densidade da população humana em áreas rurais de Portuguesa aumentou de 7,6 para 14,3 pessoas/km² no período de 10 anos (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1999, 2008).

Em 1991, Salas e colaboradores descreveram os primeiros casos de uma nova febre hemorrágica, a febre hemorrágica venezuelana (FHV), muito semelhante a outras febres hemorrágicas americanas, causadas por arenavírus, já conhecidas no continente americano. O agente etiológico da FHV, o vírus Guanarito (GTOV), membro do sorocomplexo Tacaribe, foi isolado de dois casos fatais ocorridos em 1990 (Tesh et al. 1994). Nos anos subsequentes, estudos eco-epidemiológicos, realizados nas áreas endêmicas de FHV, apontaram os roedores das espécies *Sigmodon alstoni* e *Zygodontomys brevicauda* como os potenciais reservatórios do GTOV (Tesh et al. 1993). Hoje sabe-se que o principal reservatório do GTOV é o roedor *Z. brevicauda* (Fulhorst et al. 1999).

A espécie *Z. brevicauda* (Figura 1.11), o rato da cana-de-açúcar, é um dos roedores mais abundante na região central de planícies (*llanos*) onde a FHV é endêmica. Este roedor está distribuído do litoral do pacífico ao oeste da Costa Rica, cruzando o Panamá, a Colômbia, a Venezuela, as Guianas e a região norte do Brasil (Voss 1991, Manzione et al. 1995, Bonvicino et al. 2008). Esta espécie de roedor especialista, que prefere coberturas herbáceas densas e arbóreas esparsas, habita campinas e campos de altitudes nas savanas (Cerrado) da floresta Amazônica e campos agrícolas. Voss (1991) descreve a espécie *Z. brevicauda* como um roedor oportunista que coloniza ambientes antropogênicos constituídos por vegetação invasiva. Esses roedores apresentam hábitos noturnos, estritamente terrestres, aparentemente onívoros e que se reproduzem durante todo o ano (Utrera & Duno 2007).



Figura 1.11. Roedor *Zygodontomys brevicauda*, reservatório do vírus Guanarito (Foto cedida pela Dr^a Cibele Bonvicino - Instituto Nacional do Câncer - INCA).

Um grande estudo realizado com roedores da Venezuela encontrou uma alta prevalência de *Z. brevicauda* em plantações de milho, sorgo, algodão e em vegetações das bordas destes plantios. A densidade da população deste roedor apresenta além de flutuações sazonais típicas, com um aumento durante a estação seca, atingindo níveis máximos no final da temporada, diminuindo durante a estação chuvosa com o desaparecimento quase total, flutuações cíclicas significativas a cada quatro ou cinco anos, que se correlaciona com os ciclos endêmicos e epidêmicos de FHV (Tesh et al. 1993, Manzione et al. 1995, Fulhorst et al. 1999, Utrera et al. 2000, Utrera & Duno 2007).

Acredita-se que GTOV pode estabelecer uma infecção crônica (ao longo da vida) no seu reservatório e que os animais cronicamente infectados excretam partículas virais infecciosas pela via urinária e em secreções de orofaringe (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1997). Os resultados de estudos de infecção experimental sugerem que a capacidade do GTOV para estabelecer o estado de portador crônico é dependente da idade do animal no início da infecção. Animais mais novos parecem incapazes de realizarem o *cleareance* do vírus, enquanto alguns dos animais adultos infectados, sob as mesmas condições, foram capazes de eliminar a infecção (Fulhorst et al. 1999). No mesmo estudo, nem letalidade ou doença foram associadas com a infecção crônica do roedor, sugerindo que a longevidade dos roedores cronicamente infectados, provavelmente, seja comparável à dos homólogos não infectados, apesar de ainda ser necessário determinar se a infecção crônica pode afetar outros parâmetros de aptidão do hospedeiro, como por exemplo, taxa de crescimento e da fecundidade (Fulhorst et al. 1999).

A transmissão do GTOV entre os roedores parece ocorrer principalmente por via respiratória, isto é, por inalação de aerossóis, por mecanismos comportamentais, acasalamento, agressão intra-espécie, entre outras atividades que envolvem contato físico (Milazzo et al. 2011). A falta de uma associação entre a incidência da infecção e sexo dos roedores na fase adulta sugere que os machos e as fêmeas contribuem igualmente para a transmissão do GTOV entre os roedores da espécie *Z. brevicauda*. A alta prevalência de infecção nas fêmeas adultas, juntamente com uma baixa prevalência de infecção nos roedores mais jovens, leva a hipótese de que a transmissão vertical de GTOV entre *Z. brevicauda* seja incomum (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1999, Milazzo et al. 2011).

Outras espécies de roedores presentes na região de planícies na Venezuela suscetíveis à infecção pelo vírus da Guanarito são: *Sigmodon alstoni*, *Oligoryzomys fulvescens* e *Oryzomys* spp. (Salas et al. 1991, Weaver et al. 2000, Milazzo et al. 2011). Apesar de aparentemente suscetíveis, acredita-se que estes roedores sejam hospedeiros finais, portanto, possuem importância limitada na manutenção do ciclo enzoótico do GTOV na região. Estes casos de *spillover* foram associados, embora considerados eventos raros e incomuns, às interações sociais íntimas entre o roedor reservatório *Z. brevicauda* e outras espécies de roedores (Fulhorst et al. 1999, Milazzo et al. 2011).

A presença de roedores infectados pelo GTOV foi identificada nos estados de Apure, Barinas, Cojedes, Guárico e Portuguesa, o que indica que GTOV já circulava na forma enzoótica muito antes de 1989 (Fulhorst et al. 2008). Até o momento, todos os casos prováveis e confirmados de FHV têm ocorrido entre as pessoas que residem nas porções sul e sudoeste do estado Portuguesa, regiões adjacentes do estado Barinas e a região centro-oeste do estado de Guarico (Figura 1.12) ou que visitaram recentemente essas áreas da Venezuela. A distribuição focal da doença e seu padrão geográfico de infecção não mudaram durante os últimos anos (Salas et al. 1991, de Manzione et al. 1998).

A área reconhecida como endêmica de FHV ocupa mais de 9,000 km². A população humana da região endêmica FHV no estado de Portuguesa é de aproximadamente 300.000 habitantes, com aproximadamente 150 mil pessoas que vivem em Guanare, capital do estado, e outros 8.000 vivem na cidade de Guanarito. O restante da população (aproximadamente 142,000) vive em áreas rurais, a maioria envolvida na agricultura e/ou pecuária. No entanto, muitos dos moradores de Guanare e Guanarito possuem ou trabalham em fazendas em regiões rurais do estado, podendo entrar contato com de roedores reservatórios do GOTV (Tesh et al. 1993). As principais plantações da região são o milho, sorgo, algodão, arroz, girassol, cana-de-açúcar, melões e feijão. Durante as épocas de plantio e colheita, um grande número de

agosto de 1996 houve uma diminuição do número de casos, quando apenas nove casos ocorreram durante este segundo período (36 meses). No entanto, a partir de setembro de 1996, a incidência mensal da FHV aumentou novamente com ocorrência de casos durante o mês de maio de 1997 (de Manzione et al. 1998). Após um novo surto que se iniciou em 2001 e que culminou com 301 casos durante o período de 2001 a 2003, a doença tem se mantido com o número de casos reduzidos e com alguns surtos esporádicos (Vargas 2013).

Como observado anteriormente, a maioria da população residente nas áreas endêmicas de FHV está envolvida com algum tipo de atividade agrícola. A maioria dos indivíduos acometidos é do sexo masculino, cuja ocupação está relacionada com a agricultura, enquanto as mulheres são, em sua maioria, donas de casa. Essa diferença presumida pela exposição ocupacional aos roedores potencialmente infectados pode explicar em parte a preponderância do sexo masculino entre os casos de FHV. Por outro lado, as mulheres que vivem em áreas rurais da região, muitas vezes trabalham nos campos durante a época de colheita, por exemplo, colhendo algodão, de modo que elas têm alguma exposição aos roedores potencialmente infectados (Salas et al. 1991, de Manzione et al. 1998).

Assim, sob o ponto de vista clínico-epidemiológico, a FHV acomete predominantemente homens, adultos com idade média de 27,6 anos e o quadro clínico não é diferente das descrições clínicas das outras febres hemorrágicas por arenavírus americanos. Da mesma forma, os resultados hematológicos iniciais nos casos de FHV são semelhantes, e a trombocitopenia é o achado hematológico mais consistente. A contagem inicial de plaquetas parece não ter nenhuma relação com o desfecho do caso. Em contraste, os pacientes que são admitidos nos hospitais com convulsões ativas ou história de convulsões recentes, o prognóstico geralmente é ruim. Nenhuma terapia antiviral específica foi dada a nenhum dos pacientes com FHV. O tratamento varia consideravelmente, dependendo do estado clínico dos pacientes (de Manzione et al. 1998) e aqueles que se recuperam, geralmente, não apresentam sequelas, apesar dos relatos de perda da audição e alopecia (Salas et al. 1991).

Quanto às medidas de prevenção, a eliminação da grama alta e outras vegetações nas proximidades das habitações humanas e áreas de trabalho, por exemplo, como nos campos cultivados, para controlar FHV também pode auxiliar na prevenção da infecção pelo GTOV em seres humanos (Fulhorst et al. 1999).

1.5.6. Arenavírus no Brasil e a Febre Hemorrágica Brasileira

Até o início do presente projeto, cinco espécies de arenavírus foram descritas no Brasil: (i) vírus Amaparí, isolado de roedores da espécie *Neacomys guianea* capturados no

Amapá (ii) vírus Cupixi em *Hylaeamys megacephalus* (= *Oryzomys capito*), também no Amapá (iii) vírus Flexal (*Oryzomys* sp.), no Pará (iv) vírus Pinhal (*Calomys tener*) e (v) vírus Sabiá, agente etiológico da febre hemorrágica brasileira (FHBr), identificado no estado de São Paulo (Pinheiro et al. 1966, 1977, Charrel et al. 2002, Coimbra et al. 1994, Charrel & Lamballerie 2010, Bisordi et al. 2015).

A FHBr foi descrita na década de 1990, até o momento, apenas três casos foram registrados, uma infecção natural e duas infecções laboratoriais subsequentes no Brasil e nos Estados Unidos. O caso índice foi uma engenheira agrônoma de 25 anos que procurou assistência médica no dia 12 de janeiro 1990, após 12 dias de febre, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos e fraqueza. Com um quadro de sonolência associado à desidratação e à hiperemia de orofaringe, os exames laboratoriais realizados indicavam leucopenia e níveis de aspartato aminotransferase ligeiramente elevados (Lisieux et al. 1994).

A história epidemiológica da paciente não apresentava nenhum fato que chamasse atenção. Ela trabalhava em um escritório, na cidade de São Paulo, não tinha viajado para fora do estado nos dois meses antes do início da doença, mas tinha história de ter viajado com a família e amigos para o interior do estado dez dias antes do início das manifestações clínicas. Com as hipóteses diagnósticas de sepse, leptospirose, malária, hepatite e febre amarela, foi iniciado tratamento de suporte com antibioticoterapia empírica. No entanto, no terceiro dia de internação, o quadro da paciente se agravou com o surgimento de hematêmese, hemorragia vaginal e petéquias conjuntivais. O quadro neurológico evoluiu com aumento da sonolência, surgimento de tremores, dificuldade em andar e convulsões generalizadas, culminando com coma e choque, sem resposta ao tratamento. A morte ocorreu no quarto dia de internação. Os principais achados da necropsia foram edema pulmonar difuso e congestão com hemorragias intraparenquimatosas associada à congestão hepática com hemorragia e necrose focal, além de edema renal e necrose tubular aguda, aumento e congestionamento do baço e hemorragia gastrointestinal maciça (Lisieux et al. 1994).

A amostra de sangue coletada pouco antes da morte foi encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz, onde foi inoculada por via intracerebral em camundongos recém-nascidos. Um agente foi isolado a partir de cérebros de camundongos doentes e convalescentes. O agente detectado não reagiu com soros imunes preparados para os vírus humanos patogênicos comumente encontrados no Brasil. Assim, as amostras foram então encaminhadas para o Instituto Evandro Chagas em Belém e, em seguida, para a Unidade de Pesquisa de Arbovírus em Yale e para o Instituto de Pesquisa Médica de Doenças Infecciosas do Exército dos EUA. Testes imunológicos e virológicos comprovaram que se tratava de um novo vírus, pertencente à família *Arenaviridae* (gênero: *Mammarenavirus*). Este novo agente foi nomeado vírus Sabiá

(SABV), o nome do bairro (Jardim Sabiá) do município de Cotia (Figura 1.13), onde a paciente estava hospedada antes de adoecer. A fonte de infecção ainda continua desconhecida, mas parece provável que o vírus Sabiá seja mantido na natureza em reservatório roedor silvestre, ainda não identificado (Lisieux et al. 1994, Gonzalez et al. 1996).



Figura 1.13. Mapa da região metropolitana de São Paulo destacando município de Cotia e a capital do estado, a cidade de São Paulo.

Durante a caracterização do vírus, em Belém, em junho de 1992, o segundo caso foi identificado em um técnico de laboratório, de 39 anos de idade, que foi infectado provavelmente por inalação de aerossol. O profissional foi infectado acidentalmente, três semanas antes do início do quadro clínico, durante a passagem do vírus para preparação de antígeno utilizando cérebros de camundongos recém-nascidos infectados com amostras de sangue do caso índice. O profissional apresentou doença grave com febre alta (38-40°C), calafrios, mal-estar, cefaleia, mialgia generalizada, odinofagia, conjuntivite, náuseas, vômitos, diarreia, dor epigástrica, ulcerações da mucosa oral e sangramento discreto das gengivas ao realizar higiene bucal, por 15 dias. Sem outra manifestação neurológica que não tenha sido a cefaleia, os resultados dos exames laboratoriais do paciente mostraram leucopenia e linfocitose gradativas à medida que a doença evoluía. A administração de fluidos intravenosos foi necessária e o paciente se recuperou. A soroconversão para SABV foi demonstrada em

soros pareados das fases aguda e convalescente, por diferentes testes sorológicos (Vasconcelos et al. 1993, Lisieux et al. 1994).

O segundo incidente envolvendo uma exposição humana ao SABV, ocorreu na Universidade de Yale na Unidade de Pesquisa de Arbovírus, em agosto de 1994. Um virologista de 46 anos foi exposto quando purificava um grande volume de fluido de cultura de tecidos. A avaliação do paciente possibilitou sugerir que a exposição ocorreu durante a utilização de uma centrífuga enquanto ele trabalha sozinho em um laboratório de nível de biossegurança 3 (NB-3). O equipamento continha seis frascos de policarbonato com tampa de rosca com cerca de 200 mL de fluido de cultura de tecidos. Ao abrir a tampa do rotor para remover os frascos da centrífuga, ele observou que a parte externa de um dos frascos estava molhada e que o fluido havia vazado para o fundo do rotor. Nenhuma ruptura óbvia foi identificada no momento e o virologista usava, no momento, uma máscara cirúrgica, um jaleco descartável e luvas. O profissional não possuía escoriações ou arranhões em suas mãos e usou um segundo par de luvas durante a descontaminação do rotor com solução concentrada de hipoclorito de sódio, mas não usou um respirador purificador de ar de pressão positiva, apesar de estar disponível. (Barry et al. 1995, Gonzalez et al. 1996).

Oito dias após o incidente no laboratório, o virologista observou mialgias, uma leve dor de cabeça, rigidez no pescoço e febre, associados com hiperemia conjuntival e leve aumento dos linfonodos cervicais. Ele foi internado imediatamente após os clínicos relacionarem o incidente da centrífuga com uma possível infecção ocupacional ao SABV e iniciaram o tratamento com ribavirina intravenosa na dose utilizada pelos Centros de Controle de Doenças (CDC) para outras infecções por arenavírus - uma dose de ataque de 30 mg por quilograma de peso corporal, seguida por uma dose de 15 mg por quilograma cada seis horas durante quatro dias, e, em seguida, por uma dose de 7,5 mg por quilograma três vezes ao dia durante seis dias. Após a confirmação, por PCR, da infecção pelo SABV, o paciente foi transferido para um quarto de isolamento de pressão negativa e só foi liberado depois da recuperação do paciente, duas semanas após o início do quadro clínico. Todos os contatos do paciente foram identificados e estratificados em grupos risco. Foram identificados 139 contatos, consistindo de trabalhadores que prestaram assistência ao paciente, técnicos do laboratório do hospital, os colegas, amigos e membros da família. Todos os contactantes foram incluídos em um programa de vigilância médica, que consistiu em uma coleta de sangue para realização de testes sorológicos e preenchimento de questionário epidemiológico, na data do ocorrido e seis semanas depois. Nenhum dos indivíduos apresentou quadro ou exames que comprovassem infecção pelo SABV (Barry et al. 1995).

1.5.7. O Silêncio das Febres Hemorrágicas Americanas: o vírus Chapare na Bolívia

No final do ano de 2003, um pequeno surto de casos de febre hemorrágica em uma área rural próxima ao rio Chapare, no departamento de Cochabamba, na Bolívia, no leste dos Andes (Figura 1.9) foi identificado pelo Ministério da Saúde da Bolívia. Os detalhes exatos, assim como o número de casos e os sintomas apresentados, são poucos e confusos. No entanto, existe a descrição de um caso fatal envolvido, neste surto, de um homem de 22 anos, alfaiate e fazendeiro, morador de uma pequena cidade, Samuzabeti, localizada a 35 km a nordeste da Villa Tunari. Ele não possuía histórico de viagem e nem contato com qualquer caso de doença compatível por pelo menos quatro semanas antes do início da doença no dia 3 de janeiro de 2004. Além disso, nenhum membro da família ou outros contatantes próximos apresentaram manifestações clínicas semelhantes (Delgado et al. 2008).

Com um quadro clínico inicial caracterizado por febre, cefaleia, artralgia, mialgia e vômitos, o paciente evoluiu para um quadro hemorrágico que culminou em óbito 14 dias após o início da febre. Com base nas manifestações clínicas, a suspeita inicial foi de febre amarela ou dengue hemorrágico. Como os testes iniciais para estes agentes foram negativos assim como a análise sorológica e molecular para o vírus MAC ou arenavírus relacionados (Delgado et al. 2008), amostras de soro de fase aguda do paciente foram enviadas para o laboratório NB-4 da divisão especial de contenção de patógenos em Atlanta para a identificação do agente etiológico. No isolamento em células Vero E6 foi identificado um vírus não citopático. Uma reação cruzada com o soro hiperimune de arenavírus causadores de FHA foi identificada por imunofluorescência. A análise molecular do RNA do vírus isolado apresentou sequências nucleotídicas relacionadas aos arenavírus da Clade B do NM. O novo vírus foi denominado Chapare, o terceiro arenavírus detectado na Bolívia (junto com os vírus Machupo e Latino). A partir das análises das sequências nucleotídicas, foi possível observar que o Chapare está estritamente relacionado com o SABV. A relação desse novo vírus boliviano como vírus SABV do Brasil é intrigante. Ambos causam febres hemorrágicas semelhantes às causadas pelos vírus JUN, MAC e GTO, com uma forte associação com a extensa necrose hepática. O envolvimento mais amplo do fígado pode ser uma característica comum entre esses dois vírus, já que esse tipo de comprometimento não é comumente observado nas demais FHA causadas pelos outros arenavírus do NM. Assim como no caso do SABV, ainda não foi possível identificar o reservatório deste vírus (Delgado et al. 2008, Cajimat et al. 2009).

2. JUSTIFICATIVA

No campo é onde se encontra 47% da população alvo do programa Brasil Sem Miséria, com cerca de 7,6 milhões de pessoas concentradas especialmente nas regiões nordeste e norte do país. Essa população é constituída por agricultores familiares, assentados da reforma agrária, acampados, assalariados rurais, extrativistas, pescadores, quilombolas, indígenas e outros povos, além de comunidades tradicionais. Para atender a essa população e com o objetivo principal de fortalecer e expandir a agricultura familiar, estratégias específicas têm sido elaboradas e implementadas pelo referido programa, com perspectivas de alcançar milhões de famílias (Campello et al. 2014).

O Brasil se destaca pela sua extensão territorial, seus diferentes biomas e sua grande biodiversidade em relação aos outros países da América Latina. Dos 80,25 milhões de hectares de área da agricultura familiar no Brasil, 45% destinam-se às pastagens; 28% são compostos por matas, florestas ou sistemas agroflorestais e 22%, por lavouras (França 2009). Cabe ressaltar que devido à utilização da terra para fins agrícolas na maior parte do país, um processo de fragmentação acelerado vem sendo observado em todo território (Ribeiro et al. 2009). Esta situação põe em risco a grande diversidade e aumenta o impacto na dinâmica de transmissão das doenças zoonóticas que, com maior frequência, acometem populações de áreas rurais e de regiões de transição entre o ambiente rural e silvestre.

Este cenário de acelerada fragmentação estimulada pela agricultura foi o mesmo vivenciado em outros países com ocorrência de febres hemorrágicas por arnavírus (FHA), constituindo, assim, um fator determinante para a emergência dessas doenças como exemplificado: (i) Na Bolívia, no fim da década de 1950, foi impulsionado por mudanças políticas, quando houve uma tentativa sistemática, por parte do governo, de estabelecer a agricultura de subsistência no departamento de Beni. Neste contexto, foi então que a febre hemorrágica boliviana chamou a atenção das autoridades sanitárias, com 407 casos confirmados e 142 óbitos, até 1962, numa população de 4000 a 5000 habitantes das províncias de Itinez e Mamoré (Jhonsson et al. 1965, Aguilar et al. 2009). (ii) Na Venezuela, durante o período no qual a febre hemorrágica venezuelana foi reconhecida pela primeira vez, a região passava por um processo de evolução demográfica e ecológica nas áreas rurais de Portuguesa. Com o aumento da densidade da população humana em áreas rurais de Portuguesa (de 7,6 a 14,3 pessoas/km² no período de 10 anos), que terminou em 1990, aumentou a utilização de campos nativos e das áreas florestadas para fins agrícolas, o que, conseqüentemente, resultou em um aumento significativo na frequência de contato entre a população humana e os roedores (Tesh et al. 1993).

A dificuldade na identificação das arenaviroses pelos profissionais de saúde é outro ponto que merece destaque, considerando que o Brasil possui um grande número de doenças endêmicas com características clínicas e epidemiológicas semelhantes às FHAs, entre elas dengue, febre amarela e malária, e que nem sempre são identificadas com base no diagnóstico etiológico laboratorial, especialmente durante epidemias. Situação semelhante foi observada na Venezuela, onde a maioria dos casos de FHA causada pelo vírus Guanarito foi diagnosticada, inicialmente, como dengue durante a primeira epidemia da doença no país (Salas et al. 1991).

Não obstante as informações apresentadas acima, outro programa que precisa ser considerado neste contexto é o Programa de Apoio à Conservação Ambiental, mais conhecido como Bolsa Verde. Desenvolvido para famílias extremamente pobres que vivem em áreas consideradas prioritárias para a conservação do meio ambiente, o programa beneficia famílias que se comprometem a manter a vegetação e a fazer uso sustentável dos recursos naturais dessas áreas (Perdigão & Costa 2006). Diante da possibilidade de emergência da FHA, é fortemente recomendado que este programa esteja integrado à prevenção das arenaviroses e a outras doenças transmitidas por roedores, em regiões de interface agrícola/silvestre, uma vez que a mudança no habitat silvestre por conta de desastres naturais, desmatamentos e queimadas, entre outros fatores, pode favorecer o aumento da ocorrência destas zoonoses. Diante do exposto, este trabalho se propõe a contribuir com o conhecimento dos mamarenavírus em animais silvestres e em populações consideradas de alto risco no Brasil.

Por fim, esta proposta também fornece subsídio às ações de prevenção e de controle das doenças transmitidas por roedores junto aos projetos de combate à extrema pobreza do Ministério do Desenvolvimento Social e de combate à fome.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de mammarenavírus em roedores silvestres e em populações humanas que estão, possivelmente, sob risco, subsidiando a sustentabilidade dos projetos de incentivo à agricultura familiar, no contexto da prevenção de doenças transmitidas por roedores.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;
- ✓ Estudar, utilizando técnicas histopatológicas e de ultraestrutura, os tecidos de animais infectados;

3.2.2. Analisar as relações filogenéticas entre os arenavírus e membros da família *Bunyaviridae*.

- ✓ Realizar análises filogenéticas a partir de sequências nucleotídicas obtidas em bases de dados para verificar a relação entre os arenavírus e os bunyavirus, em especial os nairovirus.

3.2.3. Pesquisar a ocorrência de infecções por mammarenavírus em diferentes populações, consideradas de risco, em regiões onde a circulação desses vírus em roedores tenha sido confirmada.

- ✓ Realizar inquéritos sorológicos em populações de agricultores familiares e em populações residentes em ambientes de interface rural e silvestre;
- ✓ Descrever aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por mammarenavírus.

3.2.4. Restituir os resultados para os serviços de saúde visando à incorporação de ações de prevenção e controle das arenavíroses à vigilância integrada das doenças transmitidas por roedores, como hantavíroses, peste e leptospirose, em conjunto com as ações já implantadas pelo Brasil sem miséria.

- ✓ Elaborar notas técnicas e/ou informativos para profissionais da área da saúde e do meio ambiente visando esclarecer, com foco na prevenção, sobre a possibilidade de ocorrência da arenavirose e sua associação com roedores, de maneira que a doença possa ser reconhecida com a realização do diagnóstico e tratamento precoces;
- ✓ Elaborar materiais informativos e educativos para comunidade agrícola das regiões estudadas com foco na prevenção de doenças transmitidas por roedores.

4. MATERIAIS/MÉTODOS E RESULTADOS

Baseado nos objetivos do presente estudo, as seções apresentadas a seguir estão divididas em três eixos: *(i)* Detecção e caracterização de mamarenavírus em animais silvestres; *(ii)* Estudos soropidemiológicos em populações rurais e *(iii)* Restituição de resultados e estratégias de educação em saúde. Os resultados dos objetivos específicos que se encontram listados nos dois primeiros eixos, assim como materiais e métodos, serão apresentados sob a forma de manuscritos publicados, ou submetidos à publicação em revistas indexadas. Quanto aos produtos gerados pelo terceiro eixo, estes se encontram expostos na forma de folder, cartilha e de notas técnicas, uma já publicada e outra em fase de revisão para posterior submissão.

4.1. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MAMMAREVÍRUS EM ANIMAIS SILVESTRES NO BRASIL

A escolha dos estados para o desenvolvimento do presente estudo foi determinada pelos resultados obtidos em pesquisas previamente realizadas pelo grupo do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses (LHR) do Instituto Oswaldo Cruz, que apontavam para a presença de mammarenavírus na região Centro-Oeste do Brasil. A inclusão de outros estados e regiões ocorreu posteriormente, a partir de novos resultados gerados durante a execução deste trabalho.

Os roedores inseridos nesse eixo do estudo foram capturados durante expedições de campo independentes, conduzidos em diferentes estados brasileiros durante os anos de 2003 a 2015. Amostras de sangue foram coletadas após anestesia e os dados bionômicos foram obtidos, subsequente à eutanásia. Durante a necropsia, um ou mais órgãos foram coletados (pulmão, rim, baço, fígado e coração) de cada espécie capturada e armazenados individualmente em freezer -80°C, nitrogênio líquido, *RNAlaterTM* ou em *TRizol[®]* e transferidos para o LHR. Todos os procedimentos envolvendo os roedores seguiram os procedimentos de biossegurança recomendados (Lemos & D'Andrea 2014). Licenças e aprovação do comitê de ética em pesquisa animal se encontram listados nos artigos nas seções de metodologia e anexo 9.2.

Para todos os artigos que compõem este eixo, os critérios de inclusão das amostras de roedores que foram utilizadas neste estudo foram: (i) possuir dados bionômicos completos dos roedores; (ii) possuir amostras de soro/sangue e baço, fígado e/ou rim e (iii) ter sido previamente submetidas à análise laboratorial para a pesquisa de hantavírus no LHR.

Considerando que técnicas que resultam em uma maior liberação de aerossóis, determinam um maior risco para o manipulador e o ambiente, os procedimentos relacionados com o isolamento viral foram executados em laboratórios de nível de biossegurança de nível 3 do Laboratório de Virologia e Patogênese do Public Health England (PHE - Porton Down, UK), durante período do doutorado sanduíche no exterior concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em 2017, sob a orientação do Dr Roger Hewson.

4.1.1. Artigo 1 - Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.1.** Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos, coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo específico:

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista *Infection Genetics and Evolution*

Fator de Impacto da Revista: 2,8

Referência: Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, de Carvalho Serra F, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Cunha RV, Levis S, de Lemos ER. Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species. *Infect Genet Evol.* 2015; 33:242-45.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Short communication

Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species



Jorlan Fernandes^{a,*}, Renata Carvalho de Oliveira^a, Alexandro Guterres^a, Fabiana de Carvalho Serra^a, Cibele Rodrigues Bonvicino^{b,c}, Paulo Sergio D'Andrea^c, Rivaldo Venâncio Cunha^d, Silvana Levis^e, Elba Regina Sampaio de Lemos^a

^a Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

^b Instituto Nacional do Câncer, Brazil

^c Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

^d Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^e Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2015

Received in revised form 6 May 2015

Accepted 9 May 2015

Available online 11 May 2015

Keywords:

South America arenaviruses

Rodent borne diseases

Wild rodents

ABSTRACT

Clade C, of the New World Arenaviruses, is composed of only the Latino and Oliveros viruses and, besides the geographic range of their rodent reservoirs, the distribution of these viruses has been restricted to Bolivia and Argentina. In this study, the genetic detection and phylogenetic analysis of the complete S segment sequences of sympatric arenaviruses from Brazil revealed a new geographic distribution of clade C arenaviruses, as well as the association of Oliveros virus with a new rodent reservoir.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Arenaviruses are members of the family Arenaviridae that consists of two different genera (*Mammarenavirus* and *Reptarenavirus*) that currently comprises 30 viral species, as recognized by the International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) (http://ictvdb.bio-mirror.cn/ictv/fs_arena.htm [accessed 12 April 2015]). The geographic distribution of each arenavirus is assumed to be determined by the range of its reservoir species (Salazar-Bravo et al., 2002; Charrel and Lamballerie, 2010). The *Arenavirus* genus is phylogenetically and serologically divided into two main complexes: the LCMV–Lassa virus complex with all arenaviruses from the Old World, and the Tacaribe virus serocomplex that includes all viruses indigenous to the New World. The latter is the most genetically diverse group of the genus, composed of 18 species divided into four lineages: clade A, A-recombinant, B and C, according to their phylogenetic relationships (Charrel and Lamballerie, 2010; Charrel et al., 2008; Emonet et al., 2009).

Clade C New World Arenaviruses are the smallest lineage within the genus, with currently only two described members, the Latino (LAT) and Oliveros (OLV) viruses, hosted by *Calomys*

callosus in Bolivia and *Necomys benefactus* in central Argentina, respectively (Rowe et al., 1970; Bowen et al., 1996a; Mills et al., 1996) (Fig. 1). In this study, we identified an expanded geographic distribution of these viruses, as well as the association of OLVV to a new rodent reservoir, *Necomys lasiurus*.

Small mammals trapping fieldwork was conducted in a rural area of Sidrolândia (20°55'55"S/54°57'39"W) and Dois Irmãos do Buriti (20°40'47"S/55°17'46"W) municipalities, in September 2005 and in January 2006, respectively. Those municipalities are situated in the Cerrado (savanna-like) area in Mato Grosso do Sul State of Brazil, where there is no description of arenavirus presence to date, although they are near regions where circulation of those viruses is well documented (Fig. 1). Each capture station was sampled with Sherman® (7.62 cm × 9.53 cm × 30.48 cm) and Tomahawk® (40.64 cm × 12.70 cm × 12.70 cm) live traps, placed 10 m apart, in linear ground transects of 20 capture stations, 270 traps per capture night. Small mammals were captured and handled according to recommended safety procedures (Mills et al., 1995). Seventy-two wild animals were captured (66 from Sidrolândia and six from Dois Irmãos do Buriti). *C. callosus* was the most frequently captured rodent (28 specimens), followed by *N. lasiurus* (21 specimens) (Table 1). The wild-caught animals were identified by external and cranial morphology and confirmed by karyotype and DNA analysis (Oliveira and Bonvicino, 2006;

* Corresponding author at: Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: jorlan@ioc.fiocruz.br (J. Fernandes).

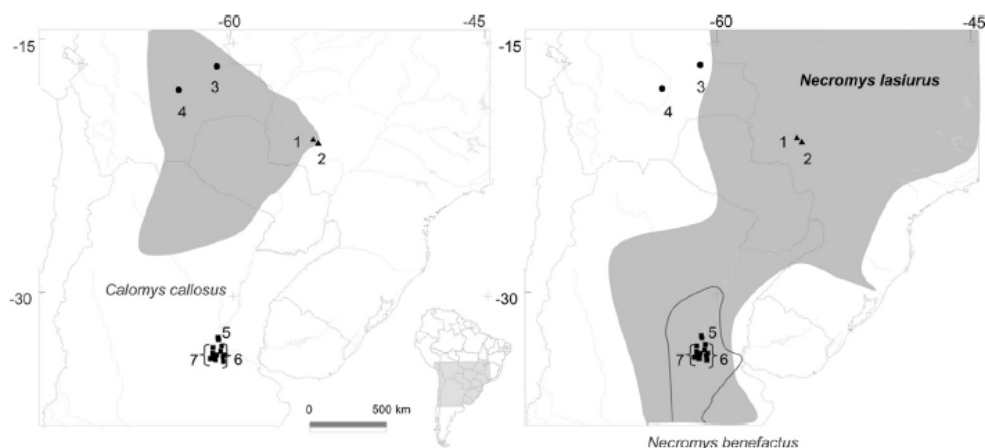


Fig. 1. Geographic distribution of Clade C New World Arenaviruses and their rodent hosts in South America. *Calomys callosus* (left map, dark gray area), *Necromys lasiurus*, *N. benefactus* (right map). Square = Oliveros virus (OLVV) detection, circle = Latino virus (LATV) detection, triangle = co-circulation of OLVV and LATV. Brazil, Mato Grosso do Sul: (1) Dois Irmãos do Buriti, (2) Sidrolândia (present study). Bolivia, Santa Cruz: (3) San Ignacio, (4) Juan Latino (Cajimat et al., 2009). Argentina, Buenos Aires: (5) Oliveiros; Santa Fé: (5) Maciel, Pampa; (6) General Gelly, J.B. Molina, Maximo Paz, Pergamino, Uranga; (7) Alcorta, Bigand, Casilda, Chovet, Labordeboy, Wheelwright (Mills et al., 2007).

Table 1

Small mammal species collected on the two study sites and the results of arenavirus infection by RT-PCR in Mato Grosso do Sul State, Brazil.

Species	No. of captured rodents		RT-PCR no. (prevalence%)
	Sidrolândia	Dois Irmãos do Buriti	
<i>Calomys callosus</i>	27	1	19 (67.8) ^a
<i>Cerradomys maracajuensis</i>	5	1	0
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	2	0	0
<i>Marmosa murina</i>	2	0	0
<i>Necromys lasiurus</i>	21	0	3 (14.2) ^b
<i>Nectomys squamipes</i>	3	0	0
<i>Oecomys catharinae</i>	0	2	0
<i>Oligoryzomys sp.</i>	2	0	0
<i>Oxymycterus delator</i>	2	0	0
<i>Thrichomys fosteri</i>	2	1	0
<i>Thylamys macrurus</i>	0	1	0
Total	66	6	21 (29.2%)

^a Prevalence of Latino virus.

^b Prevalence of Oliveros virus.

Bonvicino et al., 1996; Cassens et al., 2000). Tissue samples were collected and frozen immediately without any kind of medium. Sample specimens were deposited in the Rio de Janeiro National Museum.

Viral RNA was obtained using the PureLink Micro-to-Midi total RNA purification kit (Invitrogen, San Diego, CA) from frozen spleen or liver samples of all trapped animals. The amplification process was performed according to previously described protocols (García et al., 2000; Bowen et al., 1996b). Over 60% of *C. callosus* and 14% of *N. lasiurus* analyzed were infected by arenavirus in the municipalities of Sidrolândia and Dois Irmãos do Buriti (Table 1). High seroprevalence has been described previously for others arenavirus species in two other studies conducted in the Americas. One such example is a seroprevalence study of Tacaribe serocomplex arenaviruses in New Mexico, where 66% of *Neotoma albigula* were seroreactive (Cajimat et al., 2007). More recently, studies in endemic areas for Venezuelan haemorrhagic fever, demonstrated a seroprevalence of 64.9% of *Sigmodon alstoni* infected with Pirital virus (Milazzo et al., 2011).

For direct sequencing of overlapping amplicons, generic primer combinations were used for the amplification and sequencing of the complete genomic S segment, based on the conserved regions

of the S segment among Clade C New World Arenaviruses (primers available on request) using a similar strategy to that described by Charrel et al. (2003). Complete sequence of LATV and OLVV S segment had approximately 3397 nt and 3545 nt, respectively.

Phylogenetic trees, based on the main proteins encoded by the arenavirus S segment, were generated by maximum likelihood method implemented with MEGA 6 (Tamura et al., 2013), under the best-fit model of evolution chosen by the program jModelTest (Posada, 2008). Partial and complete amino acid sequences from the Nucleoprotein (NP) and Glycoprotein precursor complex (GPC) (Fig. S1), and complete S segment nucleotide sequences (Fig. 2), formed a monophyletic clade, well supported by the New World Clade C Arenavirus. Viruses from *C. callosus* rodents were the closest related to LATV, while viruses from the *N. lasiurus* rodents were grouped with OLVV. The complete and partial amino acid sequences of the recovered proteins from *C. callosus* virus showed greatest proximity, with a difference of 10.0% (NP) and 11.3% (GPC), to the LATV strain MARU (AF512830) obtained from rodent species *C. callosus* captured in Bolivia. Analysis of the similarity of NP and GPC proteins from viruses recovered from *N. lasiurus* showed the smallest differences, 11.2% and 16.4%, with OLVV (U34248) from central Argentina, harbored by the rodent *Necromys benefactus*.

As a result of the taxonomic complexity of the Arenaviridae family, some authors have suggested as a criterium for classification a cutoff value >12% of the uncorrected *p* distance of the nucleoprotein amino acid sequence along with other factors, such as, geographic distribution and natural reservoir (Charrel and Lamballerie, 2010; Emonet et al., 2009). Thus, despite the fact that the virus detected in *N. lasiurus* accomplishes two criteria for a new species: (i) has a distinct geographical distribution (ii) associated with a rodent species different from other arenaviruses reservoirs; the uncorrected *p*-distance of 11.2% of the nucleoprotein complete amino acid sequence, with its closest match, leads to the conclusion that the virus detected in *N. lasiurus* is a strain of OLVV. Additionally, a taxonomic revision of the genus *Necromys* spp. suggested that *N. benefactus*, OLVV reservoir in Argentina, is in fact a member of the *N. lasiurus* species (D'Élia et al., 2008).

The two arenaviruses identified in the present work do not match the taxonomic requirements for new species established by the ICTV. Thus, these viral strains were named as LATV Capão Seco strain and OLVV Quebra Coco strain. These names were given according to the political division of Sidrolândia municipality. The sympatric occurrence of Clade C New World Arenaviruses, even in

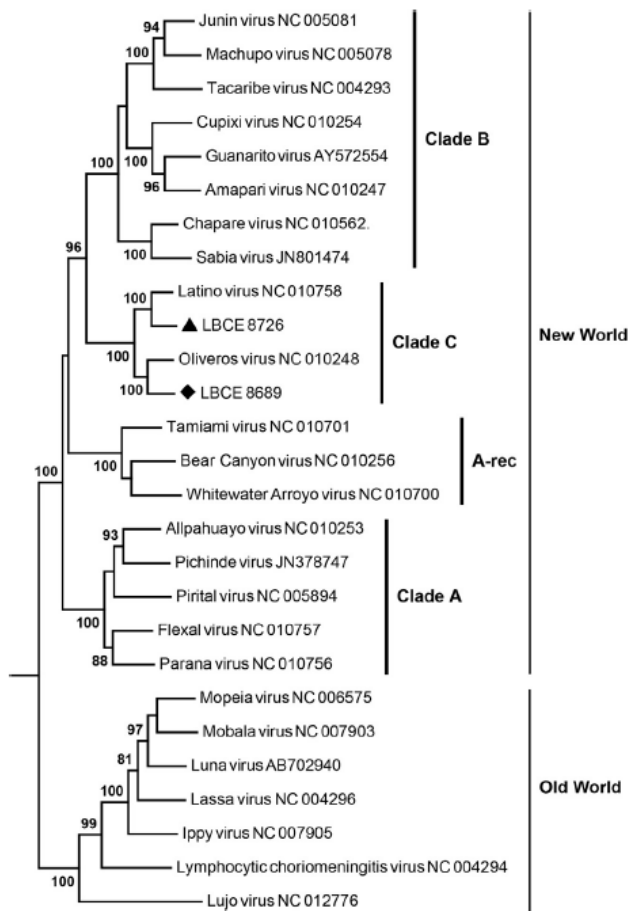


Fig. 2. Phylogenetic tree generated by maximum-likelihood, using the model HKY + G + I of evolution, based on the complete S segment nucleotide sequence. The numerical value >70% at the node indicates the Bootstrap, calculated from 1000 replicates. The scale bars indicate amino acid substitutions per site. Symbols represent virus species and geographic origins of the reservoir hosts: bold triangle = Latino virus Capão Seco strain obtained from *C. callosus*, Sidrolândia and bold rhombus = Oliveros virus Quebra Coco strain obtained from *N. lasiurus*, Sidrolândia.

the same trap station, as seen in this study, has not been reported before. This scenario suggests that these viruses have a very close relationship with their rodent hosts and do not seem to be shared among sympatric species. However, Mills et al. (2007) had found other rodent species with OLVV antibodies during a survey in central Argentina, a finding that has not yet been reported before for other New World Arenaviruses (Cajimat et al., 2007; Milazzo et al., 2011). This information, along with the fact that there are just a few ecological studies involving clade C arenaviruses, makes it clear that more studies need to be conducted to better understand the dynamics of these viruses and their hosts.

The presence of LATV in high prevalence, in the same reservoir species detected in Bolivia, reinforces the notion that most species of arenavirus are species-specific and that their occurrence is strictly related to the distribution of their reservoir, in this case the species *C. callosus*. Thus, it is possible to infer that probably the LATV distribution area includes dry and sub-humid regions of eastern Bolivia, northern Argentina, Paraguay and central-western Brazil, where the species *C. callosus* is present. A different aspect was found for OLVV, where the detection of this virus in a new reservoir corroborates the hypothesis proposed by Mills et al. (2007) that OLVV could be associated with the genus *Necromys* spp. of a wide geographic range, where many strains of this virus

will probably be detected. This would be in agreement with the previously described OLVV strain Pampa virus (Lozano et al., 1997) also retrieved from a rodent genus *Necromys* spp. from Argentina, and the strains from this study.

The new distribution of Clade C New World Arenaviruses presented in this work demonstrates that these viruses are less geographically restricted than previously thought. These results highlight the importance of monitoring the occurrence and genetic diversity of South American arenaviruses and their rodent hosts to better understand their real territorial range.

Sequences accession number

Sequences generated during this work are deposited in GenBank database with the following accession numbers: (i) LATV Capão Seco strain partial GPC sequences: LBCE 8695 (KP027655), LBCE 8693 (KP027656), LBCE 8680 (KP027658), LBCE 8675 (KP027659), LBCE 8674 (KP027660), LBCE 8673 (KP027661), LBCE 8672 (KP027665), LBCE 8696 (KP027666), LBCE 8699 (KP027667), LBCE 8721 (KP027669), LBCE 8722 (KP027670), LBCE 8723 (KP027671), LBCE 8729 (KP027672), LBCE 8731 (KP027673), LBCE 8734 (KP027674), LBCE 8793 (KP027675); (ii) LATV Capão Seco strain partial NP sequences: LBCE 8673 (KM233886), LBCE 8675 (KP027662), LBCE 8674 (KP027663), LBCE 8672 (KP027664), LBCE 8693 (KM233887), LBCE 8695 (KM233888) LBCE 8699 (KM233889), LBCE 8721 (KM233890); (iii) LATV Capão Seco strain complete S segment sequence: LBCE 8726 (KP027676); (iv) OLVV Quebra Coco strain partial GPC sequences: LBCE 8684 (KP027657), LBCE 8710 (KP027668); (v) OLVV Quebra Coco strain complete S segment sequences: LBCE 8689 (KP027677).

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil. All work with animals included in this study was submitted to and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA)/FIOCRUZ, according to protocol no. P.0294-06 and performed in accordance with a license (no. 068/2005) granted by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA)/Coordinator General of Wildlife.

The authors also would like to thank Dr Bernardo Teixeira and Dr Sotiris Missailidis for the dedication and support reviewing this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.010>.

References

- Bonvicino, C.R., D'Andrea, P.S., Cerqueira, R., Seuánez, H.N., 1996. The chromosomes of *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae) with $2n = 52$, $2n = 56$, and interspecific hybrids ($2n = 54$). *Cytogenet. Cell Genet.* 73, 190–193.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Mills, J.N., Nichol, S.T., 1996a. Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217, 362–366.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1996b. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219, 285–290.
- Cajimat, M.N., Milazzo, M.L., Hess, B.D., Rood, M.P., Fulhorst, C.F., 2007. Principal host relationships and evolutionary history of the North American arenaviruses. *Virology* 367 (2), 235–243.
- Cajimat, M.N., Milazzo, M.L., Rollin, P.E., Nichol, S.T., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Fulhorst, C.F., 2009. Genetic diversity among Bolivian arenaviruses. *Virus Res.* 140, 24–31.

- Cassens, I., Tiedemann, R., Hartl, G.B., Suchentrunk, F., 2000. Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. *J. Hered.* 91, 31–35.
- Charrel, R.N., Lamballerie, X., 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 140, 213–220.
- Charrel, R.N., Lamballerie, X., Emonet, S., 2008. Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 362–368.
- Charrel, R.N., Lemasson, J.J., Garbutt, M., Khelifa, R., Micco, P., De, Feldmann, H., Lamballerie, X., 2003. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* 317, 191–196.
- D'Elia, G., Pardiñas, U.F.J., Jayat, P., Salazar-Bravo, J., 2008. Systematics of *Necromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *J. Mammal.* 89, 778–790.
- Emonet, S.F., De La Torre, J.C., Domingo, E., Sevilla, N., 2009. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect. Genet. Evol.* 9, 417–429.
- García, J.B., Morzunov, S.P., Levis, S., Rowe, J., Calderón, G., Enría, D., Sabattini, M., Buchmeier, M.J., Bowen, M.D., St Jeor, S.C., 2000. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology* 272, 127–136.
- Lozano, M.E., Posik, D.M., Albariño, C.G., Schujman, G., Ghiringhelli, P.D., Calderón, G., Sabattini, M., Romanowski, V., 1997. Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis: its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Res.* 49, 79–89.
- Milazzo, M.L., Cajimat, M.N.B., Duno, G., Duno, F., Utrera, A., Fulhorst, C.F., 2011. Transmission of Guanarito and Pirital Viruses among Wild Rodents, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2209–2215.
- Mills, J.N., Alva, H., Ellis, B.A., Wagoner, K.D., Childs, J.E., Calderón, G., Enría, D.A., Jahrling, P.B., 2007. Dynamics of oliveros virus infection in rodents in central Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 315–323.
- Mills, J.N., Barrera Oro, J.G., Bressler, D.S., Childs, J.E., Tesh, R.B., Smith, J.F., Enria, D.A., Geisbert, T.W., McKee, K.T., Bowen, M.D., Peters, C.J., Jahrling, P.B., 1996. Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (*Arenaviridae: Arenavirus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 399–404.
- Mills, J.N., Childs, J.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Velleca, W.M., 1995. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Oliveira, J., Bonvicino, C., 2006. *Ordem Rodentia*. In: Reis, N., Peracchi, A., Pedro, W., Lima, I. (Eds.), *Mamíferos do Bras.. Suprema, Londrina, Paraná*, pp. 347–400.
- Posada, D., 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Rowe, W.P., Murphy, F.A., Bergold, G.H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann-Grube, F., Mins, C.A., Traub, E., Webb, P.A., 1970. *Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group*. *J. Virol.* 5, 651–652.
- Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W., Bowen, M.D., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Yates, T.L., 2002. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1, 191–199.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

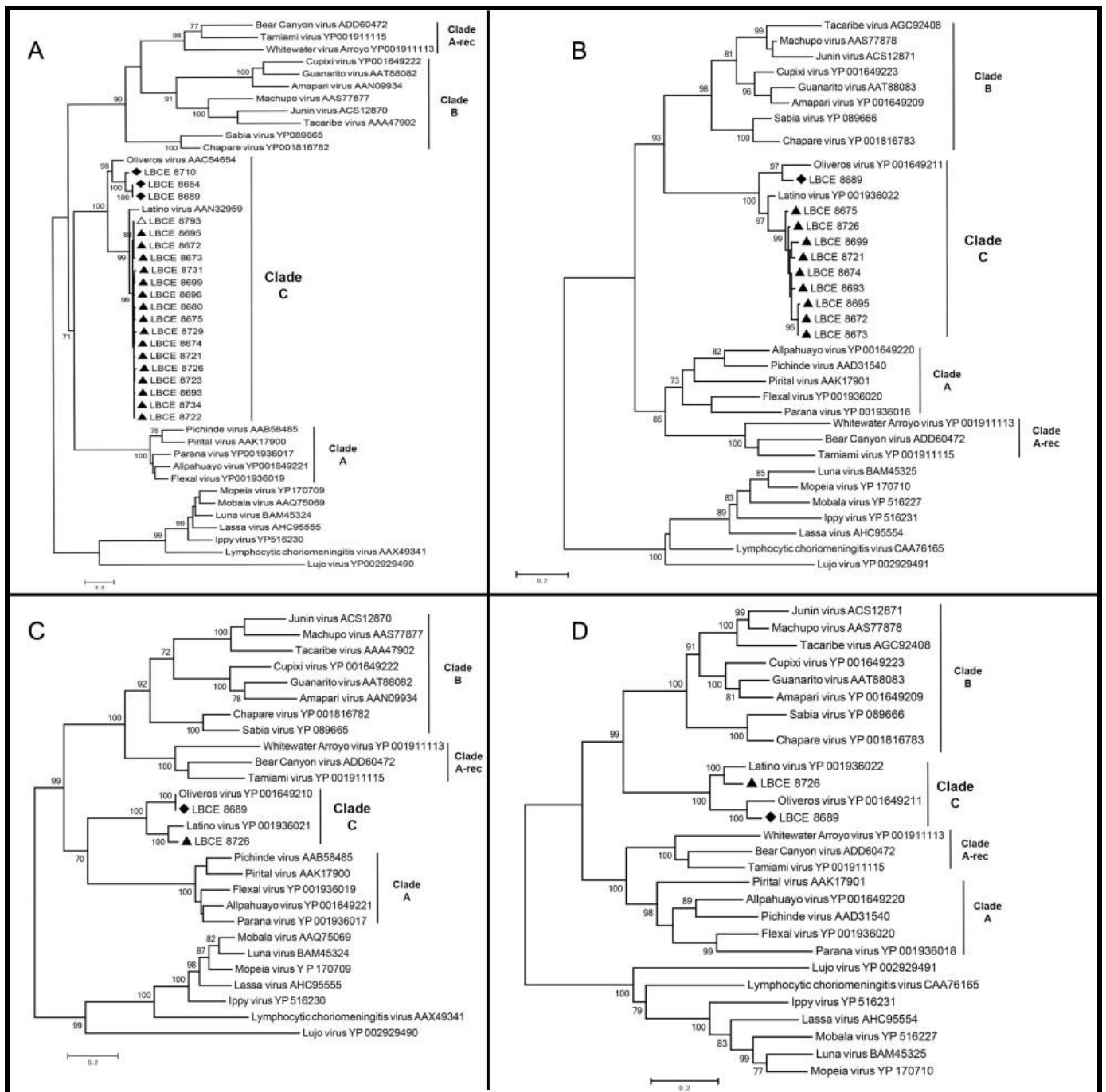


Fig S1. Phylogenetic tree generated by maximum-likelihood, using the model HKY + G + I of evolution, based on the complete S segment nucleotide sequence. The numerical value $\geq 70\%$ at the node indicates the Bootstrap, calculated from 1,000 replicates. The scale bars indicate amino acid substitutions per site. Symbols represent virus species and geographic origins of the reservoir hosts: bold triangle = Latino virus Capão Seco strain obtained from *C. callosus*, Sidrolândia and bold rhombus = Oliveros virus Quebra Coco strain obtained from *N. lasisurus*, Sidrolândia.

4.1.2. Artigo 2 - Detection of Latino virus (*Arenaviridae: Mammarenavirus*) naturally infecting *Calomys callidus*

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.1.** Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo específico:

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;
- ✓ Estudar, utilizando técnicas histopatológicas e de ultraestrutura, os tecidos de animais infectados.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista *Acta Tropica*

Fator de Impacto da Revista: 2,2

Referência: Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Barreto-Vieira DF, Terças ACP, Teixeira BR, da Silva MAN, Caldas GC, de Oliveira Coelho JMC, Barth OM, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ERS. Detection of Latino virus (*Arenaviridae: Mammarenavirus*) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop.* 2017;179:17-24.



Detection of Latino virus (Arenaviridae: *Mammarenavirus*) naturally infecting *Calomys callidus*

Jorlan Fernandes^{a,*}, Renata Carvalho de Oliveira^a, Alexandre Guterres^a,
Débora Ferreira Barreto-Vieira^b, Ana Claudia Pereira Terças^c, Bernardo Rodrigues Teixeira^d,
Marcos Alexandre Nunes da Silva^b, Gabriela Cardoso Caldas^b,
Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho^e, Ortrud Monika Barth^b, Paulo Sergio D'Andrea^d,
Cibele Rodrigues Bonvicino^{d,f}, Elba Regina Sampaio de Lemos^{a,*}

^a Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil

^b Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil

^c Universidade Estadual do Mato Grosso – UNEMAT, Tangará da Serra, CEP 78300-000 MT, Brazil

^d Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil

^e Laboratório de Anatomia Patológica, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 RJ, Brazil

^f Instituto Nacional do Câncer – INCA, Rio de Janeiro, CEP 20230-092 RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Arenavirus
Mammarenavirus
Rodent
Calomys callidus
Latino virus

ABSTRACT

Mammarenavirus species are associated with a specific rodent host species, although an increasing number of virus has been associated to more than one host, suggesting that co-evolution is less robust than initially thought. There are few eco-epidemiological studies of South America mammarenaviruses in non-endemic areas of Arenavirus Hemorrhagic Fever, affecting specially our current knowledge about animal reservoirs and virus range and host-virus relations. In Brazil, seven arenavirus species were described in seven different rodent species. Here in we describe a new rodent reservoir species in Brazil related to the previously described Latino mammarenavirus (LATV) MARU strain. Samples of 148 rodents from Mato Grosso state, Brazil were analyzed. Amplification of the glycoprotein precursor gene (GPC) was observed in six *Calomys callidus* rodents. According to phylogenetic inferences, is observed a well-supported monophyletic clade of LATV from *C. callidus* and other Clade C mammarenavirus. In addition, the phylogenetic relations of both genes showed a close relation between LATV MARU and Capão Seco strains, two distinct lineages. Additionally, the results obtained in this study point out to a change of scenario and in previously stabilized patterns in the dynamics of South American mammarenaviruses, showing that with more studies in AHF non-endemic or silent areas, more potential hosts for this virus will be discovered.

1. Introduction

Arenaviruses are zoonotic agents associated mainly to small mammals (Charrel and de Lamballerie, 2010). In the last few years, changes have been made to the family *Arenaviridae* driven by the detection of divergent arenavirus in boid snakes. The current taxonomic status by ICTV divides the *Arenaviridae* family in two: *Mammarenavirus* and *Reptarenavirus*, from mammalian and reptile hosts, respectively (Radoshitzky et al., 2015). Mammarenaviruses are composed by highly divergent rodent born viruses, except for Tacaribe virus isolated from fruit bats and ticks (Downs et al., 1963; Saylor et al., 2014), and

are divided in two main groups: the Old world (Lassa – Lymphocytic choriomeningitis virus serocomplex) and the four New World (Tacaribe serocomplex) lineages, designated A, B, C and A recombinant (Emonet et al., 2009; Radoshitzky et al., 2015).

Although each mammarenavirus specie is usually associated with a specific rodent host species (Salazar-Bravo et al., 2002), an increasing number of virus has been associated to more than one host (Lavergne et al., 2015; Milazzo et al., 2011, 2015). For example, Lassa virus harbored by *Mastomys natalensis*, is also hosted by other rodent species, *Hylonomys pamfi* and *Mastomys erythroleucus*, in different geographic regions from Africa (Olayemi et al., 2016). These findings alongside the

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jorlan@ioc.fiocruz.br (J. Fernandes), elemos@ioc.fiocruz.br (E.R.S. de Lemos).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.003>

Received 4 October 2017; Received in revised form 27 November 2017; Accepted 2 December 2017

Available online 05 December 2017

0001-706X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

recent discovery of reptarenaviruses and more depth analyses of mammarenavirus relations, suggest that co-evolution is less robust than initially thought (Blasdel et al., 2016; Irwin et al., 2012; Zapata and Salvato, 2013).

In addition, there are few eco-epidemiological studies of South America mammarenaviruses in non-endemic areas of Arenavirus Hemorrhagic Fever (AHF), affecting specially our current knowledge about animal’s reservoirs and virus range and host-virus relations. Herein we describe a new rodent reservoir, *Calomys callidus*, detected in Brazil and related to a known lineage of Latino mammarenavirus from Bolivia.

2. Materials and methods

2.1. Small-mammals trapping

Rodents were captured using live traps during fieldworks in September and December 2010–Sapezal (13°32’33” S/58°48’51” W) and Comodoro (13°39’46” S/59°47’09” W) municipalities – and March 2015 – Campo Novo do Parecis (13°40’31” S/57°53’31” W) and Tangará da Serra (14° 37’ 08” S/57° 29’ 09” W) municipalities, in Mato Grosso state, Brazil (Fig. 1).

Blood and tissue samples from the wild rodents were obtained in accordance with recommended safety procedures (de Lemos and D’Andrea, 2014), after authorization by the Chico Mendes Institute for the Biodiversity Conservation (ICMBio) under license number 13373.

Bionomic and biometric data were collected, and specimens were identified at specific level by both karyotyping and cranial morphology/morphometry and confirmed by amplification of the cytochrome b gene (Bonvicino et al., 1996, 2002).

All procedures using animals as described in this manuscript were conducted in accordance with the standard operating protocols approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ and by the Chico Mendes Institute for the Biodiversity Conservation (ICMBio).

2.2. Mammarenavirus detection

The genomic RNA was obtained from spleen and liver tissue samples according to the manufacturer’s instructions from the PureLink® Micro-to-Midi total RNA purification kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The amplification process was performed according to previously described protocols (Bowen et al., 1996b; García et al., 2000). In addition, viral RNA was also extracted from lung, kidney and heart from positive rodent samples.

2.3. DNA sequencing and phylogenetic analyses

For DNA purification, the Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Corp., Madison, WI, USA) was used according to the manufacturer’s recommendations and strands were directly sequenced. BigDye Terminator™ version 3.1 Cycle Sequencing®Kit (Applied

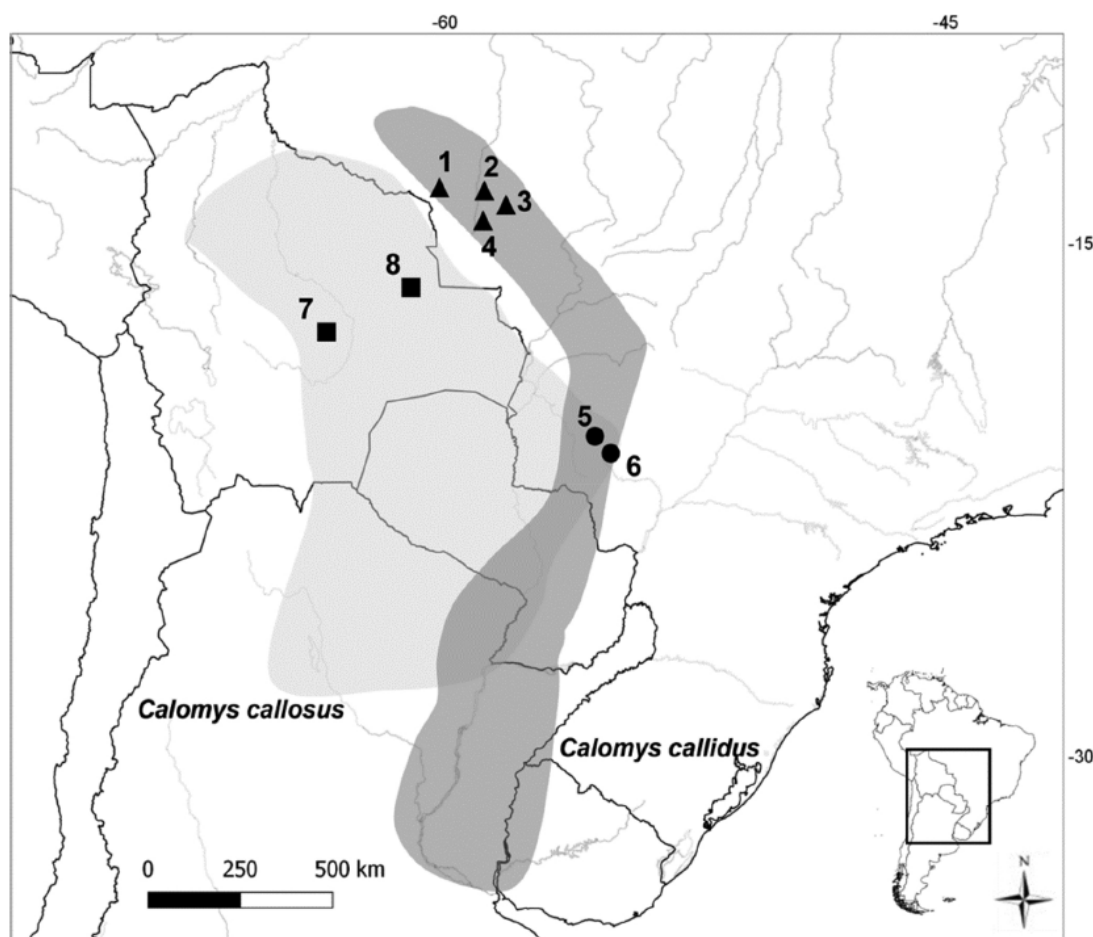


Fig. 1. Geographic distribution of *Calomys callidus* (dark gray area) and *Calomys callosus* (light gray area) highlighting central-western region of Brazil, showing the municipalities of Comodoro, Sapezal, Campo Novo do Parecis and Tangará da Serra (▲1,2,3 and 4, respectively). Circles (●) = Latino mammarenavirus (LATV) detection in Brazil (Fernandes et al., 2015). Squares (■) = LATV detection in Bolivia (Cajimat et al., 2009).

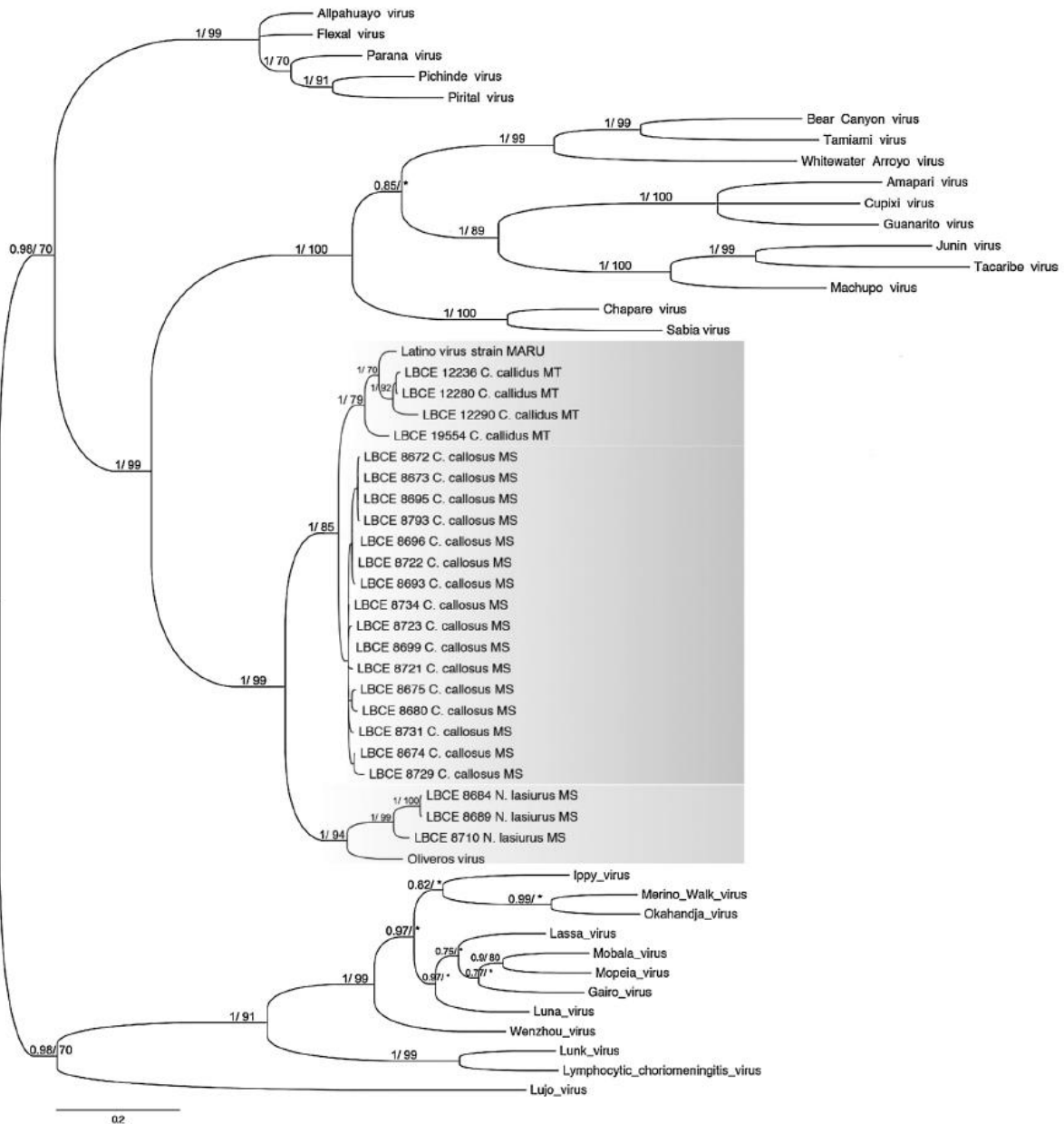


Fig. 2. Phylogenetic trees based on the GPC protein (323 aa) sequences of mammarenaviruses, using ML and Bayesian methods. Numbers (> 0.7 / > 70%) above branches indicate posterior node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). *Indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology. Gray indicates New World Clade C Mammarenavirus. Abbreviations: C. callidus (= *Calomys callidus*), C. callosus (= *Calomys callosus*), N. lasiurus (= *Necromys lasiurus*), MT (= Mato Grosso) and MS (= Mato Grosso do Sul).

Biosystems) in an automatic sequencer (Applied Biosystems, ABI PRISM 3130X model, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analyzed using MEGA7 software (Kumar et al., 2016), and a consensus sequence was derived from contiguous assembled with the same software.

Multiple sequence alignment and comparison of amino acid were performed using MAFFT version 7 employing the E-INS-i algorithm, in the Jalview v.4 software program (Waterhouse et al., 2009). Phylogenetic relationships were estimated using (a) Maximum likelihood (ML) phylogenetic inference using PhyML implemented in SeaView v.4 software program (Gouy et al., 2010), under the LG + G + I model of sequence evolution, and (b) a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in MrBayes v3.2.6 (Ronquist et al., 2012). For the Bayesian analyses, we used a mixed aa model of evolution with γ -shaped distribution of rates across sites. This model allows

selection to be integrated across all best-fit models. The MCMC settings consisted of two simultaneous independent runs with 4 chains each that were run for 10 million generations and sampled every 100th generation, yielding 100,000 trees. After eliminating 10% of the samples as burn-in, a consensus tree was built. Statistical support of the clades was measured by a heuristic search with 1000 bootstrap replicates and the Bayesian posterior probabilities. The best-fit evolutionary model was determined using MEGA version 7, using the Bayesian Information Criterion (Kumar et al., 2016). Sequences used in the phylogenetic analyses are listed on Supplementary Table 1.

2.4. Histopathological and ultrastructural analysis

Lung and liver tissue fragments were fixed by immersion in Millonig. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for

histological examination and visualized in a Nikon ECLIPSE E600 microscope. For ultrastructural analysis tissues were post-fixed with 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated in acetone, embedded in epoxy resin and polymerized at 60 °C during three days (Barreto-Vieira et al., 2010, 2015; Barth et al., 2016; Sesso, 2007). The resin blocks were cut of 50–70 nm thick ultrathin sections. The sections were picked up onto copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) and observed in a Jeol JEM 1011.

3. Results

3.1. Small-mammals and mammarenavirus detection

A total of 148 rodents were analyzed, 139 from Sapezal and Comodoro localities and nine from Campo Novo do Parecis and Tangará da Serra, in Mato Grosso state: *Calomys callidus* (63); *Necromys lasiurus* (57); *Rattus rattus* (11); *Oligoryzomys utiariensis* (9); *Hylaeamys megacephalus* (2); *Cerradomys scotti* (2); *Oligoryzomys mattogrossae* (1); *Calomys tener* (1), *Oecomys roberti* (1) and *Oecomys cleberi* (1). Amplification of the glycoprotein precursor (GPC) gene (GPC) was observed in six rodents tissue samples (4.0%), all belonging to the *C. callidus* specimens (3 males and 3 females), with an overall prevalence of 9.5% within this rodent specie. Positive animals were capture in Sapezal (5) and Tangará da Serra (1) localities.

The comparison of GPC gene with other known arenaviruses showed the highest degree of similarity, at 86% (nucleotide) and 95% (amino acid) [GenBank: AF485259 and AAN09940, respectively], with Latino mammarenavirus (LATV) strain MARU. The obtained nucleoprotein sequences were also similar 91% (nucleotide) and 99% (amino acid) to LATV strain MARU [GenBank: AF512830 and AAC054831, respectively] identified in *Calomys callosus* from Bolivia. LATV amino acid sequences differed from 8% – 12% between viruses of *C. callosus* and *C. callidus*, 0 – 3% within *C. callosus* viruses and 0–9% within *C. callidus*. According to phylogenetic inferences, it was possible to observe a well-supported monophyletic clade of LATV from *C. callidus* with LATV strain MARU and other Clade C Mammarenavirus available in GenBank, for both genes (GPC and nucleoprotein – NP) (Figs. 2 and 3). The phylogenetic relations of both genes showed a close relation between LATV MARU and Capão Seco strains, two clearly distinct lineages, with a strong statistical support. One group includes the LATV prototype strain MARU (Bolivia) and LATV obtained from *C. callidus* rodents captured in Mato Grosso state, Brazil. Other group was formed by LATV strain Capão Seco retrieved from *C. callosus* captured in Mato Grosso do Sul, Brazil.

3.2. Sequences data

The GenBank accession number for (i) glycoprotein precursor gene: LBCE_12236 – MF325931, LBCE_12155 – MF325932, LBCE_12280 – MF325933, LBCE_12290 – MF325934 and LBCE_19554 – MF325935; (ii) nucleoprotein gene: LBCE_12236 – MF325936, LBCE_12280 – MF326936 and LBCE_19554 – MF326937.

3.3. Histopathological and ultrastructural analysis

Histological and ultrastructural analysis of lung and liver of the positive animal from Tangará da Serra, the only properly conserved for ultrastructural observations, presented similar results. Presence of mononuclear and polymorphonuclear cells and platelets in capillaries of interalveolar septa (Fig. 4a–d), activated inflammatory cells (Fig. 4c and d), endothelial cells with dilated rough endoplasmic reticulum (Fig. 4e and f) and presence of structures mammarenavirus-like with diameter varying from 70 to 100 nm in the cytoplasm of endothelial cells (Fig. 5a and b). In liver, morphological analysis revealed presence of vascular congestion (Supplementary Fig. 1a–d), edema (Supplementary Fig. 1b) and inflammatory cells in sinusoidal capillary

(Supplementary Fig. 1a and d).

4. Discussion

South American arenaviruses are zoonotic agents harbored by rodents of the subfamily Sigmodontinae. With more than 400 species and 82 genera, these rodents comprise one of the most diverse and more broadly distributed Neotropical mammals (D'Elia, 2003; Engel et al., 1998). Approximately 16 sigmodontinae rodents have been assigned as arenavirus reservoirs in seven different countries (Radoshitzky et al., 2015). *Calomys* species are rather prevalent in some areas of their distribution and some of them have been associated with mammarenaviruses before (Mills et al., 1991, 1992, 1994; Salazar-Bravo et al., 2002; Videla et al., 1989).

The genus *Calomys*, comprises small body-sized sigmodontinae rodents belonging to the tribe Phyllotini (Almeida et al., 2007). Species of this genus inhabit dry vegetation areas and have a wide distribution in South America, occurring from the Venezuelan Llanos to the southern limit of the Argentinean Chaco, including the diagonal of dry biomes in Brazil, that encompasses the Cerrado (complexes of savanna shrublands and grasslands) and Caatinga (shrublands and dry forest) morphoclimatic domains (Musser and Carleton, 2005; Salazar-Bravo et al., 2001).

Calomys spp. are known hosts of South American arenaviruses and other rodent-born-diseases including Junín virus (*C. musculus*) in Argentina, Machupo virus (*Calomys* sp.) in Bolivia, LATV (*C. callosus*) in Bolivia and Brazil, and recently Pinhal virus (*C. tener*), also from Brazil (Bisordi et al., 2015; Parodi et al., 1958; Salazar-Bravo et al., 2002). In addition, *C. callidus* have already been assigned as a potential mammarenavirus reservoir in Argentina (Videla et al., 1989). In our analysis, we found six *C. callidus* specimens infected by LATV a much lower prevalence than the one previously described for LATV in *C. callosus* in Brazil, where more than 60% of the rodents were infected. In addition, a different infection pattern was observed *C. callidus* presented no gender difference among infected rodents while *C. callosus* male rodents were more frequently infected by LATV (Fernandes et al., 2015).

LATV belongs to the Clade C New World Mammarenaviruses, the smallest lineage within the genus, with currently only two additional members, Oliveros and Pinhal viruses (Bisordi et al., 2015; Bowen et al., 1996a; Charrel and Lamballerie, 2010; Rowe et al., 1970). The LATV prototype strain MARU 10924 originally was isolated from a large vesper mouse (*C. callosus*) captured in 1965 near the town of Juan Latino in the Department of Santa Cruz in eastern Bolivia (Webb et al., 1973). The second strain, Capão Seco, was characterized in 2015, also from a large vesper mouse captured in Sidrolândia and Dois Irmãos do Buriti municipalities, Midwest, Mato Grosso do Sul state, Brazil in 2005 (Fernandes et al., 2015). Interesting the LATV detected in *C. callidus* were closely related to the strain MARU from Bolivia then to the strain Capão Seco from Brazil, data that was corroborated by the phylogenetic analysis of both genes GPC and NP. The existence of multi-strains within the same arenavirus species is described for Old World and New World virus. It seems that arenavirus strains could be grouped by geographic localization, hosts or neither of these characteristics as observed for LCMV studies (Albariño et al., 1997; Bowen et al., 2000; Cajimat et al., 2009; Fulhorst et al., 2001; García et al., 2000; Yama et al., 2012). The future detection of more strains of LATV could help to fulfill this gap.

The identification of two LATV lineages with no geographic or host grouping, could be explained by an overlap of *C. callidus* and *C. callosus* from Bolivia extending to Brazilian rodents from bordering areas. Similarly, Laguna Negra hantavirus also has been detected in different *Calomys* species, including *C. callidus*, in three different countries – Argentina, Bolivia and Brazil (de Barros Lopes et al., 2014). Other explanation is that LATV main host in Bolivia could in fact be the same species, since specific taxonomic status were affirmed by Corti et al. only in 1987 and data available of field studies involving LATV and natural rodents reservoirs are limited to the 70's (Rowe et al., 1970;

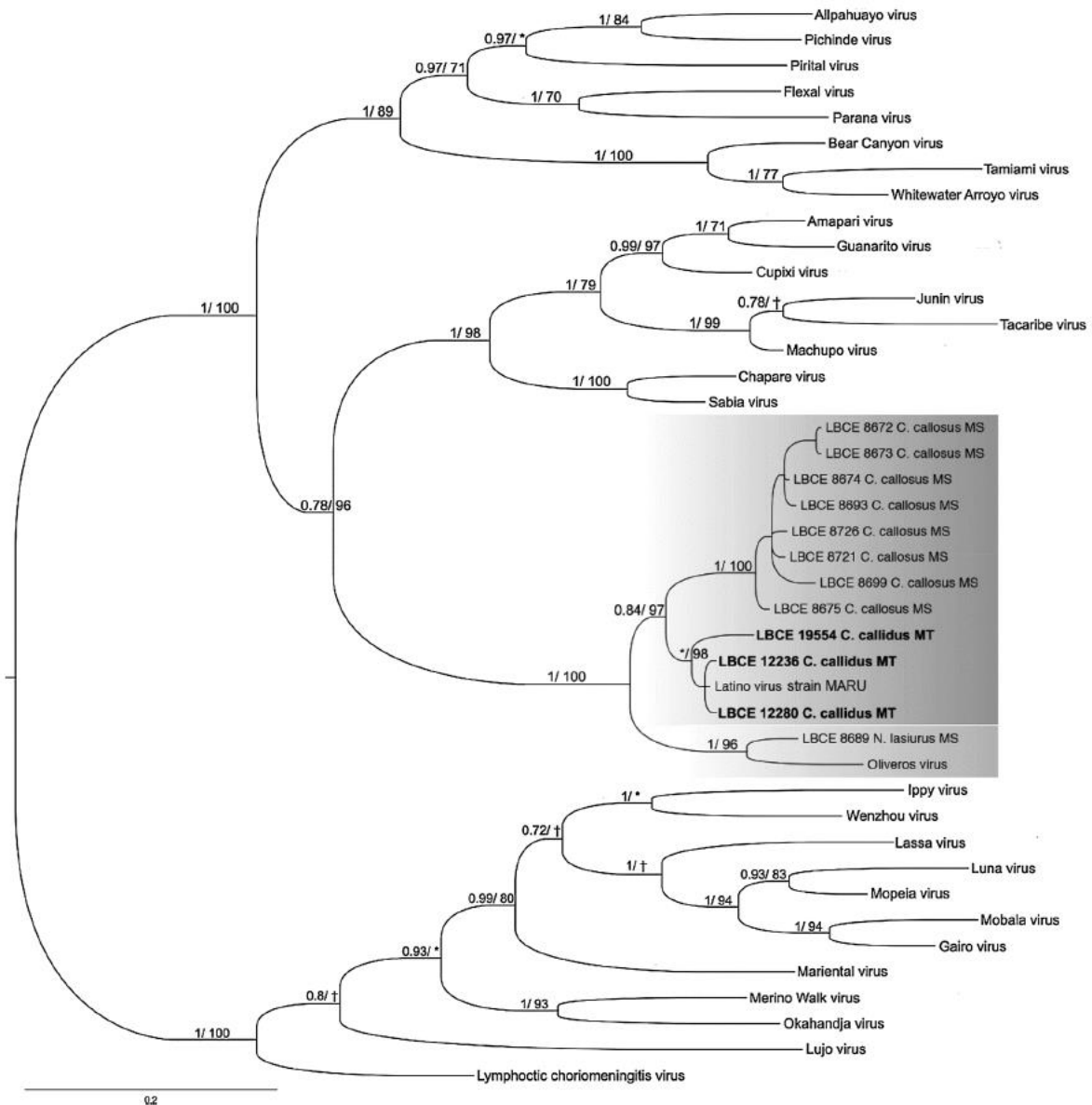


Fig. 3. Phylogenetic trees based on the NP protein (175 aa) sequences of mammarenaviruses, using ML and Bayesian methods. Numbers (> 0.7/ > 70%) above branches indicate posterior node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). *Indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology. Gray indicates New World Clade C Mammarenavirus. Abbreviations: *C. callidus* (= *Calomys callidus*), *C. callosus* (= *Calomys callosus*), *N. lasiurus* (= *Necromys lasiurus*), MT (= Mato Grosso) and MS (= Mato Grosso do Sul).

Webb et al., 1973, 1975). In fact, taxonomic changes were observed for other mammarenaviruses. Oliveros virus, is an arenavirus of the New World Tacaribe Complex that was initially associated to *Necromys obscurus* (formerly *Bolomys obscurus*) than *Necromys benefactus* that according to recently was suggested being a member of the *N. lasiurus* species (D’Elia et al., 2008; Hutterer, 2005; Massoia and Pardinias, 1993). It’s important to highlight that the diversity and complexity of rodent fauna, particularly the subfamily Sigmodontinae, have posed a challenge for researchers (de Oliveira et al., 2014). More studies must be conducted in these areas in order to better understand which rodent reservoirs are involved in the enzootic cycles of LATV.

Previously studies involving LATV and *C. callosus*, described different findings, suggesting that LATV produces chronic but non-viraemic infection in *Calomys* rodents, without signs of disease (Webb et al., 1973, 1975). On the other hand, Videla and collaborators in 1989, in their study with *C. callidus* experimentally infected with Junin

mammarenavirus, showed that this rodent were capable of develop persistent infection and spread virus through saliva, allowing horizontal transmission, producing weight loss and death, corroborating our results. Thus, this could be a more suitable model to explain *C. callidus* and LATV interaction. In addition, viruses were detected in all tested organs (lung, liver, spleen, heart and kidneys) corroborating with several studies that demonstrated that virus or viral antigens were present in different tissues of chronically infected animals (Fulhorst et al., 1999; Martinez Peralta et al., 1979; Walker et al., 1975). Alongside, dilated rough endoplasmic reticulum and mammarenaviruses-like particles were found in lung tissues indicating current LATV replication in endothelial cells.

Detrimental effects of arenavirus in the natural hosts are not commonly reported, but studies with different arenavirus have shown general changes such as weight loss, organ enlargement and also decreased fertility (Borremans et al., 2011; Vitullo et al., 1987; Vitullo and

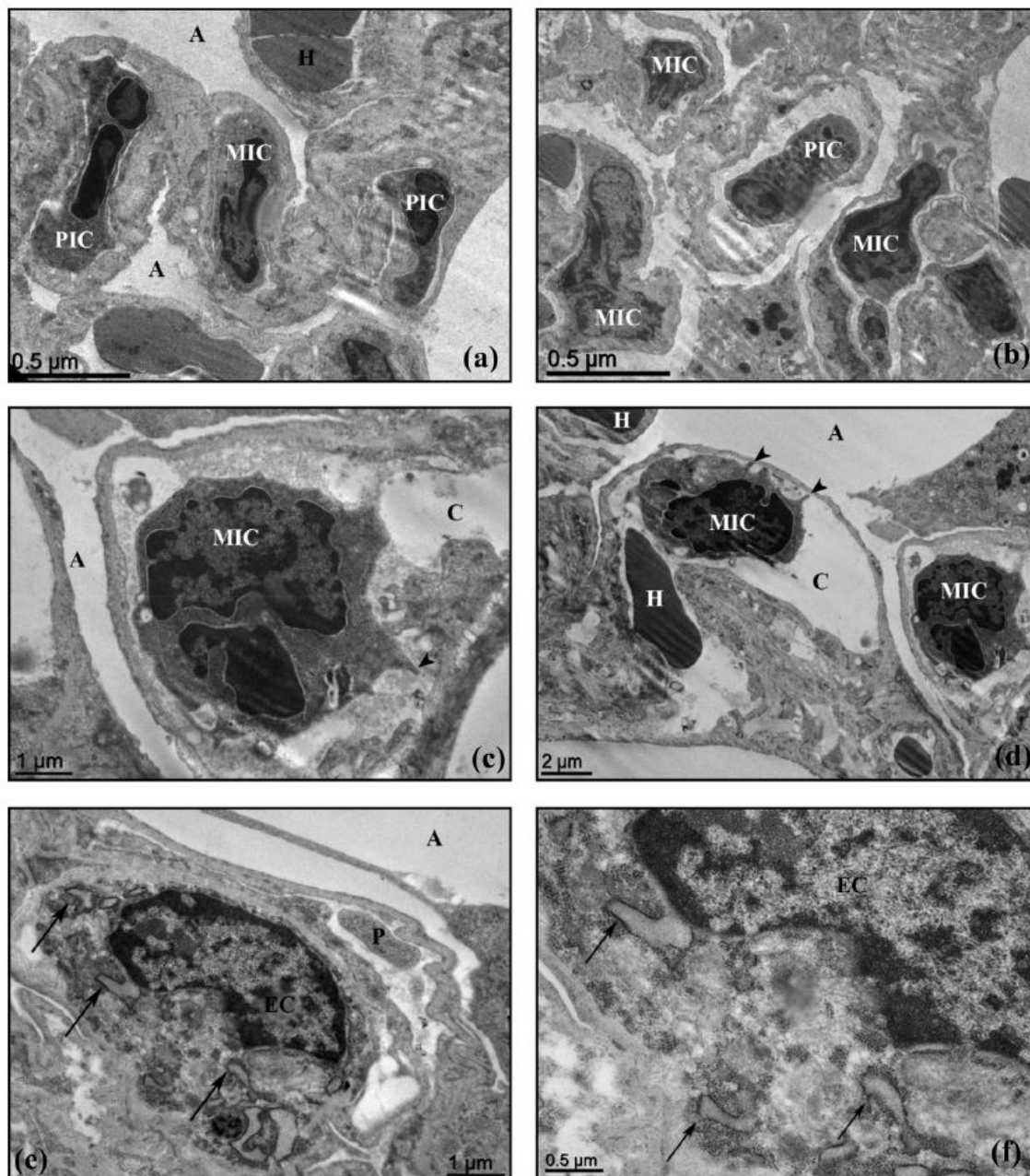


Fig. 4. Ultrastructural analysis of lung of *Calomys callidus* rodent naturally infected with Latino mammarenavirus. Presence of mononuclear (MIC) and polymorphonuclear cells (PIC) and platelets (P) in capillaries (C) [a-d], activated inflammatory cells (arrowhead) [figs. c-d], endothelial cells (EC) with dilated rough endoplasmic reticulum (arrow) [e-f]. Alveolus (A).

Merani, 1988; Webb et al., 1975). Although co-infections with a variety of agents cannot be disregarded, recently *Rattus* sp. experimentally infected with Whenzou mammarenavirus also presented histological changes with evidence of inflammation in lungs and vascular congestion (Blasdel et al., 2016), very similar to what we observed in infected *C. callidus*, but the small number of rodents used for histopathological in the present study enables further conclusions.

The lack of information on Clade C mammarenaviruses could be the main driver of unresolved questions on diversity and range of these viruses. Identification of LATV associated with another rodent species of *Calomys* lead us to the idea that South American mammarenaviruses, including LATV, cannot be strictly, associated with only one species of rodent reservoir. The results obtained in this study in addition to others recently published point out to a change of scenario in the dynamics of South American mammarenaviruses. Probably, with more studies in

AHF non-endemic or silent areas more potential hosts will be discovered as much as changes in patterns previously stabilized. The role of *C. callidus* in LATV enzootic cycle is not clear. New studies need to be conducted in order to better understand the dynamics involving *C. callidus* and LATV.

Funding

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação Oswaldo Cruz, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) – [grant process n^o APQ1 E-26/010.001567/2014] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant process n^o. < gn3 > 407664/2012-2 APQ < /gn3 >].

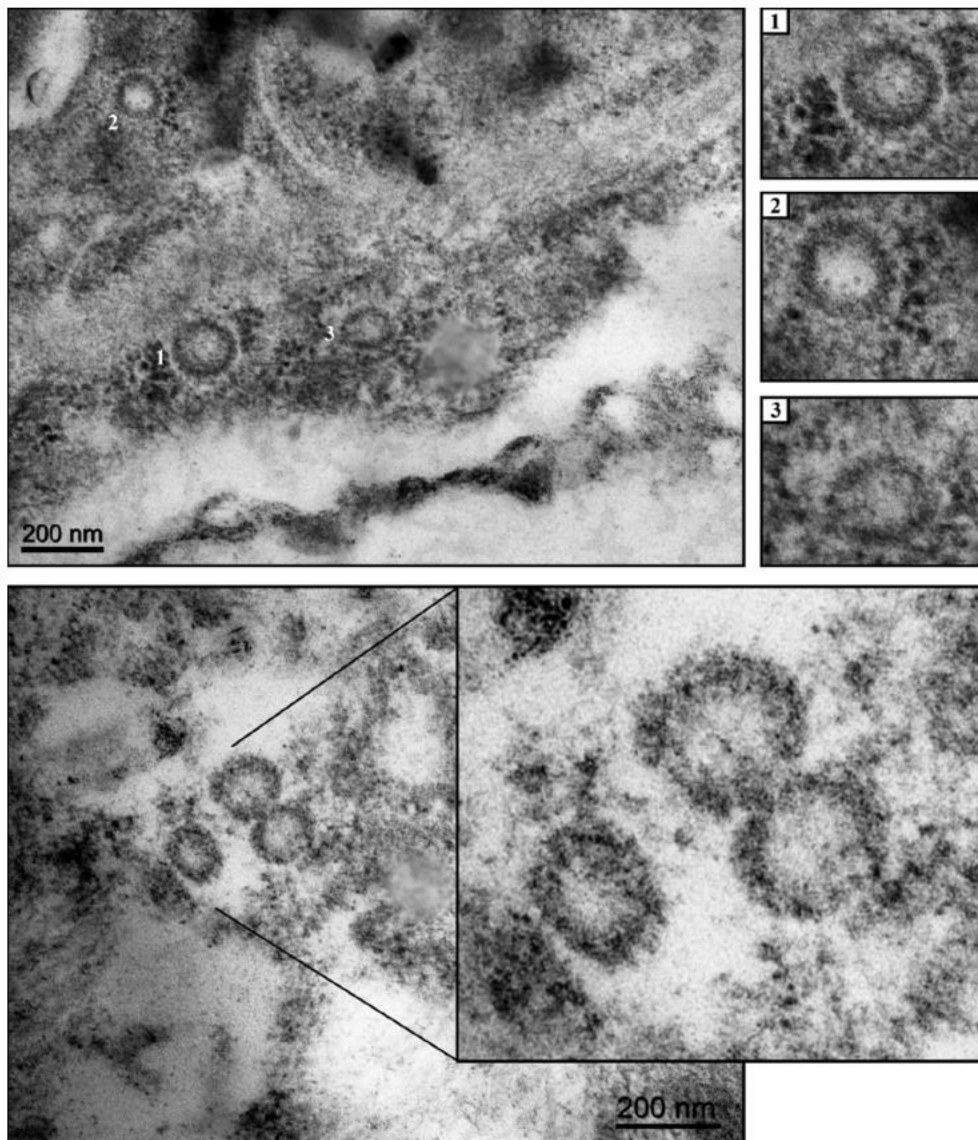


Fig. 5. Ultrastructural analysis of lung of *Calomys callidus* rodent naturally infected with Latino mammarenavirus. Structures mammarenavirus-like particles with a diameter varying from 70 to 100 nm in the cytoplasm of endothelial cells (arrow 1,2 and 3) [a, b].

Acknowledgements

We thank Juliana Herrero (Secretária Municipal de Saúde de Tangará da Serra – MT, Brasil), Alba Valéria de Gomes Melo Via (Secretária Estadual de Saúde do Mato Grosso- MT, Brasil), Vânia Angela Khol (Secretaria Estadual de Agricultura Familiar e Regularização Fundiária do Mato Grosso – MT, Brasil) and Jorge Pinto (FIOCRUZ), for their assistance in the fieldwork expeditions. We are also grateful to Arthur Costa Rasinhas (Laboratório de Morfologia e Morfôgênese Viral, FIOCRUZ) for technical support for image production. The Sequencing Platform Network (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil) for technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.003>.

References

Albariño, C.G., Ghiringhelli, P.D., Posik, D.M., Lozano, M.E., Ambrosio, A.M., Sanchez, A.,

- Romanowski, V., 1997. Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *J. Gen. Virol.* 78, 1605–1610. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-78-7-1605>.
- Almeida, F.C., Bonvicino, C.R., Cordeiro-Estrela, P., 2007. Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 449–466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.005>.
- Barreto-Vieira, D.F., Barth-Schatzmayr, O.M., Schatzmayr, H.G., 2010. Modelo animal experimental para o estudo da patogênese dos vírus dengue sorotipos 1 e 2, manual de técnicas. Interciência, Rio de Janeiro.
- Barreto-Vieira, D.F., Takija, C.M., Jácome, F.C., Rasinhas, A.C., Barth-Schatzmayr, O.M., 2015. Secondary infection with dengue viruses in a murine model: morphological analysis. *Indian J. Appl. Res.* 5, 44–51.
- Barth, O.M., Silva, M.A.N., Barreto-Vieira, D.F., 2016. Low impact to fixed cell processing aiming transmission electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 411–413.
- Bisordi, I., Levis, S., Maeda, A.Y., Suzuki, A., Nagasse-Sugahara, T.K., de Souza, R.P., Pereira, L.E., Garcia, J.B., de P. Cerroni, M., de A. e Silva, F., dos Santos, C.L.S., da Fonseca, B.A.L., 2015. Pinhal virus, a new arenavirus isolated from *Calomys tener* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15, 694–700. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1708>.
- Blasdell, K.R., Duong, V., Eloit, M., Chretien, F., Ly, S., Hul, V., Deubel, V., Morand, S., Buchy, P., 2016. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife* 5. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.13135>.
- Bonvicino, C.R., D'Andrea, P.S., Cerqueira, R., Seuánez, H.N., 1996. The chromosomes of nectomys (Rodentia, Cricetidae) with $2n = 52$, $2n = 56$, and interspecific hybrids ($2n = 54$). *Cytogenet. Cell Genet.* 73, 190–193.
- Bonvicino, C.R., Otazu, I.B., D'Andrea, P.S., 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenet. Genome Res.* 97, 200–204.
- Borremans, B., Leirs, H., Gryseels, S., Günther, S., Makundi, R., de Bellocq, J.G., 2011.

- Presence of mopeia virus, an african arenavirus, related to biotope and individual rodent host characteristics: implications for virus transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1125–1131. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0010>.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Mills, J.N., Nichol, S.T., 1996a. Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217, 362–366. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1996.0124>.
- Bowen, M.D., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1996b. The phylogeny of new world (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219, 285–290. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1996.0248>.
- Bowen, M.D., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Hustad, H.L., Bausch, D.G., Demby, A.H., Bajani, M.D., Peters, C.J., Nichol, S.T., 2000. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* 74, 6992–7004. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.15.6992-7004.2000>.
- Cajimat, M.N.B., Milazzo, M.L., Rollin, P.E., Nichol, S.T., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Fulhorst, C.F., 2009. Genetic diversity among Bolivian arenaviruses. *Virus Res.* 140, 24–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.016>.
- Charrel, R.N., de Lamballerie, X., 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 140, 213–220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.027>.
- Corti, M., Merani, M.S., Villafane, G., 1987. Multivariate morphometrics of vesper mice (*Calomys*): preliminary assessment of species, population, and strain divergence. *Z. Sauw.* 52, 236–242.
- de Barros Lopes, L., Guterres, A., Rozental, T., Carvalho de Oliveira, R., Mares-Guia, M.A.M.A., Fernandes, J., Figueredo, J.F.J.F., Anschau, I., de Jesus, S., Almeida, A.B.M., Cristina da Silva, V., Gomes De Melo Via, A.V.A.V., Bonvicino, C.R.C.R., D'Andrea, P.S., Barreira, J.D.J.D., Sampaio De Lemos, E.R., Almeida, A.B., Cristina da Silva, V., Gomes De Melo Via, A.V.A.V., Bonvicino, C.R.C.R., Andrea, D.P.S., Barreira, J.D.J.D., de Lemos, E.R., 2014. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. *Parasit. Vectors* 7, 191. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-191>.
- de Lemos, E.R.S., D'Andrea, P.S., 2014. Trabalho De Campo Com Animais: Procedimentos, Riscos E Biossegurança. Editora Focruz, Rio de Janeiro.
- de Oliveira, R.C., Guterres, A., Fernandes, J., D'Andrea, P.S., Bonvicino, C.R., de Lemos, E.R.S., 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses* 6, 1929–1973. <http://dx.doi.org/10.3390/v6051929>.
- D'Elia, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19, 307–323. [http://dx.doi.org/10.1016/S0748-3007\(03\)00071-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0748-3007(03)00071-9).
- D'Elia, G., Pardiñas, U.F.J., Jayat, J.P., Salazar-Bravo, J., 2008. Systematics of necromys (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *J. Mammal.* 89, 778–790.
- Downs, W.G., Anderson, C.R., Spence, L., Aitken, T.H., Greenhall, A.H., 1963. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 640–646.
- Emonet, S.F., de la Torre, J.C., Domingo, E., Sevilla, N., 2009. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect. Genet. Evol.* 9, 417–429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.03.005>.
- Engel, S.R., Hogan, K.M., Taylor, J.F., Davis, S.K., 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents. *Mol. Biol. Evol.* 15, 35–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2007.10.015>.
- Fernandes, J., de Oliveira, R.C., Guterres, A., de Carvalho Serra, F., Bonvicino, C.R., D'Andrea, P.S., Cunha, R.V., Levis, S., de Lemos, E.R.S., 2015. Co-circulation of clade C new world arenaviruses: new geographic distribution and host species. *Infect. Genet. Evol.* 33, 242–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.010>.
- Fulhorst, C.F., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Tesh, R.B., 1999. Experimental infection of the cane mouse *Zygodontomys brevicauda* (family Muridae) with guaranito virus (Arenaviridae), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 180, 966–969. <http://dx.doi.org/10.1086/315029>.
- Fulhorst, C.F., Charrel, R.N., Weaver, S.C., Ksiazek, T.G., Bradley, R.D., Milazzo, M.L., Tesh, R.B., Bowen, M.D., 2001. Geographic distribution and genetic diversity of Whitewater Arroyo virus in the southwestern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 403–407.
- García, J.B., Morzunov, S.P., Levis, S., Rowe, J., Calderón, G., Enría, D., Sabatini, M., Buchmeier, M.J., Bowen, M.D., St Jeor, S.C., 2000. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology* 272, 127–136. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0345>.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- Huttenner, R., 2005. Mammal species of the world. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press, pp. 220–311.
- Irwin, N.R., Bayerlova, M., Missa, O., Martínková, N., 2012. Complex patterns of host switching in New World arenaviruses. *Mol. Ecol.* 21, 4137–4150. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05663.x>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Lavergne, A., de Thoisy, B., Donato, D., Guidez, A., Matheus, S., Catzeflis, F., Lacoste, V., 2015. Patava virus, a new arenavirus hosted by forest rodents in French Guiana. *Ecohealth* 12, 339–346. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0971-6>.
- Martinez Peralta, L.A., Cossio, P.M., Sabatini, M.S., Maiztegui, J.I., Arana, R.M., Laguens, R.P., 1979. Ultrastructural, immunohistochemical and virological studies in organs of *Calomys musculus* infected with Junin by natural routes. *Med. (B Aires)* 39, 213–217.
- Massoia, E., Pardiñas, U.F., 1993. El estado sistemático de algunos muroideos estudiados por Ameghino en 1889; revalidación del género *Necromys* (Mammalia, Rodentia, Cricetidae). *Rev. Asoc. Paleontol. Argent* 30.
- Milazzo, M.L., Cajimat, M.N.B., Duno, G., Duno, F., Utrera, A., Fulhorst, C.F., 2011. Transmission of guaranito and piritral viruses among Wild Rodents, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110393>.
- Milazzo, M.L., Cajimat, M.N.B., Mauldin, M.R., Bennett, S.G., Hess, B.D., Rood, M.P., Conlan, C. a., Nguyen, K., Wekesa, J.W., Ramos, R.D., Bradley, R.D., Fulhorst, C.F., 2015. Epizootiology of tacaribe serocomplex viruses (Arenaviridae) associated with neotomine rodents (Cricetidae, Neotominae) in southern California. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 156–166. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1625>.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., McKee, K.T., Ksiazek, T.G., Oro, J.G., Maiztegui, J.I., Calderon, G.E., Peters, C.J., Childs, J.E., 1991. Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 589–597.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., McKee, K.T., Calderon, G.E., Maiztegui, J.I., Nelson, G.O., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Childs, J.E., 1992. A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 749–763.
- Mills, J.N., Ellis, B.A., Childs, J.E., McKee, K.T., Maiztegui, J.I., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Jahring, P.B., 1994. Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 554–562.
- Musser, G.G., Carleton, M.D., 2005. Superfamily muroidea. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 849–1531.
- Olayemi, A., Cadar, D., Magassouba, N., Obadare, A., Kourouma, F., Oyeyiola, A., Fasogbon, S., Igbokwe, J., Rieger, T., Bockholt, S., Jérôme, H., Schmidt-Chanasit, J., Garigliany, M., Lorenzen, S., Igbahenah, F., Fichet, J.-N., Ortsega, D., Omilabu, S., Günther, S., Fichet-Calvet, E., 2016. New hosts of the lassa virus. *Sci. Rep.* 6, 25280. <http://dx.doi.org/10.1038/srep25280>.
- Parodi, A.S., Greenway, D.J., Rugiero, H.R., Frigerio, M., de la Barrera, J.M., Mettler, N., Garzon, F., Boxada, M., Guerrero, L., Nota, N., 1958. Concerning the epidemic outbreak in Junin. *Dia Médico* 30, 2300–2301.
- Radoshitzky, S.R., Bao, Y., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Clawson, A.N., Clegg, C.S., DeRisi, J.L., Emonet, S., Gonzalez, J.-P., Kuhn, J.H., Lukashevich, I.S., Peters, C.J., Romanowski, V., Salvato, M.S., Stenglein, M.D., de la Torre, J.C., 2015. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 160, 1851–1874. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2418-y>.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sy029>.
- Rowe, W.P., Murphy, F.A., Bergold, G.H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann-Grube, F., Mins, C.A., Traub, E., Webb, P.A., 1970. Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J. Virol.* 5, 651–652.
- Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W., Tinnin, D.S., Yates, T.L., 2001. Phylogeny and evolution of the neotropical rodent genus *Calomys*: inferences from mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 173–184. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2001.0965>.
- Salazar-Bravo, J., Dragoo, J.W., Bowen, M.D., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Yates, T.L., 2002. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1, 191–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00026-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00026-6).
- Saylor, K.A., Barbet, A.F., Chamberlain, C., Clapp, W.L., Alleman, R., Loeb, J.C., Lednicky, J.A., Kuhn, J.H., 2014. Isolation of tacaribe virus, a caribbean arenavirus, from host-seeking *amblyomma americanum* ticks in Florida. *PLoS One* 9, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115769>.
- Sesso, A., 2007. Fixação de sistemas biológicos. In: Souza, W. (Ed.), *Manual Sobre Técnicas Básicas Em Microscopia Eletrônica*. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, pp. 13–21.
- Videla, C., Kajon, A., Carballal, G., Weissenbacher, M., 1989. *Calomys callidus* as a potential junin virus reservoir. *J. Med. Virol.* 27, 238–243. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.1890270310>.
- Vitullo, A.D., Merani, M.S., 1988. Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in nature? *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 6), 1437–1440. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-6-1437>.
- Vitullo, A.D., Hodara, V.L., Merani, M.S., 1987. Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 663–669.
- Walker, D.H., Wulff, H., Lange, J.V., Murphy, F.A., 1975. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea pigs, and *Mastomys natalensis*. *Bull. World Health Organ.* 52, 523–534.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbook. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Webb, P.A., Johnson, K.M., Peters, C.J., Justines, G., 1973. Behavior of Machupo and Latino Viruses in *Calomys callosus* from Two Geographic Areas of Bolivia. *Lymphocytic Choriomeningitis Virus Other Arenaviruses*. pp. 313–322.
- Webb, P.A., Justines, G., Johnson, K.M., 1975. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull. World Health Organ.* 52, 493–499.
- Yama, I.N., Cazaux, B., Britton-Davidian, J., Moureau, G., Thirion, L., de Lamballerie, X., Dobbigny, G., Charrel, R.N., 2012. Isolation and characterization of a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus from rodents in southwestern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 893–903. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0892>.
- Zapata, J.C., Salvato, M.S., 2013. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. *Viruses* 5, 241–278. <http://dx.doi.org/10.3390/v5010241>.

4.1.3. Artigo 3 - Xapuri virus, a novel mammarenavirus: natural reassortment and increased diversity between New World viruses

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.1.** Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo específico:

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista *Emerging Microbes and Infection*.

Fator de Impacto da Revista: 5,6

Referência: Fernandes J, Guterres A, de Oliveira RC, Chamberlain J, Lewandowski K, Teixeira BR, Coelho TA, Chrisostomos C, Bonvicino CR, D'Ándrea PS, Hewson R, de Lemos ERS. Xapuri virus a novel mammarenavirus from Amazon Region. *Emerg Infect Dis*. 2018.

ARTICLE

Open Access

Xapuri virus, a novel mammarenavirus: natural reassortment and increased diversity between New World viruses

Jorlan Fernandes¹, Alexandro Guterres¹, Renata Carvalho de Oliveira¹, John Chamberlain², Kuiama Lewandowski², Bernardo Rodrigues Teixeira³, Thayssa Alves Coelho¹, Charle Ferreira Crisóstomo^{3,4,5}, Cibele Rodrigues Bonvicino^{3,6}, Paulo Sérgio D'Andrea^{3,5}, Roger Hewson² and Elba Regina Sampaio de Lemos¹

Abstract

Mammarenavirus RNA was detected in Musser's bristly mouse (*Neacomys musseri*) from the Amazon region, and this detection indicated that rodents were infected with a novel mammarenavirus, with the proposed name Xapuri virus (XAPV), which is phylogenetically related to New World Clade B and Clade C viruses. XAPV may represent the first natural reassortment of the *Arenaviridae* family and a new unrecognized clade within the Tacaribe serocomplex group.

Introduction

Arenaviruses are bi-segmented ambisense RNA viruses hosted by rodents, bats, snakes, shrews, and ticks^{1–3}. The *Arenaviridae* family currently comprises 41 viral species, classified into three genera, *Mammarenavirus* (35 species), *Reptarenavirus* (five species), and *Hartmanivirus* (one specie)⁴. Each of the two arenavirus RNA segments encodes genes for two non-overlapping reading frames in ambisense polarity: the large (L) genomic segment for the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp or L protein) and a zinc-binding matrix protein (Z protein), whereas the small (S) genomic segment encodes for the nucleocapsid protein (NP) and glycoprotein precursor (GPC), which are post-translationally processed into the envelope proteins G1 and G2 and the stable signal peptide (SSP)^{1,5}.

Mammarenaviruses were also classified into two groups according to their genomic features and antigenic properties: the Old World Lassa-Lymphocytic

choriomeningitis virus (LCMV) serocomplex, including viruses from Africa and, recently, Asia; and the New World Tacaribe serocomplex, formed by viruses indigenous to the Americas^{1,5–7}.

Despite the increased number of Old World viruses characterized in recent years³, New World mammarenaviruses remain the most genetically diverse viral group within the family, composed of 18 species divided into four lineages: Clade A, Clade A-recombinant (Clade D), Clade B, and Clade C, according to their phylogenetic relationships^{1,5,7}. Clades A and B include five (Allpahuayo, Flexal, Paraná, Pichindé, and Pirital) and seven (Amaparí, Cupixi, Guanarito, Junín, Machupo, Tacaribe, and Sabiá) South American arenaviruses, respectively, regardless of the gene used for phylogenetic analysis^{7,8}. Only Oliveros and Latino viruses were identified in Clade C, regardless of the gene sequence used for analysis⁵. Discrepancies were observed for mammarenaviruses indigenous to North America (Tamiami, Whitewater Arroyo, and Bear Canyon viruses) and for a proposed new species from French Guiana. An analysis based on complete sequences confirms that the S RNA genome of these arenaviruses has a chimeric origin, likely a recombination event that occurred in an ancestral virus^{9,10}. These viruses form a separate lineage known as Clade A/Rec and are proposed

Correspondence: Jorlan Fernandes (jorlan@ioc.fiocruz.br) or Elba Lemos (elba.lemos@ioc.fiocruz.br)

¹Laboratory of Hantaviruses and Rickettsiosis, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro – RJ 21040-360, Brazil

²National Infection Service, Public Health England, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK

Full list of author information is available at the end of the article.

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

to be named Clade D according to the latest updates in arenaviruses taxonomy¹.

The Amazon River Basin Region is a vast territory, encompassing nine South American countries: Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guiana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela. This region contains the world's largest tropical rainforest, with a climate characterized by high temperatures and humidity and copious rainfall, and the most varied ecosystem in the world. Favorable conditions exist for the transmission of numerous infectious agents, particularly from increasing contact of the human population to wild interface areas and because of accelerating population growth, environmental, and climate changes¹¹. In fact, the Amazon Basin is often regarded as a hot spot for viruses and other pathogens that find optimal conditions to emerge or reinforce their pathogenic potential¹².

To date, three mammarenavirus were detected in the Brazilian Amazon during surveys conducted in the 1960s: Amapari virus (*Neacomys guianae*), Cupixi virus (*Oryzomys megacephalus*), and Flexal virus from an unidentified oryzomyini rodent^{5,7,13,14}. Here, we report the identification of a novel mammarenavirus in *Neacomys musseri* (Rodentia: Sigmodontinae) from the Amazon Basin Region; we propose that this mammarenavirus be designated as Xapuri virus (XAPV) after the locality where this new virus was detected.

Results

A total of 49 rodents were analyzed: 22 from Porto Acre, 16 from Xapuri, and 11 from Rio Branco localities; *Neacomys spinosus* (17) and *Oecomys bicolor* (9) were the most abundant (Table 1). Amplification of the partial GPC gene was observed for one *Neacomys musseri* (1/49–2.0%) male collected in 2015, in the Seringal Cachoeira locality, Xapuri municipality (Fig. 1).

Complete genome sequencing of *Neacomys musseri* mammarenavirus included two segments: the L segment (GenBank MG976577) of 7049 nucleotides (nt) and the S segment (GenBank MG976578) of 3405 nt. Each segment encoded two open reading frames (ORFs) in an ambisense organization with an intergenic region of 72 and 88 nt in length containing a predicted hairpin between the ORFs for the S and L segment, respectively. NP, GPC, Z, and L protein lengths were 557 amino acids (aa), 512, 96, and 2199 aa, respectively (Fig. 2). Additional features commonly observed in mammarenavirus genomes include the conservation of the 3'–5' termini and the presence of an L-domain motif within the Z protein.

Deduced aa and nt sequences from the four proteins and complete S and L segments were compared to those of other representative mammarenaviruses. Nucleotide sequence divergences of >34.8 and >41.2% for the S and L segments, respectively, were found between the *Neacomys*

Table 1 Rodents captured in three localities from Acre state, Brazil, 2015–2016, by species and locality

Species	Number of captured rodents			
	Porto Acre	Rio Branco	Xapuri	Total
<i>Euryoryzomys macconelli</i>	—	—	1	1
<i>Hylaeamys perenensis</i>	—	—	2	2
<i>Hylaeamys yunganus</i>	1	—	1	2
<i>Mesomys hispidus</i>	1	—	1	2
<i>Neacomys musseri</i>	—	—	4	4
<i>Neacomys spinosus</i>	8	3	6	17
<i>Oecomys bicolor</i>	7	2	—	9
<i>Oecomys</i> sp.	—	—	1	1
<i>Oligoryzomys microtis</i>	1	3	—	4
<i>Proechimys breviceauda</i>	2	—	—	2
<i>Proechimys gardneri</i>	1	1	—	2
<i>Proechimys simonsi</i>	—	2	—	2
<i>Rhipidomys leucodactylus</i>	1	—	—	1
	22	11	16	49

musseri virus and all other known mammarenavirus species, whereas a 38.5% aa sequence divergence was found for the entire NP (Table 2). Pairwise sequence comparison (PASC) was performed on both segments, and our sample was found to be most closely related to Latino (GenBank AF485259) and Oliveros (GenBank NC_010248) viruses demonstrating 62.84–61.32% identity for the S segment, whereas the L segment showed 57.35–55.71% identity with Amapari (GenBank AY924389) and Guanarito viruses (GenBank NC005082).

In the maximum likelihood (ML) and Bayesian phylogenetic analyses for the S and L segments, the Amazonian virus described in this study formed an independent clade closely related to Clades C and B New World mammarenaviruses, respectively (Figs. 3 and 4). Sequences from NP, Z, and L proteins displayed the same topology as the L segment, taking a stem lineage position for New World Clade B viruses (Fig. 5). GPC was the most divergent protein, forming a sister stem lineage clade with New World Clade C viruses (Fig. 5). Bootscan and RDP4 recombination analysis of S and L segment sequences by Simplot revealed no recombination peaks. Reconstructed phylogenetic trees, including the complete nt GPC gene show no alternate clustering of the *N. musseri* virus and Clade C viruses.

Discussion

The genus *Neacomys* Thomas, 1900 (Cricetidae, Sigmodontinae, Oryzomyini) comprises eight valid species

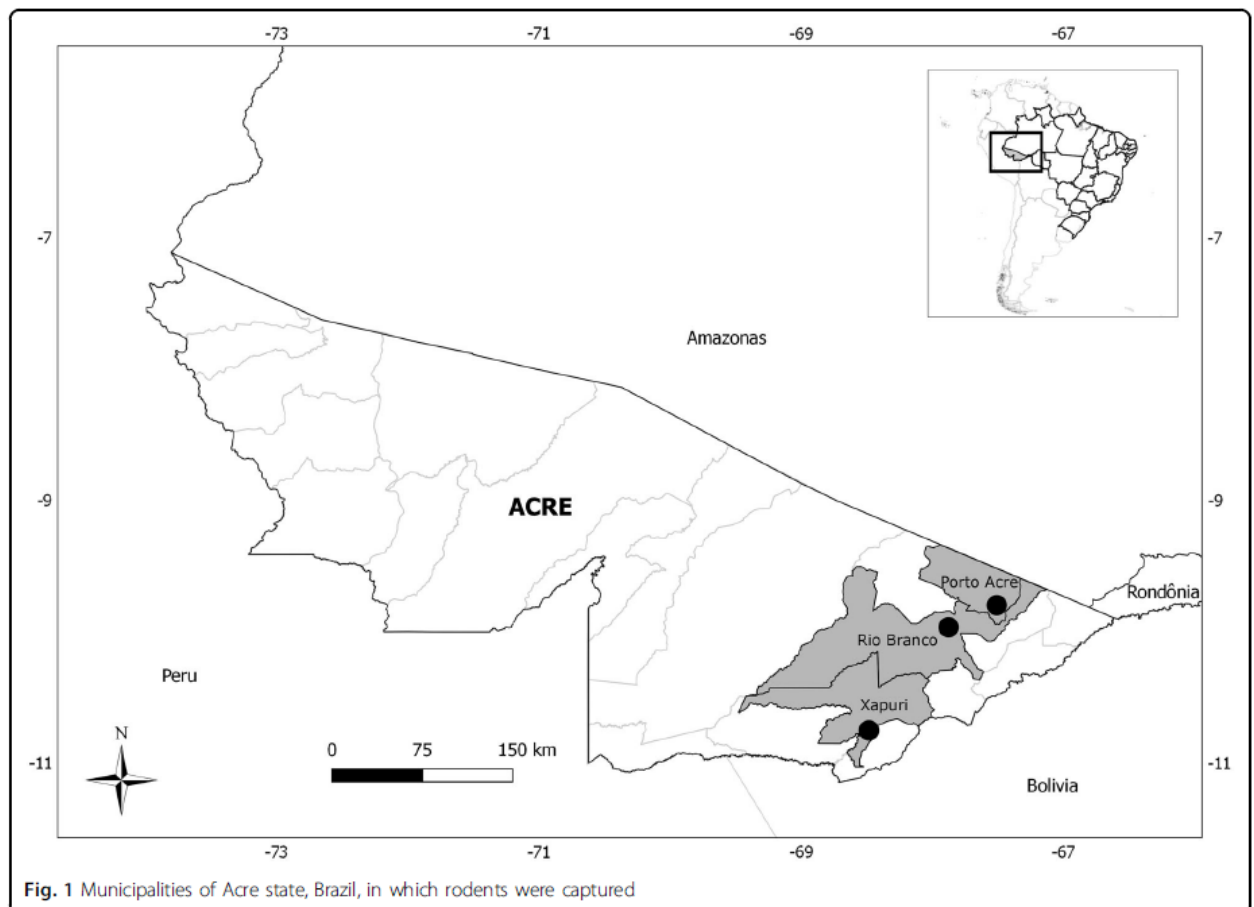


Fig. 1 Municipalities of Acre state, Brazil, in which rodents were captured

of spiny rats, distributed from Central and South America. They are mainly found in the Amazon region (*N. dubosti*, *N. guianae*, *N. minutus*, *N. musseri*, *N. paracou*, and *N. spinosus*), and only two species do not occur in the Brazilian Amazon (*N. pictus* and *N. tenuipes*)^{15,16}. *Neacomys* rodents were identified as important hosts for different rodent-borne viruses in Brazil (Amaparí mammarenavirus) and Peru (Andes orthohantavirus)^{13,17}. In fact, *Neacomys guianae* is the host of Amaparí virus, a Clade B mammarenavirus from Amapá state, in the Brazilian Amazon¹³. The detection of a new mammarenavirus in another *Neacomys* reinforces the importance of these rodents in mammarenavirus enzootic cycles, particularly in the Amazon region.

Delineating species in the *Arenaviridae* family follows multiple criteria, including the association with a main host species or group of sympatric hosts, the presence in a defined geographical area, and significant protein sequence differences, such as a variance of at least 12.0% in the aa sequence of the NP compared to that of other species in the genus^{1,18}. In addition, a recent update from the International Committee on Taxonomy of

Viruses (ICTV)¹ also includes as classifiable “virus coding-complete genomic sequences for both S and L segments even in the absence of a culturable isolate” and recommends the use of the PASC tool for the assessment of novel arenaviruses. Cut-off values selected for classifying arenaviruses belonging to the same species using this tool are >80.0 and >76.0% regarding nucleotide sequence identity in the S and L segments, respectively¹. The virus identified in this study from *N. musseri* is the first mammarenavirus detected in this rodent species, the only mammarenavirus isolated from Acre State, and the fourth from the Brazilian Amazon^{14,19}. Furthermore, the sequence of this virus also meets the nucleoprotein aa sequence identities and PASC requirements detailed by the ICTV as being novel; thus, we suggest naming it XAPV after the municipality where it was detected. Xapuri in a native language from the Amazon means “river before.” The city received this name because it is located between the Xapuri and Acre rivers. Accordingly, we believe the name is suitable for XAPV’s genetic characteristics, standing as it does between Clade B and Clade C New World mammarenaviruses.

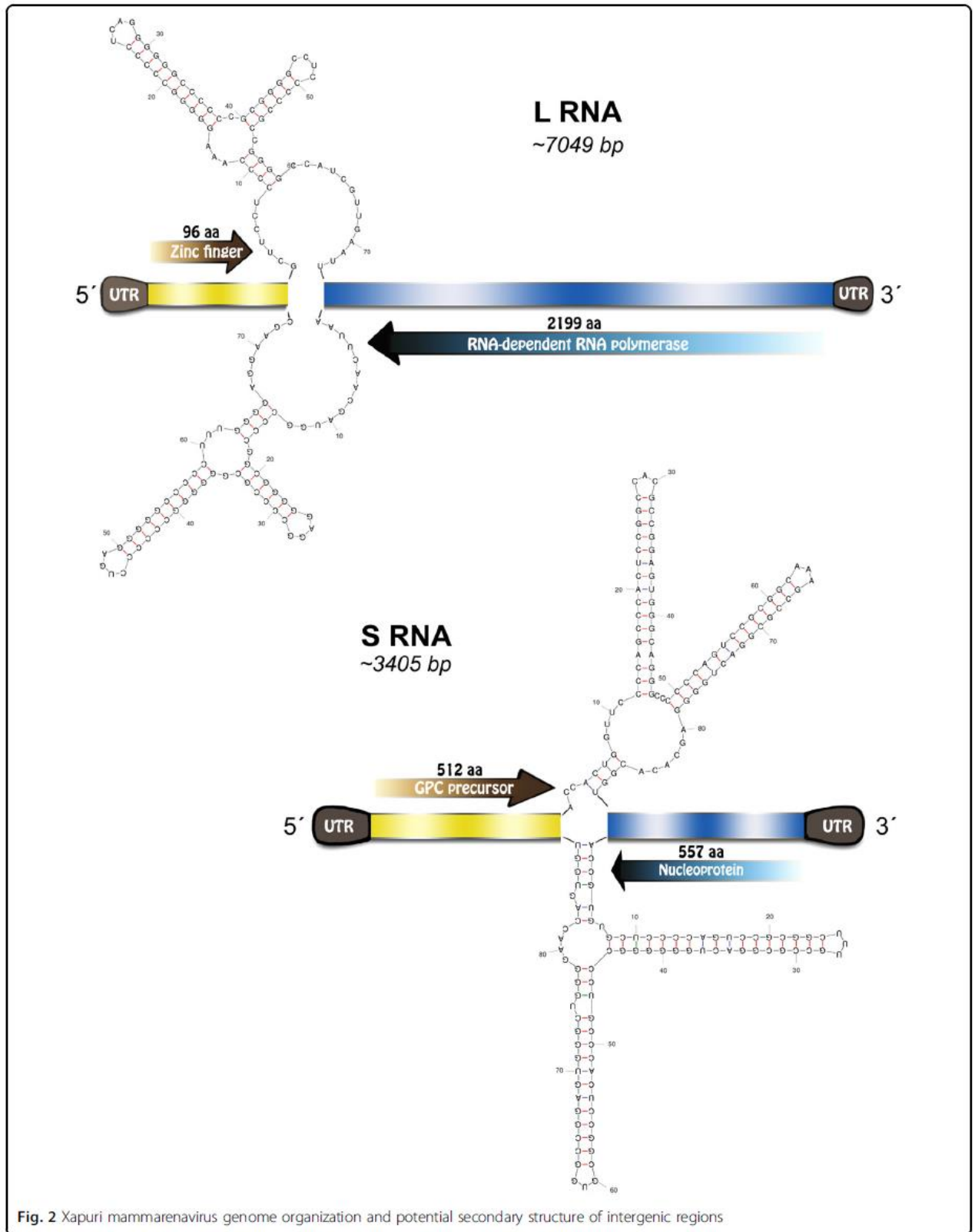


Table 2 Nucleotide and amino acid identities of XAPV compared with New World representatives of the genus *Mammarenavirus*

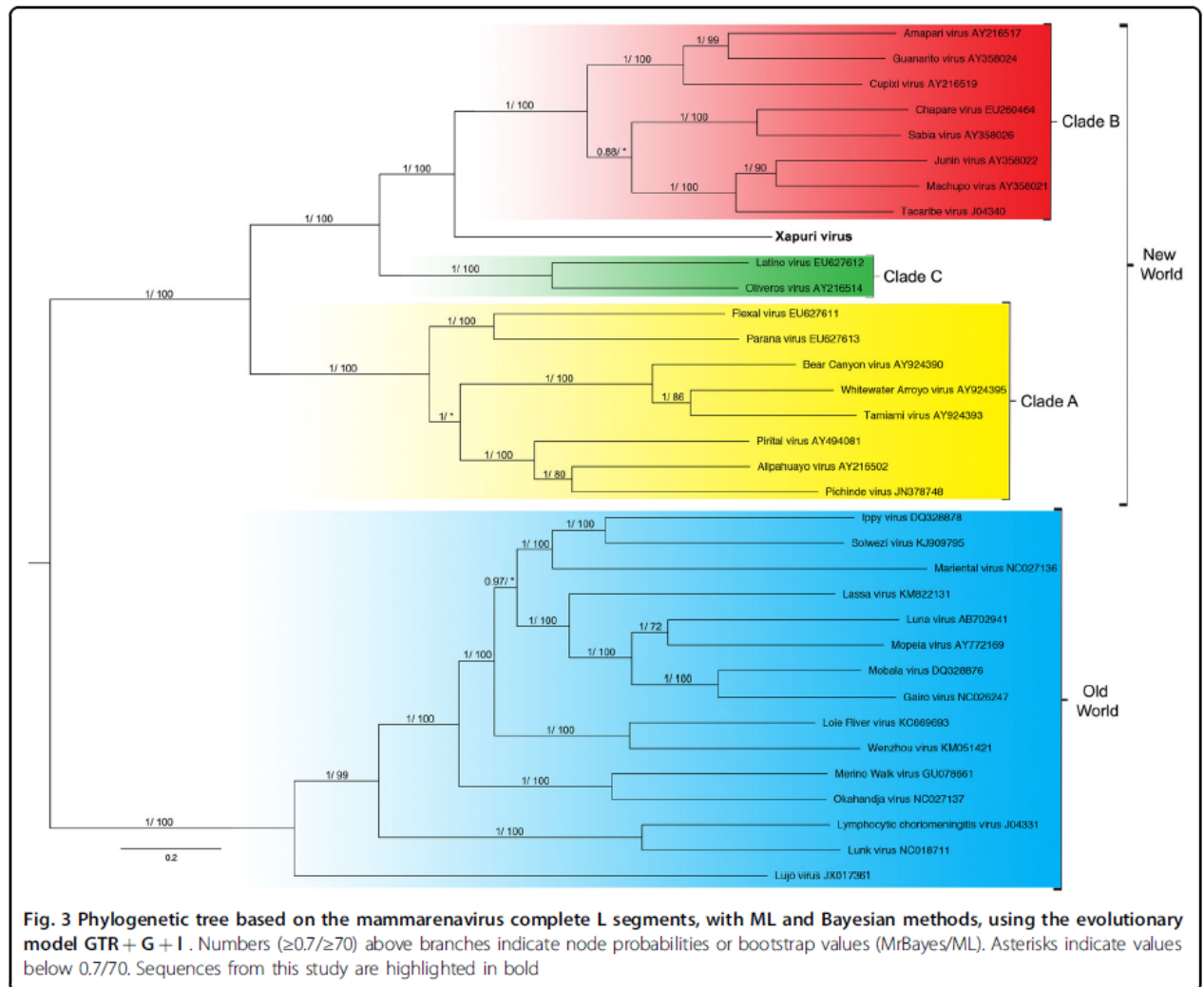
Virus species	<i>p</i> distance					
	L segment (nt)			S segment (nt)		
		Z (aa)	L (aa)		NP (aa)	GPC (aa)
Allpahuayo	46.7%	50.7%	56.2%	39.9%	45.0%	44.3%
Amaparí	41.2%	48.0%	48.4%	39.8%	40.5%	53.4%
Bear Canyon	47.4%	53.3%	56.9%	42.1%	46.0%	50.6%
Chapare	41.8%	48.0%	48.7%	37.6%	38.7%	46.2%
Cupixi	42.8%	46.7%	48.9%	40.3%	38.9%	51.5%
Flexal	48.1%	52.0%	57.1%	39.9%	44.6%	42.0%
Guanarito	42.8%	40.0%	48.7%	38.8%	39.5%	52.4%
Junín	43.2%	46.7%	50.7%	38.5%	41.5%	48.5%
Latino	42.6%	50.7%	50.2%	35.2%	38.9%	44.8%
Machupo	43.1%	45.3%	48.7%	38.9%	38.5%	47.3%
Oliveros	42.4%	49.3%	48.6%	34.8%	38.5%	34.8%
Paraná	46.3%	52.0%	56.0%	39.6%	45.6%	45.5%
Pichindé	46.8%	56.0%	57.3%	40.8%	45.4%	44.3%
Pirital	46.7%	58.7%	55.7%	39.7%	44.6%	46.6%
Sabiá	41.9%	46.7%	49.6%	37.6%	40.3%	48.3%
Tacaribe	43.0%	46.7%	49.5%	41.5%	42.8%	48.3%
Tamiami	47.8%	48.0%	56.5%	41.6%	47.0%	51.0%
Whitewater Arroyo	47.3%	54.7%	57.2%	42.0%	47.7%	50.8%

XAPV Xapuri virus

XAPV features are interesting for the Tacaribe virus serocomplex group. The placement of XAPV as a divergent but sister group of Clade C and Clade B mammarenaviruses for S segment and L segments, respectively, could be indicative of reassortment between these clades. Nevertheless, although many studies indicated that viral diversification during arenavirus evolution is due to high mutation rates from a low-fidelity viral RdRp, recombination and reassortment events (as for other segmented RNA viruses), no reassortant mammarenavirus were previously isolated from nature^{9,20,21}. This absence of natural arenavirus reassortments was attributed to the superinfection exclusion exhibited by some members of this family in chronic infection models. However, more recent studies demonstrated that acute infection by New World Junín virus failed to down-regulate entry receptors and did not induce superinfection exclusion^{22,23}. Additionally, it is noteworthy that arenavirus reassortants have been produced *in vitro*, and these data indicate that there are restrictions that prevent the recovery of all possible combinations and that only closely related viruses may be able to reassort with one

another^{20,24,25}. Indeed, recent studies showed that reassortment may be a common event for newly recognized reptarenaviruses²⁶. During reassortment events, in which entire genes are exchanged during the swapping of segments, the ORF of the gene and, consequently, the protein integrity, are maintained without changes in ORFs and their encoded proteins as shown for XAPV (Figs. 3–5). Therefore, we propose that XAPV may represent the first identification of a natural reassortant of the *Arenaviridae* family that has arisen from two mammarenavirus groups that are not closely related.

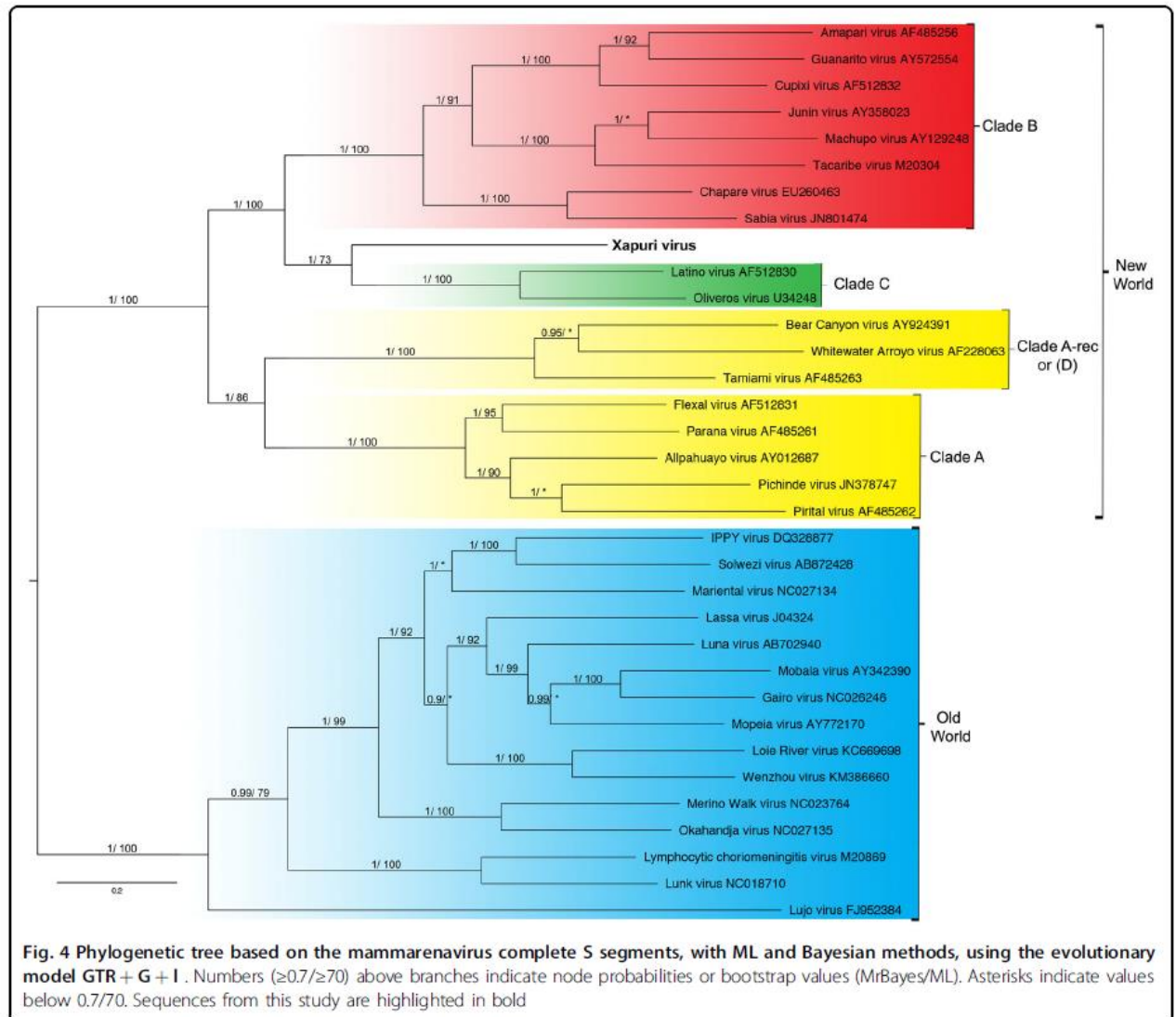
As for recombination events within the S RNA segment of North American arenaviruses (Clade D), reassortment between Clade B and Clade C likely occurred during the early stages of South American mammarenavirus evolution^{1,5–7,9,27}. In fact, when we analyze XAPV proteins, a recombination pattern similar to those for Clade D is found. GPC sequence analysis places XAPV in a sister relationship with Clade C, whereas analysis of the N, Z, and L protein sequence data places it in a sister relationship with Clade B²⁷.



The generation of reassortant or recombinant arenaviruses requires cells to be simultaneously infected by two or more different viruses. Although coinfections were reported in cell culture, this infection may be less likely to happen in nature^{22–24}. Persistent infection of rodent reservoirs is also an important factor that could influence the rate of recombination and reassortment, facilitating coinfection of cells with two different virus^{28,29}. Similarly, different mammarenaviruses can sometimes infect the same rodent species, such as Guanarito and Pirital viruses, which were both isolated from *Zigodontomys brevicauda* and *Sigmodon hispidus* in Venezuela³⁰. Irwin et al.³¹ suggested that host switching is mainly responsible for arenavirus evolution, which may contribute to coinfection of a single host species with Clade B and Clade C ancestors of XAPV and possibly other related viruses. It is possible that future investigations will reveal new arenaviruses closely related to XAPV and define a new fifth clade within New World mammarenaviruses, composed of chimeric viruses of Clades B and C.

Studies conducted with ML29, an *in vitro* reassortant virus consisting of the Lassa virus S genomic segment and the Mopeia virus L segment, suggest that major virulence factors are located on the L genomic segment^{32,33}. In fact, many studies demonstrated key aspects of the L and Z proteins during arenavirus infection^{34,35}. A hallmark feature of arenavirus hemorrhagic fevers are the high levels of viremia related to the L protein and its capacity to enhance intracellular levels of replication^{36–39}, whereas the Z protein of pathogenic arenaviruses has an immune suppressive function inhibiting interferon responses^{40,41}. Although it is not yet clear whether XAPV can cause human infection, its unique features shared with Clade B and Clade C may make it a potential threat to human health.

In conclusion, XAPV may represent a new clade within New World mammarenaviruses and its unique genetic features could shed light onto evolutionary mechanisms of arenavirus evolution and viral diversification. Further studies should be conducted, particularly in the



Amazon region, to better understand the epizootologic aspects of XAPV and its potential to cause human disease, as well as increase the knowledge of the geographic range and genetic diversity of South American mammarenaviruses.

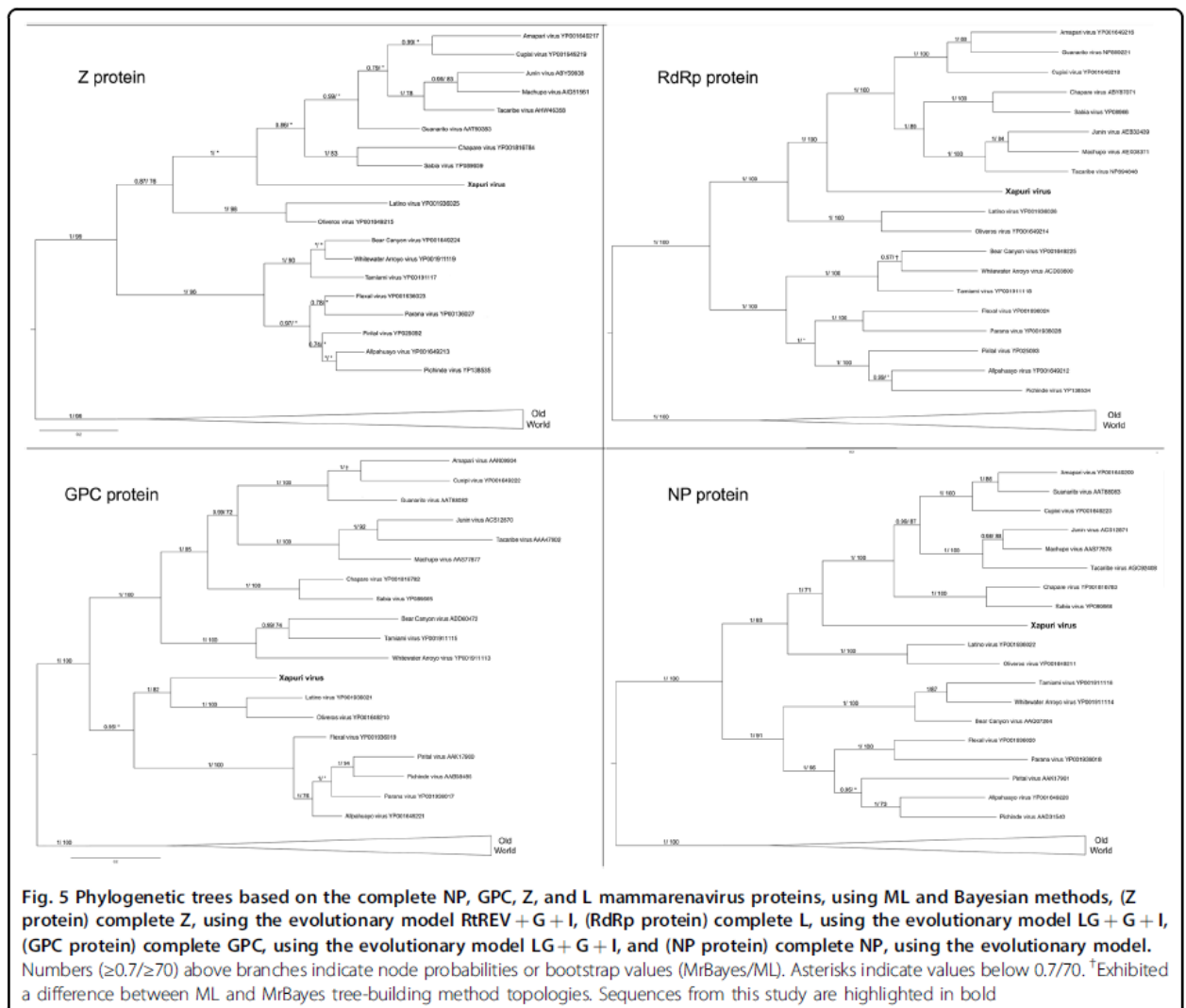
Materials and methods

Study area and small mammal trapping

The fieldwork was conducted in Rio Branco (9°58'29"S 67°48'36"W), Porto Acre (09°35'16"S 67°31'58"W), and Xapuri (10°39'07"S 68°30'14"W) municipalities, Acre State, North Brazil (Fig. 1). Rodent sampling was conducted every 6 months between 2015 and 2016, during five consecutive nights for each of the four capture sessions. The capture effort was constant for all capture sessions. We established transects with capture stations setting Tomahawk (Tomahawk Live Trap, Hazelhurst, WI, USA) (40.64 × 12.70 × 12.70 cm³) and Sherman (HB

Sherman Traps, Tallahassee, FL, USA) (7.62 × 9.53 × 30.48 cm³), live traps baited with a mixture of peanut butter, banana, bacon, and oatmeal.

Specimens were captured, anesthetized, and euthanized according to recommended safety procedures and under the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil, License number LW-39/14⁴². Animals were captured with authorization of the Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBIO Authorization 13373). Specimens were then measured, weighed, sexed, and identified by cranial morphology/morphometry and karyotyping when necessary. Collected tissues were placed in RNAlater™ Stabilization Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stored at -20 °C. Mammarenavirus-positive rodent specimens were confirmed by molecular analysis (amplification of the cytochrome *b* gene)⁴³. Voucher rodent specimens were deposited in the Laboratory of



Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs collection, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Mammarenavirus detection

The total RNA was extracted from liver and kidney tissue fragments using the PureLink Micro-To-Midi total RNA Purification Kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Mammarenavirus detection was performed according to previously described protocols targeting fragments of GPC and NP genes from the S segment of mammarenaviruses^{8,44}.

Metagenomic library preparation

The isolated RNA was depleted of ribosomal RNA using NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England BioLabs Inc.) and was cleaned up using a Zymo Clean and Concentrator column (Zymo Research). A 4 μ l aliquot of RNA was used to prepare complementary DNA

(cDNA) using a Sequence Independent Single Primer Amplification approach adapted from ref⁴⁵. Reverse transcription and second-strand cDNA synthesis were as described. The cDNA amplification was performed using AccuTaq LA (Sigma), in which 5 μ l of cDNA and 1 μ l (100 pmol/ μ l) primer B (5'-GTTTCCCCTGGAGGAT A-3') were added to a 50 μ l reaction, according to the manufacturer's instructions. The PCR conditions were as follows: 98 °C for 30 s, 30 cycles of 94 °C for 15 s, 50 °C for 20 s, and 68 °C for 5 min, followed by 68 °C for 10 min. Amplified cDNA was purified using a 1:2 ratio of AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and quantified using a Qubit and High Sensitivity dsDNA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Illumina library preparation and sequencing

An Illumina sequencing library was prepared using the Nextera XT V2 Kit with 1.5 ng of cDNA as the input,

following the manufacturer's instructions. Indices were selected using the Illumina experiment manager software. Samples were multiplexed in batches of a maximum of eight samples per run and sequenced on a 2 × 150 bp paired-end Illumina MiSeq run by the Genomics Services Development Unit, Public Health England.

Data handling

Reads were trimmed to remove adaptors and low-quality bases, to achieve an average phred score of Q30 across the read, using trimmomatic⁴⁶. BWA MEM v0.7.15⁴⁷ was used to align reads to the *Mus musculus* reference genome (assembly GRCm38.p6). Viral reads were extracted from the fastq files using seq_select_by_id⁴⁸. De novo assemblies were generated using Spades 3.8.2⁴⁹ in combination with SSPACE Standard v3.0⁵⁰. Contigs larger than 1 kb were searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database using a translated nucleotide query⁵¹.

Complete coding sequences for both segments of each virus were loaded into the PASC tool and analyzed using the default parameters (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/viridty.cgi?cmdresult=main&id=448>)⁵².

Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignment and comparison of aa were performed using MAFFT version 7 with the E-INS-i algorithm in the Jalview v.4 software program^{53,54}. Phylogenetic relationships were estimated with (a) ML phylogenetic inference using PhyML implemented in SeaView v.4 software program^{55,56}, and (b) a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in MrBayes v3.2.6⁵⁷. For the Bayesian analyses, we used a mixed aa model of evolution with a γ -shaped distribution of rates across sites. This model allows selection to be integrated across all best-fit models. The MCMC settings consisted of two simultaneous independent runs with four chains each that were run for 10 million generations and sampled every 100th generation, yielding 100,000 trees. After eliminating 10% of the samples as burn-in, a consensus tree was built. Statistical support for the clades was measured by a heuristic search with 1000 bootstrap replicates and the Bayesian posterior probabilities. The best-fit evolutionary model was determined using MEGA version 7, using the Bayesian Information Criterion⁵⁸.

Detection of recombination

To analyze possible recombination events, a set of 33S and L segment sequences from all mammarenavirus recognized by ICTV (http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_arena.htm (accessed 02 February 2018)) were aligned, including the sequence generated in the present study. Sequence alignment was analyzed with Bootscan

implemented in Simplot and RDP4 software^{59,60}. The sequences for Bootscan analysis were grouped according to the clustering clades in the phylogenetic trees for the L and S segment, and the sequence of the XAPV comprised the query group.

Acknowledgements

We thank Tatiana Rozental (Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ) for providing support. This study was supported by FIOCRUZ, Acre Federal Institute (IFAC), the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 404762/2016-6).

Authors' contributions

J.F., A.G., R.C.O., J.C., T.A.C. and K.L. designed the experiments and performed the experiments. B.R.T., C.F.C., C.R.B. and P.S.D. conducted fieldwork and performed rodent taxonomy. J.F., A.G., R.C.O., R.H. and E.R.S.L. interpreted the data, prepared the figures, and wrote the manuscript. E.R.S.L. conceived the project.

Author details

¹Laboratory of Hantaviruses and Rickettsiosis, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro – RJ 21040-360, Brazil. ²National Infection Service, Public Health England, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK. ³Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro – RJ 21040-360, Brazil. ⁴Federal Institute of Acre, Rio Branco – AC 69900-640, Brazil. ⁵Postgraduate Program in Biodiversity and Health, Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro – RJ 21040-360, Brazil. ⁶National Cancer Institute, Rio de Janeiro – RJ 20230-130, Brazil

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Received: 2 April 2018 Revised: 21 May 2018 Accepted: 27 May 2018
Published online: 29 June 2018

References

- Radoshitzky, S. R. et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* **160**, 1851–1874 (2015).
- Saylor, K. A. et al. Isolation of tacaribe virus, a caribbean arenavirus, from host-seeking amblyomma americanum ticks in Florida. *PLoS ONE* **9**, 1–16 (2014).
- Li, K. et al. Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China. *Virology* **476**, 37–42 (2015).
- Maes, P. et al. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>, 1–16 (2018).
- Charrel, R. N., de Lamballerie, X. & Emonet, S. Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 362–368 (2008).
- Emonet, S., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., de Lamballerie, X. & Charrel, R. N. Phylogeny and evolution of old world arenaviruses. *Virology* **350**, 251–257 (2006).
- Charrel, R. N. et al. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* **317**, 191–196 (2003).
- Bowen, M. D., Peters, C. J. & Nichol, S. T. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* **219**, 285–290 (1996).
- Archer, A. M. & Rico-Hesse, R. High genetic divergence and recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology* **304**, 274–281 (2002).
- Cajimat, M. N. B., Milazzo, M. L., Hess, B. D., Rood, M. P. & Fulhorst, C. F. Principal host relationships and evolutionary history of the North American arenaviruses. *Virology* **367**, 235–243 (2007).
- Penna, G., Pinto, L. F., Soranz, D. & Glatt, R. High incidence of diseases endemic to the amazon region of brazil, 2001–2006. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 626–632 (2009).

12. Olival, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* **546**, 646–650 (2017).
13. Pinheiro, F., Shope, R. E., Andrade, A. P. & Ba, G. Amapari, a New Virus of the Tacaribe Group from Rodents and Mites of Amapa Territory, Brazil. *Exp. Biol. Med.* **122**, 531–535 (1966).
14. Pinheiro, F., Webber, J. P. & Da Rosa Travassos, A. P. A. Studies of arenaviruses in Brazil. *Med. (B. Aires)* **37**, 175–181 (1977).
15. Da Silva, W. O. et al. Diversity and karyotypic evolution in the Genus *Neacomys* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytogenet. Genome Res.* **146**, 296–305 (2015).
16. Da Silva, W. O. et al. Chromosomal diversity and molecular divergence among three undescribed species of *Neacomys* (Rodentia, Sigmodontinae) separated by Amazonian rivers. *PLoS ONE* **12**, e0182218 (2017).
17. Razuri, H. et al. Andes hantavirus variant in rodents, Southern Amazon Basin, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 257–260 (2014).
18. Salvato, M. S. et al. in *Taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (eds Van Regenmortel, M. H. V. et al.) (Academic Press, New York, 2005).
19. Fernandes, J. et al. Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop.* **179**, 17–24 (2018).
20. Zapata, J. C. & Salvato, M. S. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. *Viruses* **5**, 241–278 (2013).
21. Albariño, C. G., Posik, D. M., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E. & Romanowski, V. Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes* **16**, 39–46 (1998).
22. Ellenberg, P., Edreira, M. & Scolaro, L. Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch. Virol.* **149**, 507–522 (2004).
23. Gaudin, R. & Kirchhausen, T. Superinfection exclusion is absent during acute Junin virus infection of Vero and A549 cells. *Sci. Rep.* **5**, 15990 (2015).
24. Lukashevich, I. S. et al. A live attenuated vaccine for lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia Viruses. *J. Virol.* **79**, 13934–13942 (2005).
25. Zhang, L., Marriott, K. A., Harnish, D. G. & Aronson, J. F. Reassortant analysis of guinea pig virulence of Pichinde virus variants. *Virology* **290**, 30–38 (2001).
26. Stenglein, M. D. et al. Widespread recombination, reassortment, and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. *PLoS Pathog.* **11**, e1004900 (2015).
27. Cajimat, M. N. B. et al. Diversity and phylogenetic relationships among the North American Tacaribe serocomplex viruses (Family Arenaviridae). *Virology* **421**, 87–95 (2011).
28. Sibold, C. et al. Recombination in Tula hantavirus evolution: analysis of genetic lineages from Slovakia. *J. Virol.* **73**, 667–675 (1999).
29. Simon-Loriere, E. & Holmes, E. C. Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 617–626 (2011).
30. Weaver, S. C. et al. Guanarito virus (Arenaviridae) isolates from endemic and outlying localities in Venezuela: sequence comparisons among and within strains isolated from Venezuelan hemorrhagic fever patients and rodents. *Virology* **266**, 189–195 (2000).
31. Irwin, N. R., Bayerlová, M., Missa, O. & Martínková, N. Complex patterns of host switching in New World arenaviruses. *Mol. Ecol.* **21**, 4137–4150 (2012).
32. Shao, J., Liang, Y. & Ly, H. Human hemorrhagic fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis. *Pathogens* **4**, 283–306 (2015).
33. Lan, S. et al. Development of infectious clones for virulent and avirulent Pichinde viruses: a model virus to study arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *J. Virol.* **83**, 6357–6362 (2009).
34. Lukashevich, I. S. et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* **26**, 5246–5254 (2008).
35. Carrion, R. et al. A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine* **25**, 4093–4102 (2007).
36. Berghaler, A. et al. Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 21641–21646 (2010).
37. Matloubian, M., Kolhelkar, S. R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **67**, 7340–7349 (1993).
38. Albariño, C. G. et al. Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of 5' segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J. Virol.* **85**, 4020–4024 (2011).
39. McLay, L., Lan, S., Ansari, A., Liang, Y. & Ly, H. Identification of virulence determinants within the L genomic segment of the Pichinde arenavirus. *J. Virol.* **87**, 6635–6643 (2013).
40. Xing, J., Ly, H. & Liang, Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *J. Virol.* **89**, 2944–2955 (2015).
41. Fan, L., Briese, T. & Lipkin, W. I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J. Virol.* **84**, 1785–1791 (2010).
42. Mills, J. N., Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J. & Velleca, W. M. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Washington (1995).
43. Borvidno, C. R. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. *Bol. Soc. Mastozool.* **62**, 7–11 (2011).
44. García, J. B. et al. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology* **272**, 127–136 (2000).
45. Lohse, M. et al. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res.* **40**, W622–W627 (2012).
46. Wood, D. E. & Salzberg, S. L. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* **15**, R46 (2014).
47. Cock, P. J. A., Grüning, B. A., Paszkiwicz, K. & Pritchard, L. Galaxy tools and workflows for sequence analysis with applications in molecular plant pathology. *PeerJ* **1**, e167 (2013).
48. Bankevich, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 (2012).
49. Cuccuru, G. et al. OriGene, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics* **30**, 1928–1929 (2014).
50. Rissman, A. I. et al. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics* **25**, 2071–2073 (2009).
51. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
52. Bao, Y., Chetverin, V. & Tatusova, T. Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification. *Arch. Virol.* **159**, 3293–3304 (2014).
53. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
54. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
55. Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–224 (2010).
56. Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J. F. & Gascuel, O. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol. Biol.* **537**, 113–137 (2009).
57. Ronquist, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539–542 (2012).
58. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874 (2016).
59. Lole, K. S. et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of inter-subtype recombination. *J. Virol.* **73**, 152–160 (1999).
60. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **1**, vev003 (2015).

4.1.4. Artigo 4 - Genetic diversity between and within the mammarenavirus species harbored by *Oecomys* rodents

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.1.** Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo específico:

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;

Situação do manuscrito: Artigo a ser encaminhado para publicação na revista *Virology*

Fator de Impacto da Revista: 3,3

Referência: Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Chamberlain J, Coelho TA, Afrough B, Graham V, Herrera HM, D'Ándrea PS, Bonvicino CR, Hewson R, de Lemos ERS. Genetic diversity between and within the mammarenavirus species harbored by *Oecomys* rodents. *Virology*. 2018.

**Genetic diversity between and within the mammarenavirus species harbored by
Oecomys rodents**

Jorlan Fernandes, Renata Carvalho de Oliveira, Alexandro Guterres, John Chamberlain,
Thayssa Alves Coelho, Babak Afrough, Victoria Graham, Heitor Miraglia Herrera, Paulo
Sérgio D'Ándrea, Cibele Rodrigues Bonvicino, Roger Hewson, Elba Regina Sampaio de
Lemos

^aLaboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bNational Infection Service, Public Health England, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom

^cLaboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Fiocruz

^dUniversidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil.

^dInstituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Key words: Clade A mammarenavirus, *Oecomys*, rodent-borne viroses, arenavirus, Rio Preto virus

Abstract

Rodents are the primary natural reservoir hosts of the known mammarenaviruses with a few described exceptions. *Oecomys* genus stands out as one of the most speciose, with 17 species currently described, distributed in almost all Brazilian territories. Molecular screening of these rodents from several Brazilian localities has resulted in the identification of three infected species, *O. cleberi*, *Oecomys* sp. and *O. franciscorum* from Cerrado and Pantanal biomes. Thus, we describe a novel New World Clade A mammarenavirus, Rio Preto virus, detected in *O. cleberi* and *Oecomys* sp., demonstrating that Clade A viruses are ecologically complex, maintained by multiple reservoirs.

Many emerging infections are RNA virus spillovers from animal reservoirs. Reservoir identification is necessary for predicting the geographic extent of infection risk (Gryseels et al., 2017). Rodents are the primary natural reservoir hosts of the known mammarenaviruses with a few described exceptions (Downs et al., 1963, Li et al., 2015). Each rodent-borne arenavirus species appears to be primarily associated with one or a few closely related group of rodent species (Salazar-Bravo et al., 2002, Charrel and de Lamballerie, 2010, Zapata and Salvato, 2013). To date, 36 established arenaviruses have been identified worldwide, largely from the Americas, as well as several newly discovered viruses from Asia and Africa (Cajimat et al., 2012, Cajimat et al., 2013, Bisordi et al., 2015, Radoshitzky et al., 2015, Li et al., 2015, Lavergne et al., 2015, Gryseels et al., 2015, Witkowski et al., 2015). Indeed, South America has been point out as a hot spot for emergence of novel zoonotic virus from different animal species, especially rodents (Olival et al., 2017).

In Brazil, new species of the order Rodentia have been recognized, described and even reclassified. Some 71 genera and 235 species of rodents have been found in Brazil (de Oliveira et al., 2014). The family Cricetidae is the most diverse, with 117 species and 36 genera grouped in the subfamily Sigmodontinae, which includes all arenaviruses hosts identified in Brazil (Bonvicino et al., 2008, Oliveira and Bonvicino, 2006, Pardiñas et al., 2016).

Among all the genera of the Oryzomyini Tribe, *Oecomys* stands out as one of the most speciose, with 17 species currently described (Carleton and Musser, 2015, Pardiñas et al., 2016). This genus is distributed in almost all Brazilian territories (Malcher et al., 2017). The purpose of this study was to determine whether arenaviruses infect *Oecomys* sp. in Brazil and which species act as viral reservoirs.

Rodents were captured during independent field trips at different years and periods and in different municipalities from Brazil. Specimen were stored individually at -80°C freezers, RNALater™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or ethanol stored at -20°C as detailed in Table 1. RNA was extracted from kidney and liver tissue samples of 95 *Oecomys* rodents from 17 localities from Brazil, according to the manufacturer's instruction from PureLink® Micro-to-Midi total RNA purification kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The amplification process was performed according to previously described protocols (Bowen et al., 1996, García et al., 2000, Fernandes et al., 2015), and directly sequenced using BigDye Terminator™ version 3.1 Cycle Sequencing®Kit (Applied Biosystems) in an automatic sequencer (Applied Biosystems, ABI PRISM 3130X model, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analyzed using MEGA7 software (Kumar et al., 2016), and a consensus sequence was derived from contiguous assembled with

the same software. Multiple sequence alignment and comparison of amino acid were performed using MAFFT version 7, in the Jalview v.4 software program (Waterhouse et al., 2009). Phylogenetic relationships were estimated using Maximum likelihood phylogenetic inference using PhyML implemented in SeaView v.4 software program (Gouy et al., 2010). The best-fit evolutionary model was determined using MEGA version 7, using the Bayesian Information Criterion (Kumar et al., 2016).

Amplification of the glycoprotein precursor (GPC) gene was observed in six rodents tissue samples (6.3%), belonging to *Oecomys cleberi*, *O. franciscorum* and *Oecomys* sp. specimens. Positive animals were capture in Aporé (4), Corumbá (1) and Uberlândia municipalities, from Goiás, Mato Grosso do Sul and Minas Gerais state, respectively (Table 1). Phylogenetic analyses of these sequence indicated that mammarenaviruses carried by *Oecomys* sp. and *O. cleberi* from Aporé formed a monophyletic independent lineage within New world Clade A mammarenaviruses group, while *Oecomys* sp. from Uberlândia formed a sister lineage with Paraná virus from Paraguay. The virus found in *O. franciscorum* was the most divergent forming an independent sister stem lineage clade with New World Clade A viruses (Figure 1). In pairwise comparisons of a nucleotide sequence, calculated using MEGA 7 (Kumar et al., 2016), the partial GPC amino acid distance among *Oecomys* mammarenavirus strains from Brazil ranged from 0.1 to 3.4%.

Table 1. *Oecomys* rodents molecular screened for mammarenavirus, Brazil 1998 -2016.

STATE	LOCALITY	YEAR	STORAGE	N ⁰ <i>Oecomys</i>	RT-PCR
ACRE	Porto Acre	2015	RNALater™	9	0
	Xapuri	2015		1	0
GOIÁS	Aporé	2005,2007,2008	-80°C / TRIzol	13	4
	Luziania	2005		9	
MATO GROSSO DO SUL	Aquidauana	2003,2004	-80°C / ethanol	19	0
	Cassilândia	2008	TRIzol	1	0
	Corumbá	2005,2016	Ethanol / -80°C	25	1
	Dois Irmãos do Buriti	2006	-80°C	1	0
MATO GROSSO	Rondonópolis	2008	-80°C	1	0
	Sapezal	2008		3	0
MINAS GERAIS	Uberlândia	2012	-80°C	2	1
RIO DE JANEIRO	Sumidouro	1998	Ethanol	1	0
	Paraty	2006		1	0
SANTA CATARINA	Santo Amaro da Imperatriz	2015	-80°C	2	0
TOCANTINS	Araguatins	2010	Ethanol	1	0
	Dianópolis	2009,2010	TRIzol	3	0
	Novo Jardim	2009		3	0
TOTAL				95	6

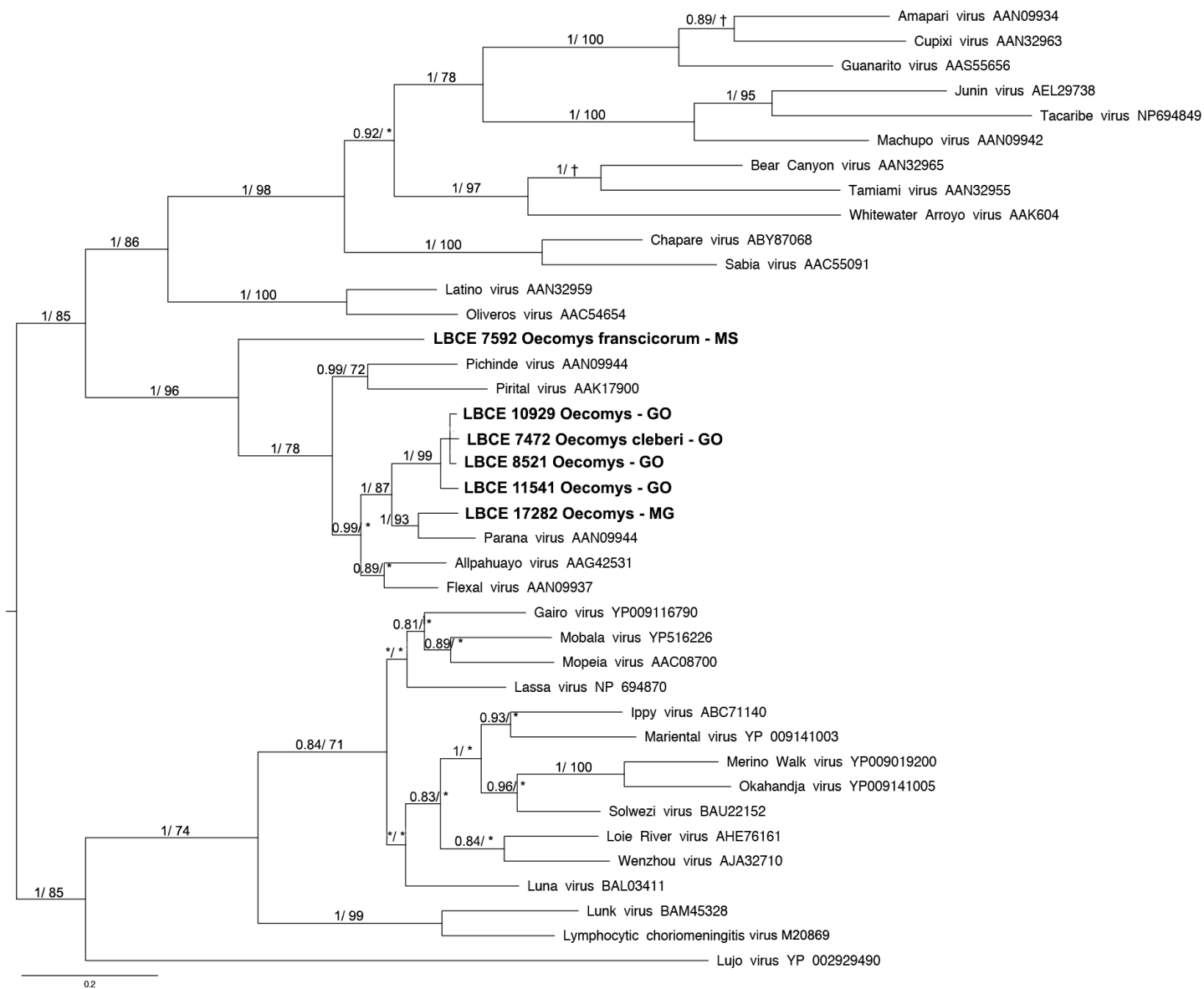


Figure 1. Phylogenetic trees based on mammarenaviruses partial GPC, using ML and Bayesian methods, LG + G + I evolutionary model. Numbers ($\geq 0.7/\geq 70$) above branches indicate node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). Asterisks indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology. Sequences of this study are highlighted in bold. GO = Goiás; MS = Mato Grosso do Sul; Minas Gerais = MG.

Complete sequencing of all positive samples was attempted following previously described protocols (Atkinson et al., 2016, Bukbuk et al., 2016). Thus, Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method was implemented in MrBayes v3.2.6 (Ronquist et al., 2012). The MCMC settings consisted of two simultaneous independent runs with four chains each that were run for 10 million generations and sampled every 100th generation, yielding 100,000 trees. After eliminating 10% of the samples as burn-in, a consensus tree was built.

Full-length sequence and genome organization were obtained for *Oecomys* sp. mamarenavirus from Apore municipality (strains 10929 and 11541). The genome consists of

two segments, large (L) and small (S). The L segment is 7,131 nucleotides (nt) in length, with two open reading frames (ORFs) encoding a zinc finger-like protein of 93 amino acids (aa) and a viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of 2,130 aa with a intergenic noncoding region between the two ORFs. The S segment was 3,389 nt, including two ORFs encoding a glycoprotein precursor of 507 aa and a nucleocapsid (NP) of 558 aa, according to Pairwise Sequence Comparison (PASC) tool, analyzed using the default parameters (Bao et al., 2014, Radoshitzky et al., 2015). *Oecomys* virus strain 10929 and 11541 shares 59.2% to 57.2% (L segment) and 70.7% to 69.5% (S segment) nucleotide sequence identity with its closest relative Paraná and Flexal viruses, representing a novel mammarenavirus, for which we propose to tentatively name Rio Preto virus (ROPV). Rio Preto is a river that crosses the three Brazilian states, Mato Grosso do Sul, Goiás and Minas Gerais, where *Oecomys* spp. rodents harbored arenavirus were captured. Phylogenetic analysis based on the complete nucleotide sequences of ROPV L and S segments revealed that this strain clusters with other known New World Clade A mammarenaviruses, but forms an independent sister lineage with Paraná virus (Figure 2). Results were corroborated by phylogenetic analysis based on the complete sequences of Z, RdRp, NP and GPC proteins (supplementary Figure 1). Although, we were not able to fully sequence all detected virus, in this study, the circulation of ROPV in sympatric *Oecomys* rodents cannot be ruled out, therefore, further investigation of this issue is needed.

ROPV is the third mammarenavirus to be detected on *Oecomys* rodents. Allpahuayo virus, a member of Clade A New World mammarenavirus, was initially isolated from arboreal rice rats, *Oecomys bicolor* and *Oecomys paricola*, collected in northeastern Peru (Moncayo et al., 2001). Recently, the presence of mammarenaviruses closely related to Allpahuayo virus, proposed Patawa virus, has been identified in *O. auyantepui* and *O. rutilus* captured in French Guiana (Lavergne et al., 2015). Interestingly, ROPV was close related to Paraná virus, isolated from *Oryzomys buccinatus* rodents trapped in Paraguay (Webb et al., 1970). Regardless of the controversial taxonomy of the *Oecomys* genus, mainly at the species level because of the existence of cryptic species and the overlap of morphological characters (Patton et al., 2000, Asfora et al., 2011, Weksler, 2003, Weksler et al., 2017), it seems that many species within the genus are able to harbor mammarenaviruses, especially Clade A viruses (Moncayo et al., 2001, Lavergne et al., 2015).

In summary, ROPV represents new mammarenavirus hosted by *Oecomys* rodents. Here we provide increased insight into Clade A viruses distribution and demonstrates that these viruses are ecologically complex, maintained by multiple reservoirs. Our investigations have shown that many *Oecomys* rodent species are able to harbor mammarenavirus in

different South American biomes as Amazon, Pantanal and Cerrado (savanna-like). Additionally, a longitudinal study and new rodent collection expeditions in different areas are needed to elucidate *Oecomys* rodent role as mammarenavirus reservoirs.

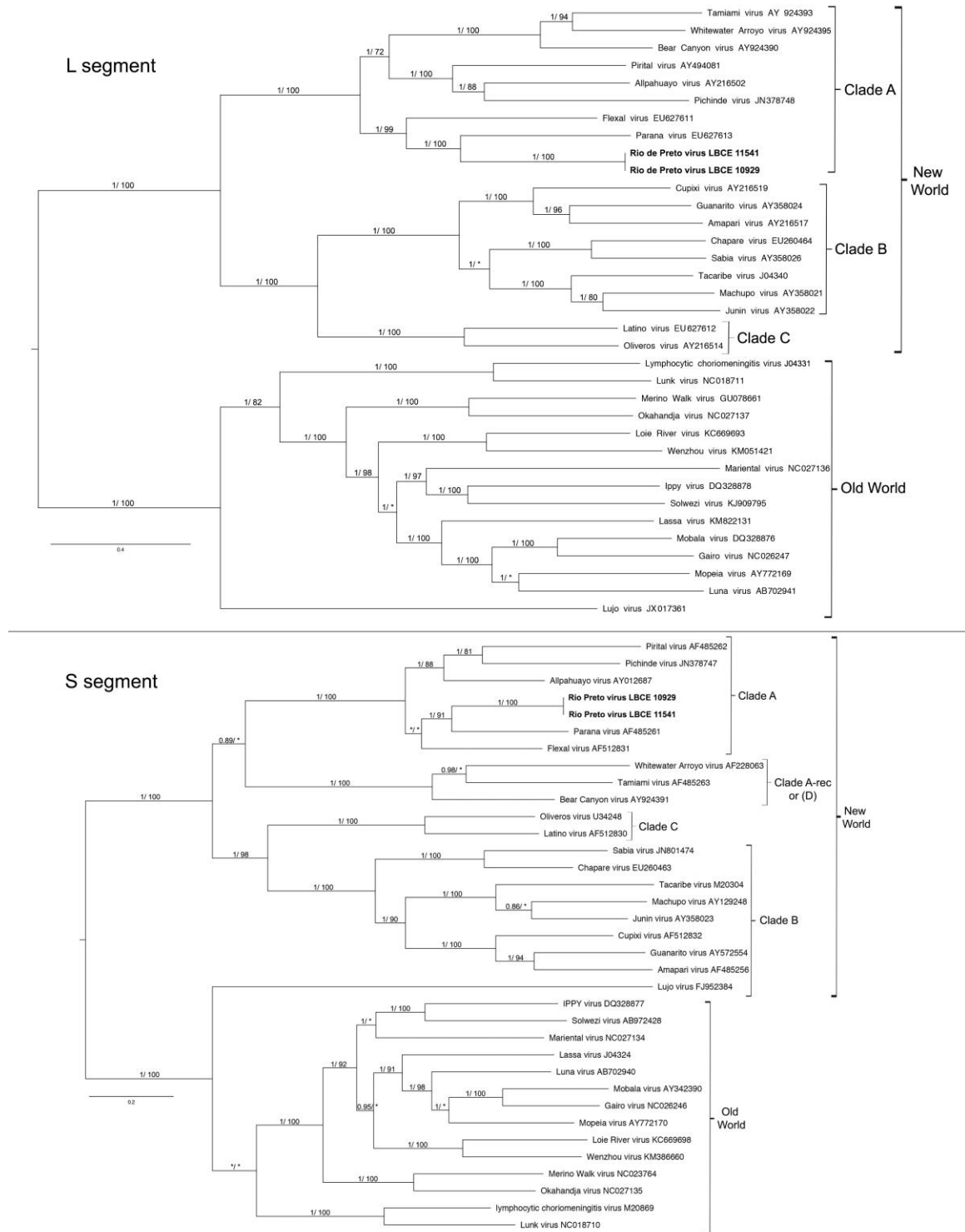
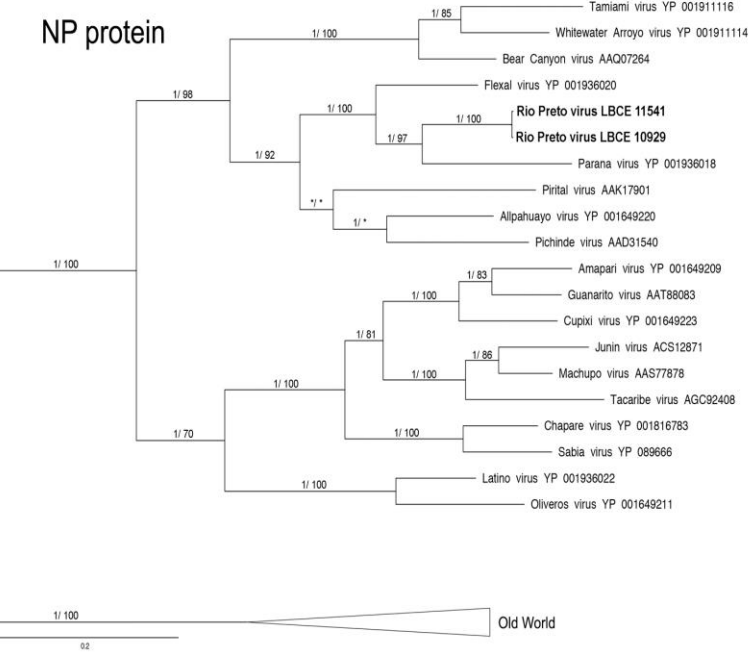
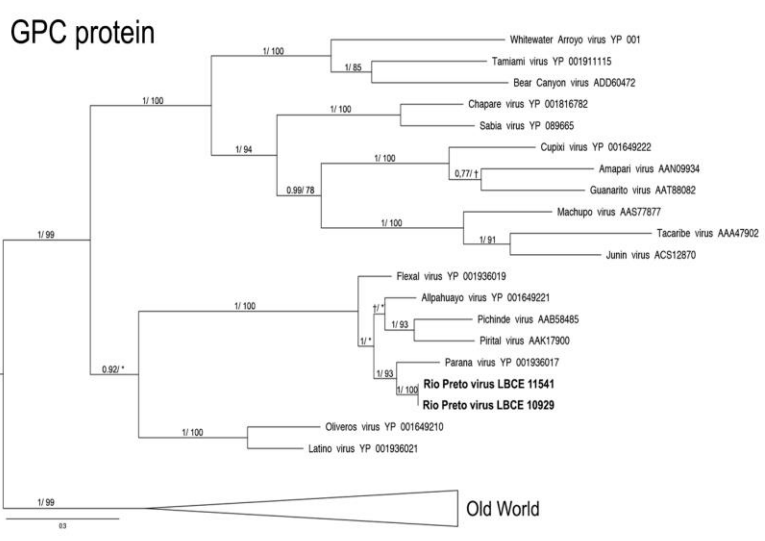
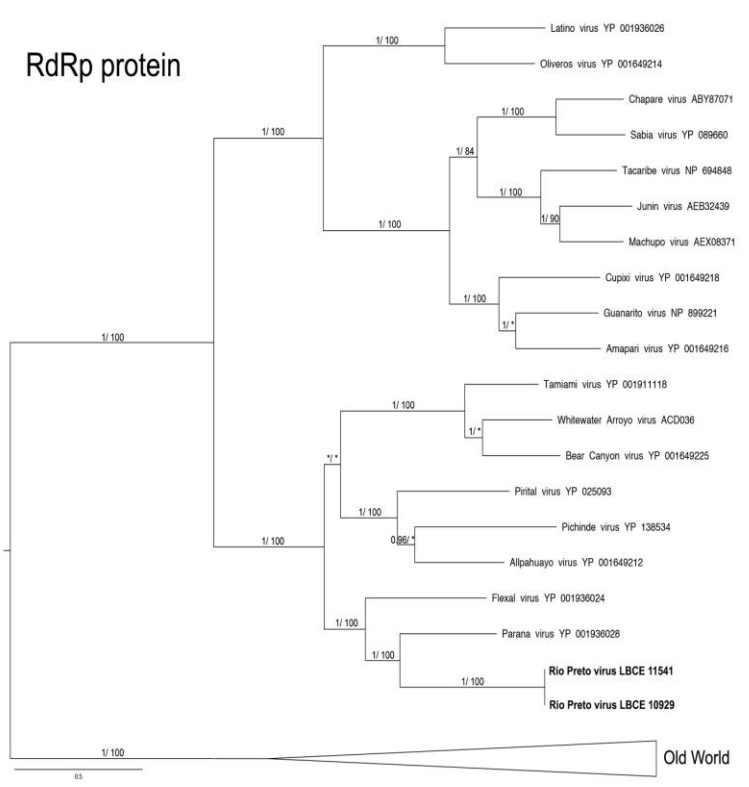
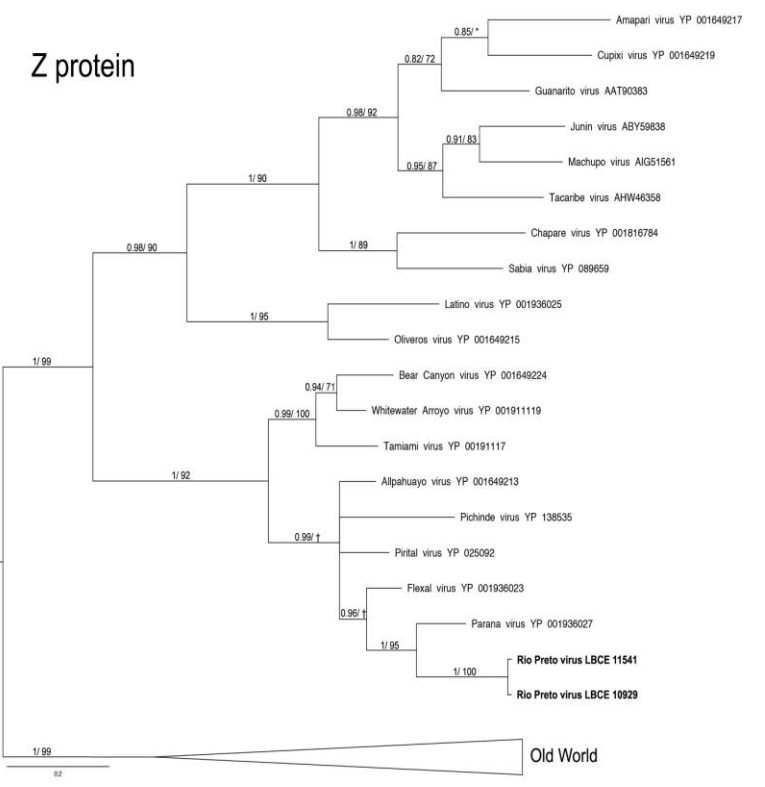


Figure 2. Phylogenetic trees based on the complete mammarenaviruses segments, using ML and Bayesian methods, **L Segment**, using the evolutionary model GTR + G + I; **S segment** complete S segment, using the evolutionary model GTR + G + I. Numbers ($\geq 0.7/\geq 70$) above branches indicate node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). Asterisks indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology Sequences of this study are highlighted in bold.



Supplementary Figure 1. Phylogenetic trees based on the complete NP, GPC, Z and L mammarenaviruses proteins, using ML and Bayesian methods, (**Z protein**) complete Z, using the evolutionary model RetREV, (**RdRp protein**) complete L, using the evolutionary model LG + G + I, (**GPC protein**) complete GPC, using the evolutionary model LG + G + I. (**NP protein**) complete NP, using the evolutionary model LG + G + I. Numbers ($\geq 0.7/\geq 70$) above branches indicate node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). Asterisks indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology Sequences of this study are highlighted in bold.

Acknowledgments

We are grateful to Tatiana Rozental and Bernardo Teixeira (Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, FIOCRUZ) for technical support during this work. The Sequencing Platform Network (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Brazil). This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação Oswaldo Cruz and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant process no. 407664/2012-2 APQ].

References

- Asfora, P. H., Palma, A. R. T., Astúa, D. and Geise, L. (2011) 'Distribution of *Oecomys catherinae* Thomas, 1909 (Rodentia: Cricetidae) in northeastern Brazil with karyotypical and morphometrical notes', *Biota Neotropica*, 11(2), pp. 415-424.
- Atkinson, B., Graham, V., Miles, R. W., Lewandowski, K., Dowall, S. D., Pullan, S. T. and Hewson, R. (2016) 'Complete Genome Sequence of Zika Virus Isolated from Semen', *Genome Announc*, 4(5).
- Bao, Y., Chetvernin, V. and Tatusova, T. (2014) 'Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification', *Arch Virol*, 159(12), pp. 3293-304.
- Bisordi, I., Levis, S., Maeda, A. Y., Suzuki, A., Nagasse-Sugahara, T. K., de Souza, R. P., Pereira, L. E., Garcia, J. B., Cerroni, M. e. P., de A e Silva, F., dos Santos, C. L. and da Fonseca, B. A. (2015) 'Pinhal Virus, a New Arenavirus Isolated from *Calomys tener* in Brazil', *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15(11), pp. 694-700.
- Bonvicino, C. R., Oliveira, J. A. and D'Andrea, P. S. (2008) *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-Pan-American Health Organization. World Health Organization, Rio de Janeiro, Brazil.
- Bowen, M. D., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1996) 'The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses', *Virology*, 219(1), pp. 285-90.
- Bukbuk, D. N., Dowall, S. D., Lewandowski, K., Bosworth, A., Baba, S. S., Varghese, A., Watson, R. J., Bell, A., Atkinson, B. and Hewson, R. (2016) 'Serological and Virological Evidence of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Circulation in the Human Population of Borno State, Northeastern Nigeria', *PLoS Negl Trop Dis*, 10(12), pp. e0005126.

- Cajimat, M. N., Milazzo, M. L., Bradley, R. D. and Fulhorst, C. F. (2012) 'Ocozocoautla de espinosa virus and hemorrhagic fever, Mexico', *Emerg Infect Dis*, 18(3), pp. 401-5.
- Cajimat, M. N., Milazzo, M. L., Mauldin, M. R., Bradley, R. D. and Fulhorst, C. F. (2013) 'Diversity among Tacaribe serocomplex viruses (Family Arenaviridae) associated with the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*)', *Virus Res*, 178(2), pp. 486-94.
- Carleton, M. D. and Musser, G. G. (2015) *Genus Oecomys Thomas, 1906. Mammals of South America* Chicago: The University of Chicago Press, p. 393–417.
- Charrel, R. N. and de Lamballerie, X. (2010) 'Zoonotic aspects of arenavirus infections', *Vet Microbiol*, 140(3-4), pp. 213-20.
- de Oliveira, R. C., Guterres, A., Fernandes, J., D'Andrea, P. S., Bonvicino, C. R. and de Lemos, E. R. (2014) 'Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil', *Viruses*, 6(5), pp. 1929-73.
- Downs, W. G., Anderson, C. R., Spence, L., Aitken, T. H. and Greenhall, A. H. (1963) 'Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies', *Am J Trop Med Hyg*, 12, pp. 640-6.
- Fernandes, J., de Oliveira, R. C., Guterres, A., de Carvalho Serra, F., Bonvicino, C. R., D'Andrea, P. S., Cunha, R. V., Levis, S. and de Lemos, E. R. (2015) 'Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species', *Infect Genet Evol*, 33, pp. 242-5.
- García, J. B., Morzunov, S. P., Levis, S., Rowe, J., Calderón, G., Enría, D., Sabattini, M., Buchmeier, M. J., Bowen, M. D. and St Jeor, S. C. (2000) 'Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns', *Virology*, 272(1), pp. 127-36.
- Gouy, M., Guindon, S. and Gascuel, O. (2010) 'SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building', *Mol Biol Evol*, 27(2), pp. 221-4.
- Gryseels, S., Baird, S. J., Borremans, B., Makundi, R., Leirs, H. and Goüy de Bellocq, J. (2017) 'When Viruses Don't Go Viral: The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses', *PLoS Pathog*, 13(1), pp. e1006073.
- Gryseels, S., Rieger, T., Oestereich, L., Cuypers, B., Borremans, B., Makundi, R., Leirs, H., Günther, S. and Goüy de Bellocq, J. (2015) 'Gairo virus, a novel arenavirus of the widespread *Mastomys natalensis*: Genetically divergent, but ecologically similar to Lassa and Morogoro viruses', *Virology*, 476, pp. 249-56.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Mol Biol Evol*, 33(7), pp. 1870-4.

- Lavergne, A., de Thoisy, B., Donato, D., Guidez, A., Matheus, S., Catzefflis, F. and Lacoste, V. (2015) 'Patawa Virus, a New Arenavirus Hosted by Forest Rodents in French Guiana', *Ecohealth*, 12(2), pp. 339-46.
- Li, K., Lin, X. D., Wang, W., Shi, M., Guo, W. P., Zhang, X. H., Xing, J. G., He, J. R., Wang, K., Li, M. H., Cao, J. H., Jiang, M. L., Holmes, E. C. and Zhang, Y. Z. (2015) 'Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China', *Virology*, 476, pp. 37-42.
- Malcher, S. M., Pieczarka, J. C., Geise, L., Rossi, R. V., Pereira, A. L., O'Brien, P. C. M., Asfora, P. H., Fonsêca da Silva, V., Sampaio, M. I., Ferguson-Smith, M. A. and Nagamachi, C. Y. (2017) 'Oecomys catherinae (Sigmodontinae, Cricetidae): Evidence for chromosomal speciation?', *PLoS One*, 12(7), pp. e0181434.
- Moncayo, A. C., Hice, C. L., Watts, D. M., Travassos de Rosa, A. P., Guzman, H., Russell, K. L., Calampa, C., Gozalo, A., Popov, V. L., Weaver, S. C. and Tesh, R. B. (2001) 'Allpahuayo virus: a newly recognized arenavirus (arenaviridae) from arboreal rice rats (oecomys bicolor and oecomys paricola) in northeastern peru', *Virology*, 284(2), pp. 277-86.
- Olival, K. J., Hosseini, P. R., Zambrana-Torrel, C., Ross, N., Bogich, T. L. and Daszak, P. (2017) 'Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals', *Nature*, 546(7660), pp. 646-650.
- Oliveira, J. and Bonvicino, C. (2006) *Ordem Rodentia. Mamíferos do Brasil* Suprema; Londrina, Paraná, Brazil, p. 347–400.
- Pardiñas, U. F. J., Teta, P., Salazar-Bravo, J., Myers, P. and Galliari, C. A. (2016) 'A new species of arboreal rat, genus Oecomys (Rodentia, Cricetidae) from Chaco', *Journal of Mammalogy*, 97(4), pp. 1177-1196.
- Patton, J. L., Da Silva, M. N. F. and Malcolm, J. R. (2000) 'Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia', *Bulletin of the AMNH*, pp. 244–306.
- Radoshitzky, S. R., Bào, Y., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clawson, A. N., Clegg, C. S., DeRisi, J. L., Emonet, S., Gonzalez, J. P., Kuhn, J. H., Lukashevich, I. S., Peters, C. J., Romanowski, V., Salvato, M. S., Stenglein, M. D. and de la Torre, J. C. (2015) 'Past, present, and future of arenavirus taxonomy', *Arch Virol*, 160(7), pp. 1851-74.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. and Huelsenbeck, J. P. (2012) 'MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space', *Syst Biol*, 61(3), pp. 539-42.

- Salazar-Bravo, J., Dragoo, J. W., Bowen, M. D., Peters, C. J., Ksiazek, T. G. and Yates, T. L. (2002) 'Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species', *Infect Genet Evol*, 1(3), pp. 191-9.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. and Barton, G. J. (2009) 'Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench', *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1189-91.
- Webb, P. A., Johnson, K. M., Hibbs, J. B. and Kuns, M. L. (1970) 'Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay', *Arch Gesamte Virusforsch*, 32(4), pp. 379-88.
- Weksler, M. (2003) 'Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon', *Mol Phylogenet Evol*, 29(2), pp. 331-49.
- Weksler, M., Lemos, E. M. S., D'Andrea, P. S. and Bonvicino, C. R. (2017) 'The Taxonomic Status of *Oligoryzomys mattogrossae* (Allen 1916) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae), Reservoir of Anajatuba Hantavirus', *American Museum Novitates*, (3880), pp. 1-32.
- Witkowski, P. T., Kallies, R., Hoveka, J., Auste, B., Ithete, N. L., Šoltys, K., Szemes, T., Drosten, C., Preiser, W., Klempa, B., Mfunne, J. K. and Kruger, D. H. (2015) 'Novel Arenavirus Isolates from Namaqua Rock Mice, Namibia, Southern Africa', *Emerg Infect Dis*, 21(7), pp. 1213-6.
- Zapata, J. C. and Salvato, M. S. (2013) 'Arenavirus variations due to host-specific adaptation', *Viruses*, 5(1), pp. 241-78.

4.1.5. Artigo 5 - Breaking the silence: enlightening the natural history of Arenavirus Hemorrhagic Fever in South America

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.1.** Identificar áreas de circulação enzoótica de mammarenavírus, com a pesquisa em roedores silvestres e sinantrópicos coletados em diferentes regiões do Brasil, cujas amostras já se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz.

Objetivo específico:

- ✓ Identificar as espécies de roedores infectadas por mammarenavírus de diferentes estados brasileiros;
- ✓ Caracterizar os mammarenavírus responsáveis pela infecção nos roedores;

Situação do manuscrito: Artigo a ser submetido à publicação no jornal *Plos Pathogens*.

Fator de Impacto da Revista: 8,2

Referência: Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Chamberlain J, Afrough B, Levandowski K, Graham V, Coelho TA, D'Ándrea PS, Bonvicino CR, Hewson R, de Lemos ERS. Breaking the silence: enlightening the natural history of Arenavirus Hemorrhagic Fever in South America. *Plos Pathog*, 2018.

**Breaking the silence: enlightening the natural history of Arenavirus Hemorrhagic Fever
in South America**

Jorlan Fernandes^{1,co*}, Alexandro Guterres^{2,co}, Renata Carvalho de Oliveira^{2,co}, John Chamberlain², Babak Afrough², Kuiama Levandowski², Victoria Graham², Thayssa Alves Coelho¹, Paulo Sérgio D'Ándrea³, Cibele Rodrigues Bonvicino^{3,4}, Roger Hewson², Elba Regina Sampaio de Lemos^{1*}

- 1- Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
- 2- National Infection Service, Public Health England, Salisbury, Wiltshire, UK.
- 3- Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
- 4- Instituto Nacional do Câncer

Co- These authors contributed equally to this work.

Abstract

Arenavirus hemorrhagic fevers (AHF) are a group of viral diseases associated to wild rodents with a mortality rate as high as 35%. Cases of AHF are often related to people living in the rural areas of the South America, where two recognized arenavirus, Sabiá and Chapare viruses, have no known wild reservoir. Reservoir identification is necessary for predicting the geographic extent of infection risk. We sampled rodents from Midwest Brazil, and genetically characterized in detail a novel mammarenavirus from *Oligoryzomys mattogrossae* rodents. The new virus, proposed to be called Aporé virus is highly related to Sabiá and Chapare viruses. This is the first description of a new clade B New world mammarenavirus described in the last 10 years. The viral/host association of Aporé and *O. mattogrossae* may be the key to understand aspects related to highly pathogenic mammarenavirus emergency in South America.

Introduction

Arenaviruses are known causative agents of highly lethal viral hemorrhagic fevers in Africa and South America. Humans usually became infected, accidentally, through inhalation of aerosolized rodent excreta (urine and feces) containing virus particles (1, 2). The clinical manifestations of arenavirus hemorrhagic fevers (AHF) include hematological, renal, immunological, cardiovascular and neurological alterations, with a mortality rate as high as 35% (2, 3). The patients who survived the infection may suffer of alopecia, memory loss, irritability and deafness for a few months (3-5).

At least 10 arenaviruses species are associated to human diseases, most of them from South America (1, 6). AHF have been described in the American continent since 1953 (7). Until now, five pathogenic mammarenavirus are described in Latin America: Junín virus from Argentina, Guanarito virus from Venezuela, Machupo and Chapare viruses from Bolivia and Sabiá virus from Brazil (3, 7-10). Cases of AHF are often related to rural areas with a recent history of agricultural expansion, involving drastic changes in suitable habitat for the virus's rodent hosts (2, 3, 5, 8).

Besides that, there are curious cases of sudden outbreak of AHF, where there are just the descriptions of human infection and data around the natural reservoir are still missing. Sabiá virus (SABV) was first detected in January of 1990. The index case was a 25-year-old female agricultural engineer who was admitted after 12 days of fever, patient's history was unremarkable (10). During posterior characterization of the virus two laboratory acquired infection, probably by aerosol inhalation, were reported (11). In 2004, Chapare virus (CHPV), an arenavirus genetically close to SABV was discovered during an investigation of small focus of hemorrhagic fever cases occurred near Cochabamba, Bolivia. Specimens were available from only one fatal case, which had a clinical course that included fever, headache, arthralgia, myalgia, and vomiting with subsequent deterioration and multiple hemorrhagic signs (9). Field investigations did not reveal the rodent reservoir for none of these viruses. We report here a study, which the objective was to extend our knowledge of potential highly pathogenic arenaviruses rodent's reservoir.

Results/Discussion

Arenavirus infection in wild rodents

Seventy-one rodents representing six different genera trapped in Cassilândia municipality, Mato Grosso do Sul state, Middle West, Brazil (Fig.1) were analyzed. *Necromys lasiurus* was the most frequently captured rodent (41 specimens), followed by *Calomys expulsus* (18 specimens) (Table 1). Overall, eight animals (11.1%) were infected by

arenavirus, six *N. lasiurus* (6/41 - 14.6%) and two *Oligoryzomys mattogrossae* (2/5 - 40.0%). Sanger sequencing of the amplicons obtained indicated the presence of two viral species, Oliveros mammarenavirus (OLVV) from *N. lasiurus* and a novel virus related to Clade B New World mammarenaviruses.

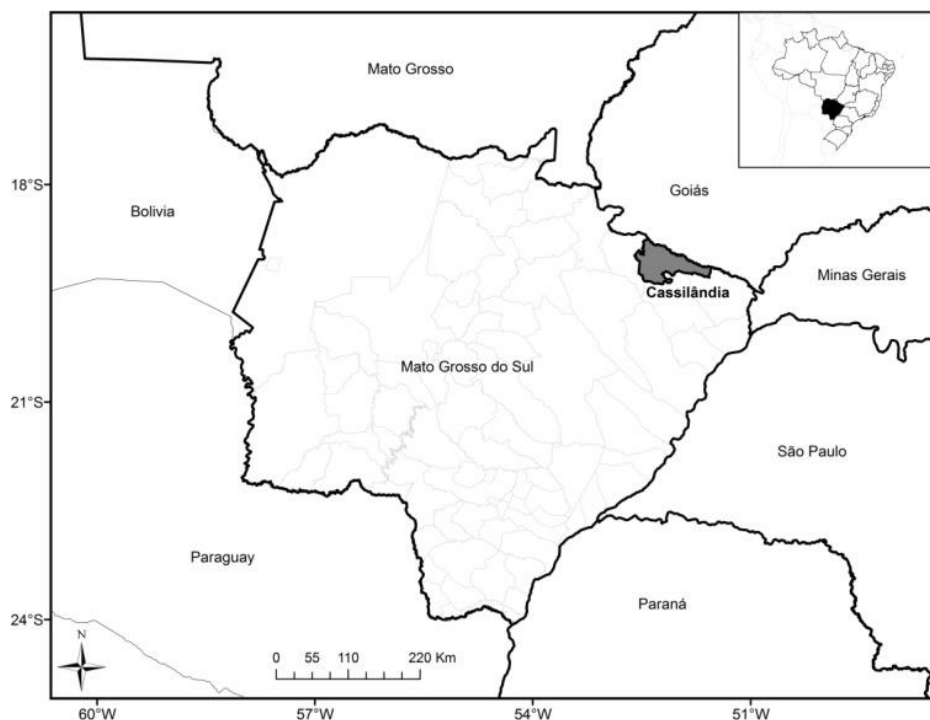


Fig. 1. Map of the Mato Grosso do Sul State, Midwestern Brazil, showing the municipality of Cassilândia.

TABLE 1. Small mammal species collected on Cassilândia, Mato Grosso do Sul, Brazil, and the results of arenavirus infection by RT-PCR

Species	No. of captured rodents	RT-PCR No. (prevalence%)
<i>Calomys expulsus</i>	18	0
<i>Cerradomys marinhos</i>	02	0
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	03	0
<i>Necomys lasiurus</i>	41	06 (14.6%)*
<i>Nectomys rattus</i>	03	0
<i>Oligoryzomys mattogrossae</i>	05	02 (40.0%)**
TOTAL	72	08 (11.1%)

*Prevalence of Oliveros virus

**Prevalence of Aporé virus

Partial amino acid sequences of the recovered GPC recovered from *N. lasiurus* showed high similarity 88.8% and 83.6%, with OLVV (U34248) from central Argentina, harbored by the rodent *N. benefactus*. While, partial GPC sequences from *O. mattogrossae*

rodents were more similar (74%) to SABV (YP089665). Phylogenetic tree, based on partial glycoprotein precursor complex (GPC) reinforced the genetic relation between *N. lasiurus* viruses and OLVV, and *O. mottogrossae* viruses sequences to Clade B mammarenaviruses (data not shown).

Previous studies have already identified OLVV in *N. lasiurus* rodents from Brazil (12, 13). *N. lasiurus* is considered a generalist species in relation to habitat use, with a general behavior being highly adaptable to man-made environments and to less complex ecosystems, especially grassy areas (*Brachiaria* spp.) (14, 15). *N. lasiurus* presents itself as the most abundant rodent specie in Brazilian Cerrado (savanna-like biome) ranging from 39.4 to 80% of captured rodents in these areas that can be directly attributed to the intense process of degradation this biome has undergone in recent decades (16). The results presented here and *N. lasiurus* features reinforce the important role in in enzootic cycles of OLVV.

Oligoryzomys rodents are known reservoirs for hantavirus across South America (16, 17). Nevertheless, this is the first description of these rodents infected by mammarenavirus. *O. mottogrossae* harbors the Anajatuba and Jucituba hantaviruses and features a broad geographical distribution but mainly occurs in the Cerrado, the Caatinga, at the edge of the Amazon biome, and in altered or conserved vegetation, where it is common but not abundant. In fact, one of the two positive rodents for mammarenavirus was also simultaneously infected by Jucituba hantavirus (16-18). It is not difficult to hypothesize that co-infections between these rodent-borne viruses may occur, once in many occasions they share the same geographic localization and even the same animal host (1, 16, 19). However, despite an extensive genetic characterization of both viruses in nature, a co-infection of hantaviruses and arenaviruses has never been demonstrated until this work. The implications of co-circulation of these viruses are still unknown, but it may represent a key event for increasing viral diversity or emergence of new species, as demonstrated before (20-24).

Studies have pointed out that arenaviruses and bunyaviruses shared an ancestor (23). Sequence analysis of recently emerging viruses suggested that genes from arenaviruses share some homology with other negative-strand virus such as bunyaviruses (20, 21). Probably, co-infection could enable the bunyavirus polymerase to jump templates from a bunyaviral replicative form to an arenaviral mRNA (24). Thus, this theory is also supported by the fact that between 4%–30% of bunyaviruses package two genome equivalents per virion (24-26). Recently, new arenaviruses have been discovered in snakes. The snake arenavirus L and NP genes are homologous to those of arenaviruses, but the GP sequences are homologous to filovirus envelope glycoproteins (27). Based on the fact that some snakes consume rodents and bats, potential reservoirs for arenaviruses and filoviruses, co-infected snake could

conceivably harbor replication complexes in which the arenavirus polymerase jumps from an arenaviral replicative form to a filovirus GP mRNA, generating the new quimeric viruses (24, 27).

Full genome characterization and phylogenetic relations of a newly identified arenavirus

Due to the placement of *O. mattogrossae* viruses with Clade B New World mammarenaviruses, whole genome sequencing was attempted on the two rodent samples. Coding-complete genomes were acquired by deep sequencing (Illumina MiSeq) of random amplified RNAs from liver samples. A classical arenavirus bi-segmented genome structure was found in the data from the sequenced rodents. Each segment encoded two open reading frames (ORFs) in an ambisense organization with an intergenic region containing a predicted stem-loop region between the ORFs [6]. Full S (3.4 kb) and L (7.2 kb) segments encoding four main proteins: nucleoprotein (562 aa), glycoprotein precursor (489 aa), matrix protein analog Z (99 aa) and polymerase (2117 aa) were obtained for the two rodents samples. Predictions for secondary structure of intergenic regions for S and L segments are presented in (Fig. 2). GenBank accession number for S and L segment for sample 12071 [GenBank MF317490] and [GenBank MF317491], respectively.

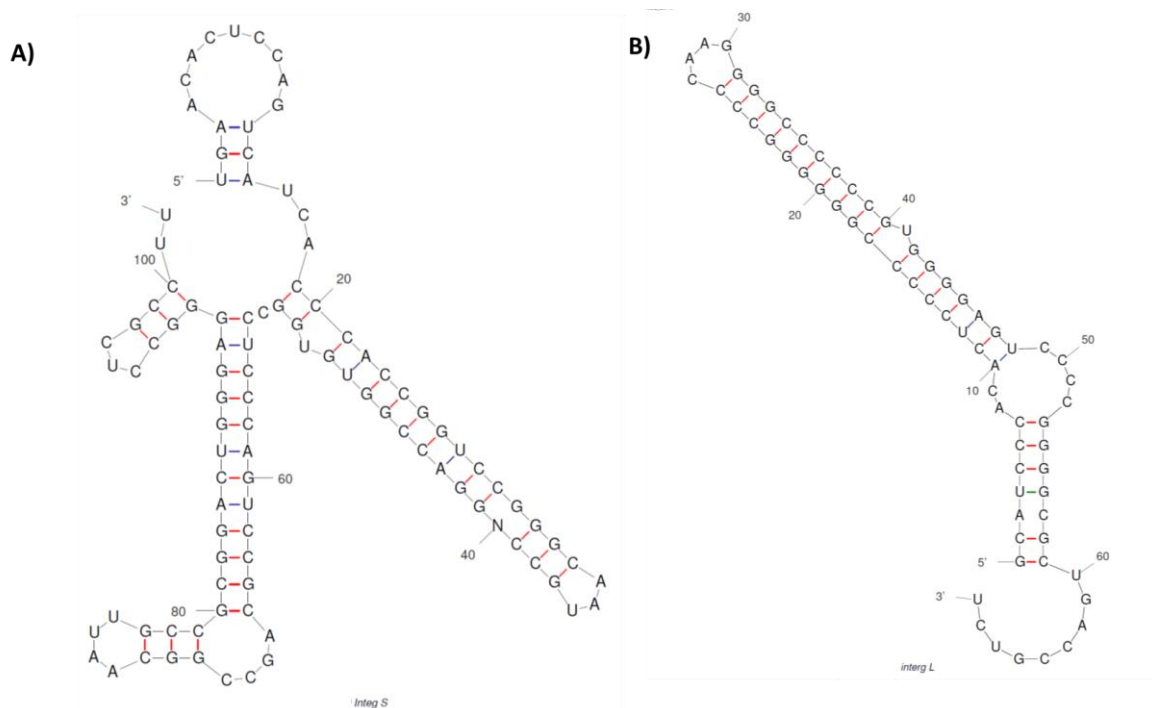


Fig. 2. Aporé mammarenavirus potential secondary structure of intergenic regions (a) S segment (b) L segment predicted by Mfold.

Deduced amino acid and nucleotide sequences of the new virus were compared to those of other Clade B New World mammarenaviruses species (Table 2). A nucleotide sequence divergence of 24.8% and 29.6% for S and L segment was found between the newly recognized virus and CHPV and SABV, respectively. A very similar feature was also found for polymerase (24.8%), zinc (31.8%) and nucleoprotein (17.6%), of divergence with the closest related arenavirus, CHPV. Interestingly, the glycoprotein precursor were slightly more related to SABV, with 77.2% of identity (Table 2).

Table 2. Nucleotide and amino acid identities of Aporé virus (APRV) compared with New World representatives of the genus *Mammarenavirus*.

Virus species	<i>p</i> – distance					
	L segment(nt)	Z(aa)		S segment(nt)	NP(aa)	GPC(aa)
		Z(aa)	L(aa)			
Amaparí	39,4%	43,9%	41,1%	36,5%	31,9%	49,3%
Chapare	29,6%	31,8%	24,8%	24,8%	17,6%	24,3%
Cupixi	39,6%	47,2%	40,9%	36,9%	31,9%	45,7%
Guanarito	39,0%	42,8%	40,4%	36,6%	32,5%	48,3%
Junín	39,0%	51,6%	39,7%	36,0%	33,5%	48,0%
Machupo	38,1%	48,3%	38,3%	36,3%	32,6%	45,3%
Sabiá	30,3%	36,2%	27,7%	26,4%	21,9%	22,8%
Tacaribe	38,6%	49,4%	39,2%	37,9%	35,8%	49,7%

Phylogenetic trees, based on complete nucleotide sequences and the main proteins encode by the S and L segment of mammarenavirus were generated. Newly recognized *O. mattogrossae* virus formed a monophyletic clade, well supported, with Clade B New World mamarenaviruses, CHPV and SABV (Fig. 3 and Fig. 4). A strong association between CHPV and the new virus described here was found for most analysis. The only change in the structure of the trees was a switch for the GPC gene which formed a sister group to SABV (Fig. 4). Bootscan recombination analysis of complete S segment sequences by Simplot revealed the existence of four recombination peaks exceeding the cut-off of 70% bootstrap: peaks corresponding to S segment regions from positions around 1-450 and 1130-1770 that clustered with SABV sequence, whilst the other two clearly resolved peaks, between positions 490-1050 and 2170-2810, clustered with CHPV sequences. Reconstructed phylogenetic

subtrees were clearly in correlation with corresponding peaks proposed by bootscan analysis, with changing clustering of prospective recombinant sequences (Suppl Fig 1).

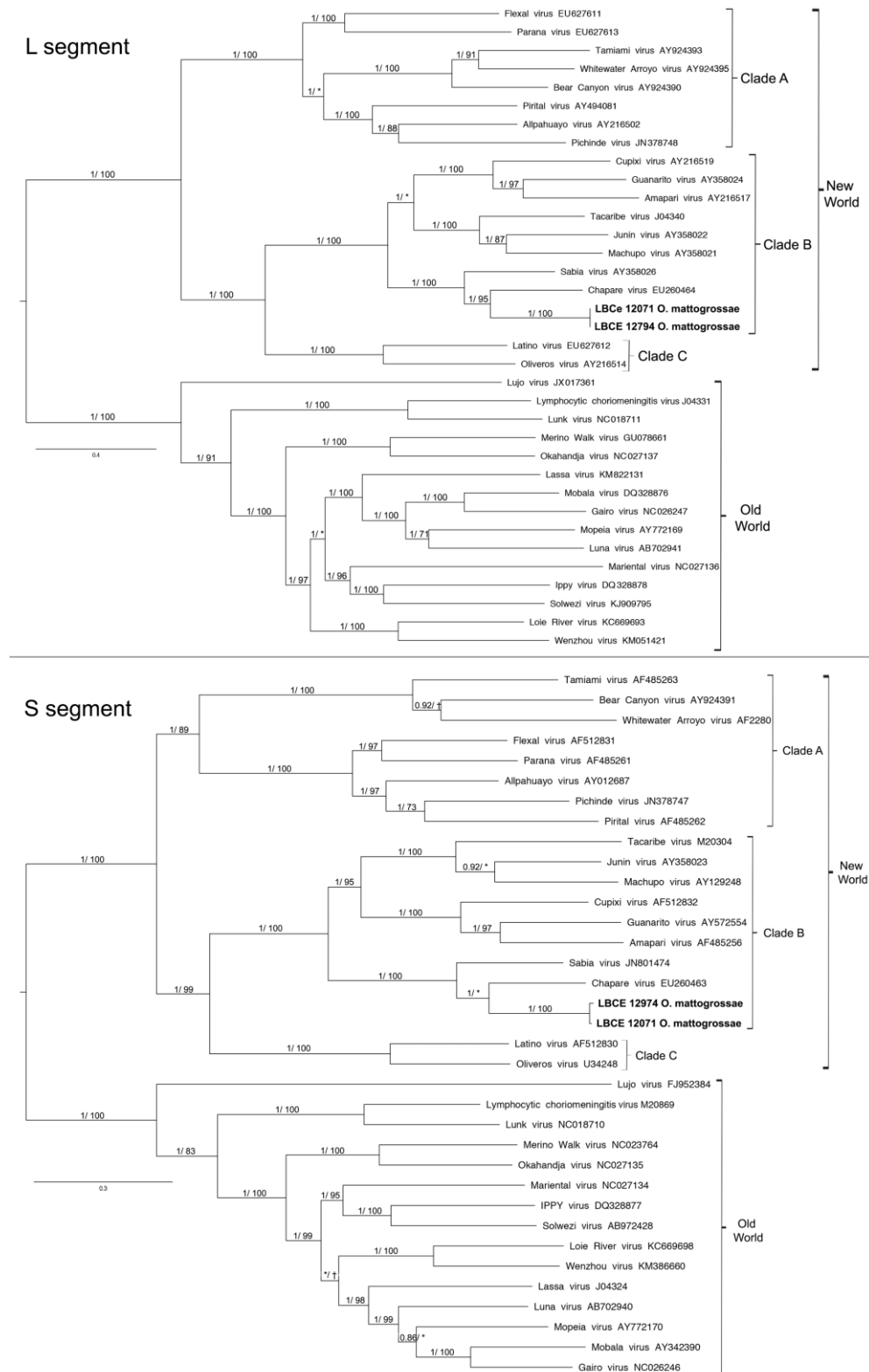


Fig 3. Phylogenetic trees based on the complete mammarenaviruses segments, using ML and Bayesian methods, **L Segment**, using the evolutionary model GTR + G + I; **S segment** complete S segment, using the evolutionary model GTR + G + I. Numbers ($\geq 0.7/\geq 70$) above

branches indicate node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). Asterisks indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology Sequences of this study are highlighted in bold.

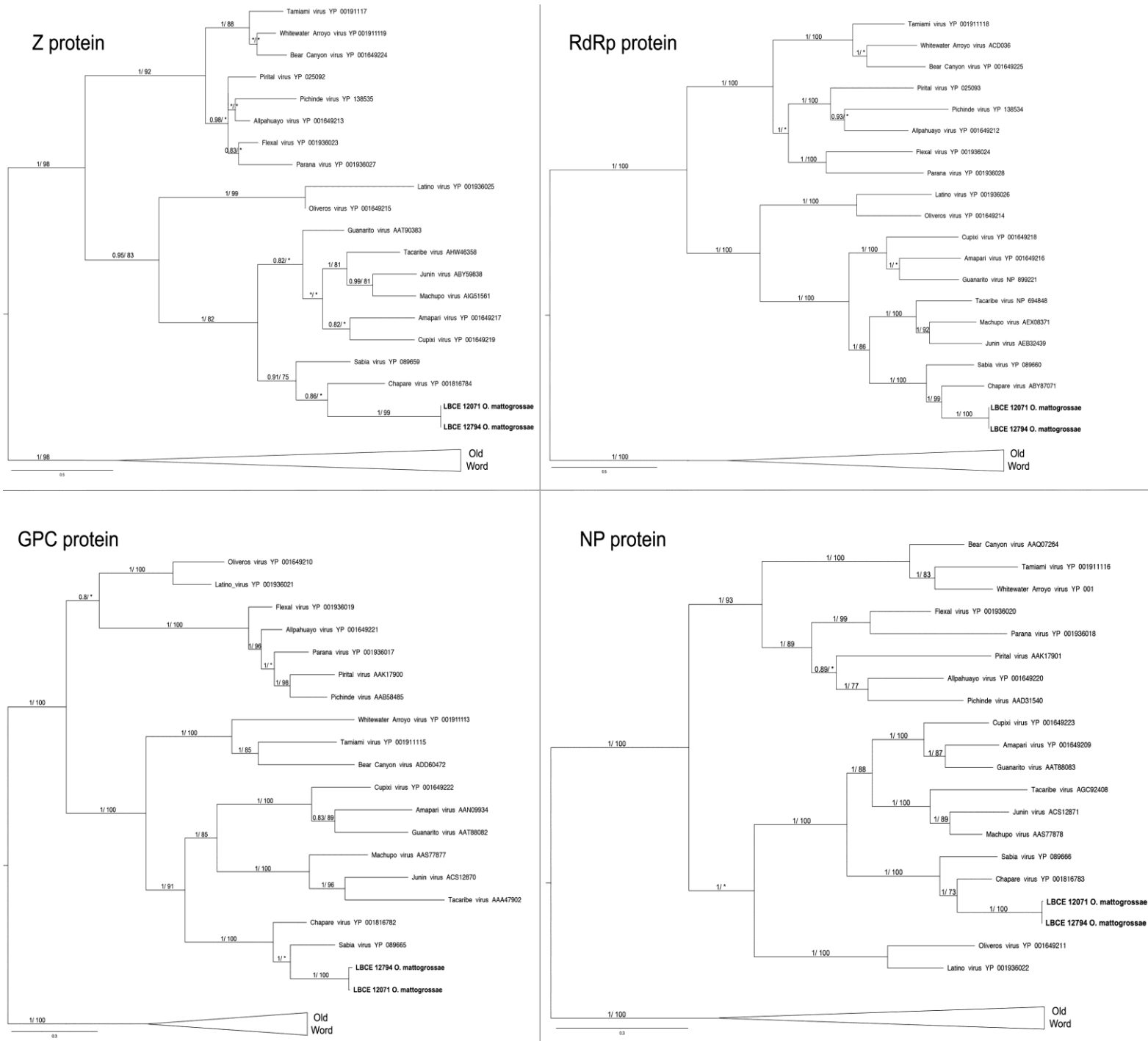


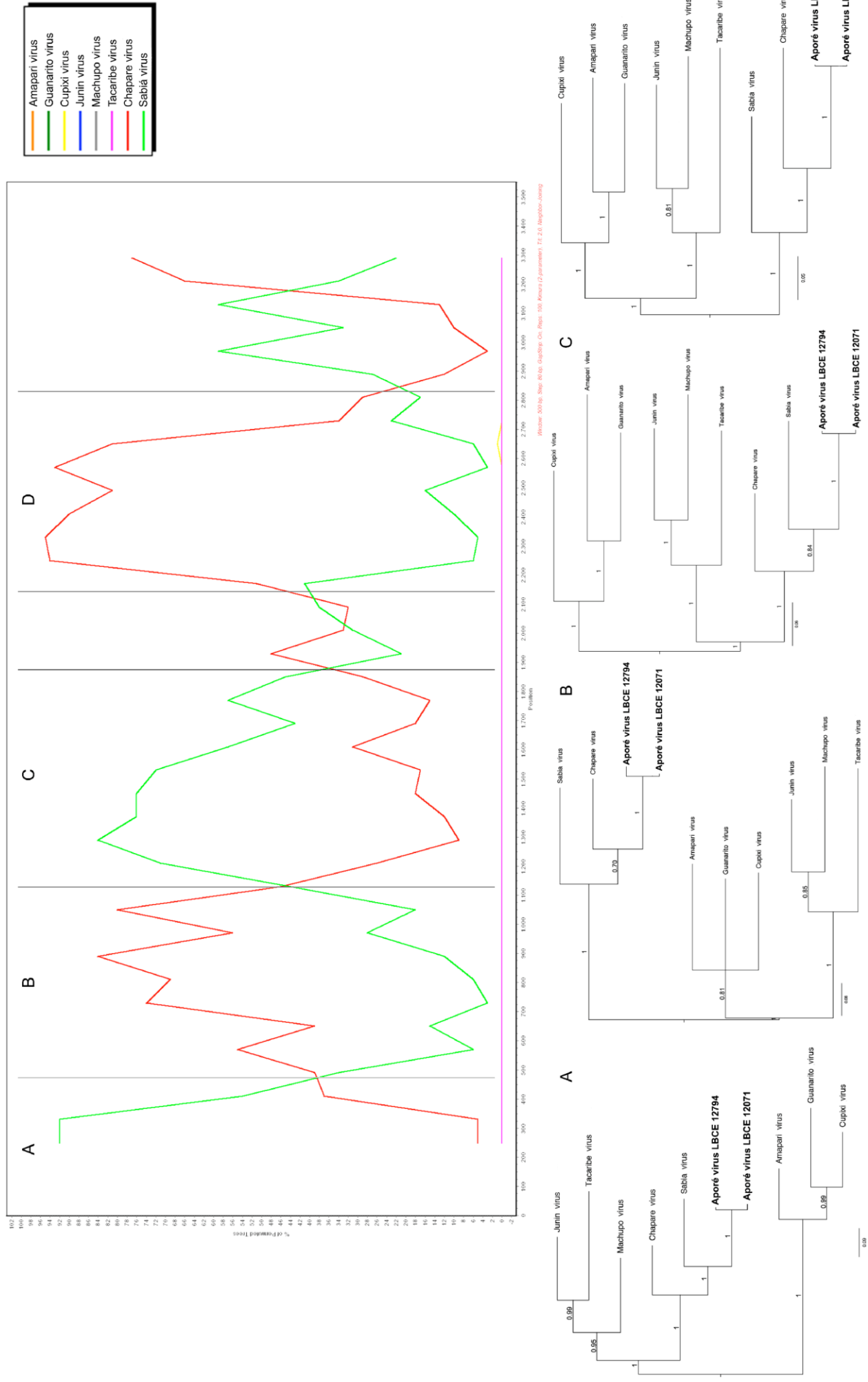
Fig. 4. Phylogenetic trees based on the complete NP, GPC, Z and L mammarenaviruses proteins, using ML and Bayesian methods, (**Z protein**) complete Z, using the evolutionary model RetREV, (**RdRp protein**) complete L, using the evolutionary model LG + G + I, (**GPC protein**) complete GPC, using the evolutionary model LG + G + I. (**NP protein**) complete NP, using the evolutionary model LG + G + I. Numbers ($\geq 0.7/\geq 70$) above

branches indicate node probabilities or bootstrap values (MrBayes/ML). Asterisks indicate values below 0.7/70. †Exhibited difference between ML and MrBayes tree-building method topology Sequences of this study are highlighted in bold.

Recombination is one of the molecular mechanisms responsible for genetic diversity has been described in different families within RNA viruses (28, 29). However, it was documented to occur with very low frequency in negative strand RNA viruses (29). Nonetheless, recombination has been described for Clade D New World mammarenaviruses, where discrepancies between NP and GPC phylogenetic trees are observed for North American viruses (1, 30-33). In fact, the same topology was found for *O. mattogrossae* viruses, with a switch of GPC, presenting a sister relation to SABV. Although homologous recombination, as the one found by our analysis, are described for rodent-borne viruses, it have been suggested that arenavirus GPC phylogenetic information could be influenced by specific selection pressures (34, 35). Further studies need to be conducted to evaluate the significance of homologous recombination events within arenavirus and their biological impact.

The relationship of the new virus from *O. mattogrossae* to CHPV and SABV is intriguing, both CHPV and SABV cause HF similar to that seen with Junín, Machupo and Guanarito viruses, but the animal reservoir was not detected (3, 9, 10). Yellow fever was the initial suspicion in the SABV case as well for the CHPV infection as both had associated extensive liver necrosis, a not commonly observed feature with HF associated with the other New World arenaviruses (9, 10). It is tempting to comment that this could suggest the possibility of this new virus to cause human infections, represent a new potential treat. Brazil has a high number of endemic infectious diseases that can be misleading during early stages of arenavirus HF, including malaria, yellow and dengue.

An interesting point is that *O. mattogrossae* has been recently reported in the state of São Paulo, and possibly occurs in Bolivia, where SABV and CHAPV emerged (36, 37). Although, mammarenaviruses are considered rodent-host specific, some arenaviruses have been detected in multiple, yet closely related, rodent species (38-43), suggesting that the level of host specificity may vary between arenaviruses (43). The geographic overlap of *O. mattogrossae* and the close relation between SABV, CHPV and new *O. mattogrossae* virus could uncover important features of host-virus relation. Note that *O. mattogrossae* is also the host for multiples hantavirus in Brazil (18, 19). Thus, although well distrusted geographically, *O. mattogrossae* is not found in abundance, a fact that could account for the low number of cases SABV and CHAPV due to reduced chances of human and rodent interactions, making difficult to notice its emergence in human population.



Suppl Fig 1. Bootscan analysis of 3400 nt long S segment alignment of APRV, as analyzed in Simplot (Window: 500 bp, Step: 80 bp, 90% consensus). The peak values exceeding 70% were considered to be significant. Bayesian reconstructed phylogenetic subtrees according to bootscan analysis: (A) S segment positions 1-450 nt; (B) 490-1050 nt; (C) 1130-1770 nt and (D) 2170-2810 nt, as indicated on the bar, showing alternate clustering of APRV sequences according to positions analyzed.

Taxonomic status of *Oligoryzomys mattogrossae* mammarenavirus

A recent update from the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) *Arenaviridae* study group has also recommended the use of Pairwise Sequence Comparison (PASC) tool for the assessment of novel arenaviruses. Cut-off values chosen for classifying arenaviruses belonging to the same species using this tool are >80% and >76% nucleotide sequence identity in the S and L segments respectively (1). (PASC) was performed on both segments. Our samples, once again, were found to be more closely related to CHPV and SABV, demonstrating 73.37–72.39% identity for the S segment and 67.4–67.36% identity for the L segment. Moreover, as this virus also meets nucleoprotein amino acid sequence identities and PASC requirements, we propose to name it Aporé virus (APRV), because it was first identified from rodents captured near a river that has the same name.

Additionally, to better characterize APRV tissues from one positive *O. mattogrossae* were homogenized and inoculated onto BHK-21 and Vero E6 cells monolayers. After five days of viral cultivation, partial S segment sequences were recovered from the harvested culture supernatant inoculated with kidney homogenate of a male *O. mattogrossae* (strain LBCE_15961) from Cumari, Goiás state, indicating that the virus was successfully isolated. No measurable cytopathic effect was seen in any cell line.

To fulfill other species demarcation criteria, specially the association with a main host species or group of sympatric hosts and presence in a defined geographical area (1) we included in this study 47 samples of *O. mattogrossae* from nine different localities from Brazil (Table 3). Nine (9/47-19.1%) rodents from five localities were also positive, demonstrating the association between the new virus and *O. mattogrossae* rodents from Midwest Brazil. Note that one of the samples from Corumbá was grouped with Latino virus a Clade C mammarenavirus detected in *Calomys* spp., rodents from Bolivia and Brazil (12, 44). This may evidence that *O. mattogrossae* could act as host for a wide range of mammarenaviruses, as we discussed previously in this paper. More studies should be conducted to evaluate the *O. mattogrossae* potential to harbor different arenavirus species.

Conclusions

In summary, we isolated a novel mammarenavirus, which we propose be designated Aporé virus, from *O. mattogrossae* rodents in Brazil. Although its pathogenicity still needs to be evaluated, genetic comparison showed that Aporé virus is closely related to two highly pathogenic arenaviruses from South America, whose reservoirs remains unknown. More studies are needed to elucidate the epizootiologic aspects of this novel mammarenavirus,

taking in count the capacity of *O. mattogrossae* to host not only APRV but also other related viruses within and outside the *Arenaviridae* family. Lastly, APRV could shed a light in to the natural history of SABV and CHPV, unveiling host-virus dynamics.

STATE	LOCALITY	YEAR OF COLLECTION	STORAGE	NUMBER OF <i>O. mattogrossae</i>	RT-PCR (%prevalence)
Mato Grosso do Sul	Aquidauana	2003	Ethanol	1	0
	Cassilândia*	2008	TRIZol	5	2 (40.0%)
	Corumbá	2003	Ethanol	5	1 (20.0%)
Goiás	Aporé	2003/2008/2009	TRIZol	20	6 (30.0%)
	Campo Alegre de Goiás	2005	-80°C	1	1 (100%)
	Cumari	2013	-80°C	1	1 (100%)
	Mambaí	2007	TRIZol	3	0
Tocantins	Dianópolis	2009	TRIZol	10	0
Minas Gerais	Uberlândia	2012	-80°C	6	0
TOTAL				52	11 (21.1%)

Table 3. *Oligoryzomys mattogrossae* rodents from Brazil screened for mammarenavirus.

Materials and Methods

Sample collection and mammarenavirus detection

Fieldwork was during an eco-epidemiological study conducted in Cassilândia, Mato Grosso State, Midwestern Brazil, in 2008 (Figure 1). Rodent sampling was conducted during five consecutive nights for each of the capture sessions. Transects were setting using Tomahawk (Tomahawk Live Trap, Hazelhurst, WI) and Sherman livetraps (HB Sherman Traps, Tallahassee, FL). Animals were anesthetized and euthanized by intramuscular injection of sodium pentobarbital, all efforts were made to minimize suffering. Collected tissues were store in TRIZol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic RNA was extracted from lung tissue samples of the two rodents according to the manufacturer’s instructions from the PureLink® Micro-to-Midi total RNA purification kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA). RT-PCR was performed as described previously, using specific oligonucleotides targeting mammarenavirus S segment (45, 46). For partial gene sequencing, DNA was purified using Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, Corp., Madison, WI, USA) according to the manufacturer’s recommendations and strands were directly sequenced. BigDye Terminator™ version 3.1 Cycle Sequencing®Kit (Applied Biosystems) in an automatic sequencer (Applied Biosystems, ABI PRISM 3130X model, Foster City, CA, USA). Partial nucleotide sequences were analyzed using MEGA7 software, and a consensus sequence was derived from contiguous assembled with the same software.

Rodent's specimens were identified by both karyotyping and cranial morphology/morphometry and confirmed by molecular analysis when needed (47, 48). Voucher specimens were deposited at National Museum of the Federal University of Rio de Janeiro and in the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

Permits for field collection were granted by IBAMA (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources, Rio de Janeiro, Brazil) permanent license under process number 13373-1. All proceedings were in accordance to recommended safety procedures (49).

Complete genome sequencing

The isolated RNA from positive samples was treated with DNase I (Life Technologies) following manufacturer's instructions and ribosomal RNA were depleted using NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England BioLabs inc). Single-primer isothermal linear amplification (SPIA) cDNA was prepared from total RNA using the Ovation RNA-seq version 2 system (NuGen). One and a half nanograms of SPIA cDNA were prepared for sequencing, according to the Illumina Nextera XT V2 protocol, and the 2x 150bp paired-end library was run on a MiSeq (Illumina).

Reads were trimmed to remove adaptors and low quality bases, to achieve an average phred score of Q30 across the read, using trimmomatic (50). Trimmed reads were taxonomically assigned using Kraken (ver.0.10.4-beta) (51). Following Kraken assignment, viral reads were extracted from the fastq files using seq_select_by_id (52), and assembled using SPADIS (ver. 3.1.1) (53). All reads were then used to scaffold these contigs using SSPACE (ver. 1.0.5) (54). Contigs larger than 1 kb were aligned to arenavirus reference sequences available on GenBank using Mauve Contig Mover (ver. 1.0.0) (55). Reads were mapped to both assembled contigs and mammarenavirus reference using BWA (ver. 0.7.5) (56). Consensus genome sequence was produced at a minimum depth of five reads using an in-house script. All of the above was performed using a local instance of the Galaxy Project (57-59). BAM files were visualized using tablet (60). Coding complete sequences for both segments were loaded into the Pairwise Sequence Comparison (PASC) tool, and analyzed using the default parameters (61).

Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignment and comparison of amino acid were performed using MAFFT version 7 employing the E-INS-i algorithm, in the Jalview v.4 software program

(62). The best-fit evolutionary model was determined using MEGA version 7, using the Bayesian Information Criterion (63). Phylogenetic relationships were estimated by Maximum likelihood phylogenetic inference using PhyML implemented in SeaView v.4 software program (64), and by a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in MrBayes v3.2.6 (65). For the Bayesian analyses, we used a mixed aa model of evolution with γ -shaped distribution of rates across sites. The MCMC settings consisted of two simultaneous independent runs with four chains each that were run for 10 million generations and sampled every 100th generation, yielding 100,000 trees. After eliminating 10% of the samples as burn-in, a consensus tree was built. Statistical support of the clades was measured by a heuristic search with 1000 bootstrap replicates and the Bayesian posterior probabilities.

Aporé virus and *Oligoryzomys mattogrossae* study

Additionally we initiated a screening study targeting *Oligoryzomys mattogrossae* rodents for the presence of arenaviruses according to previously published protocols (46, 47). Rodents were trapped during independent field trips conducted at different years and periods and in different municipalities from Brazil, as detailed in Table 1. Specimen were collected and stored individually at -80°C in liquid nitrogen, in RNA-preserving buffers such as RNALaterTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or in ethanol stored at -20°C (Table 3).

Frozen tissue samples were thawed and ground mechanically with a 3-mm tungsten carbide bead using using the Precellys[®] bead beater (Bertin Technologies, France) at 24 cycles/sec for 5 min, with 1 mL of minimal essential medium (MEM) from Gibco (Rockville, MD). Homogenized tissues were centrifuged at 13,000 g for 5 min. An aliquot of 100 μL of the clarified supernatant was used to inoculate Vero C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ECACC 85020206) and HK 21 (clone 13) (ECACC 85011433) cells in 12.5 cm^2 plastic tissue flasks. The cells were maintained in MEM supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine, 1% penicillin, 1% streptomycin, and 3% kanamycin and incubated at 37°C . The flasks were checked daily using an inverted microscope for cytopathic effect (CPE). On day 7 post-inoculation, the cell culture fluid overlay was collected and total nucleic acids were purified and tested for the presence of mammarenavirus by RT-PCR. All work with infectious material was performed in a Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory in Public Health England, Porton Down, UK.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Tatiana Rozental and Bernardo Teixeira for the dedication and technical support during this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JF, AG, RCO, RH, ERS. Performed field trips and animal's identification: PSD, CRB. Performed the experiments: JF, AG, RCO, JC, BA, KL, VG, TAC. Analyzed the data: JF, AG, RCO, RH, ERS. Wrote the paper: JF, AG, RCO, PSD, CRB, RH, ERS.

References

1. Charrel RN, de Lamballerie X. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):213-20.
2. Enria DA, Pinheiro F. Rodent-borne emerging viral zoonosis. Hemorrhagic fevers and hantavirus infections in South America. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14(1):167-84, x.
3. Patterson M, Grant A, Paessler S. Epidemiology and pathogenesis of Bolivian hemorrhagic fever. *Curr Opin Virol.* 2014;5:82-90.
4. Enria DA, Briggiler AM, Sánchez Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008;78(1):132-9.
5. de Manzione N, Salas RA, Paredes H, Godoy O, Rojas L, Araoz F, et al. Venezuelan hemorrhagic fever: clinical and epidemiological studies of 165 cases. *Clin Infect Dis.* 1998;26(2):308-13.
6. Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol.* 2015;160(7):1851-74.
7. Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Frigerio M, De La Barrera JM, Mettler N, et al. [Concerning the epidemic outbreak in Junin]. *Dia Med.* 1958;30(62):2300-1.
8. Salas R, de Manzione N, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, Betancourt A, et al. Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet.* 1991;338(8774):1033-6.
9. Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albariño CG, et al. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* 2008;4(4):e1000047.
10. Lisieux T, Coimbra M, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LT, Ferreira I, et al. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet.* 1994;343(8894):391-2.

11. Ryder RW, Gandsman EJ. Laboratory-acquired Sabiá virus infection. *N Engl J Med.* 1995;333(25):1716.
12. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, de Carvalho Serra F, Bonvicino CR, D'Andrea PS, et al. Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species. *Infect Genet Evol.* 2015;33:242-5.
13. Sabino-Santos G, Maia FG, Jonsson CB, Goodin DG, Salazar-Bravo J, Figueiredo LT. Serologic Evidence of Mammarenaviruses among Wild Rodents in Brazil. *J Wildl Dis.* 2016;52(3):766-9.
14. Rocha CR, Ribeiro R, Takahashi FSC, Marinho-Filho J. Microhabitat use by rodent species in a central Brazilian cerrado. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde.* 2011;76(5):651-3.
15. Vieira EM, Iob G, Briani DC, Palma ART. Microhabitat selection and daily movements of two rodents (*Necomys lasiurus* and *Oryzomys scotti*) in Brazilian Cerrado, as revealed by a spool-and-line device. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde.* 2005;70(6):359-65.
16. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, Maia RM, Teixeira BR, Oliveira FCG, et al. Co-circulation of Araraquara and Juquitiba Hantavirus in Brazilian Cerrado. *Microb Ecol.* 2017.
17. de Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ER. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses.* 2014;6(5):1929-73.
18. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, Strecht L, Casado F, Gomes de Oliveira FC, et al. Characterization of Juquitiba virus in *Oligoryzomys fornesi* from Brazilian Cerrado. *Viruses.* 2014;6(4):1473-82.
19. Mendes WS, da Silva AA, Aragão LF, Aragão NJ, Raposo MeL, Elkhoury MR, et al. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhao, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(8):1496-8.
20. Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci.* 2013;280(1756):20122753.
21. Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol.* 2001;1:1.
22. Carter SD, Surtees R, Walter CT, Ariza A, Bergeron É, Nichol ST, et al. Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 2012;86(20):10914-23.

23. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, de Lemos ER, Schrago CG. New bunya-like viruses: Highlighting their relations. *Infect Genet Evol.* 2017;49:164-73.
24. Zapata JC, Salvato MS. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. *Viruses.* 2013;5(1):241-78.
25. Urquidi V, Bishop DH. Non-random reassortment between the tripartite RNA genomes of La Crosse and snowshoe hare viruses. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 9):2255-65.
26. Borucki MK, Chandler LJ, Parker BM, Blair CD, Beaty BJ. Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 12):3173-9.
27. Stenglein MD, Sanders C, Kistler AL, Ruby JG, Franco JY, Reavill DR, et al. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. *MBio.* 2012;3(4):e00180-12.
28. Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 10):2535-43.
29. Pérez-Losada M, Arenas M, Galán JC, Palero F, González-Candelas F. Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect Genet Evol.* 2015;30:296-307.
30. Charrel RN, Lemasson JJ, Garbutt M, Khelifa R, De Micco P, Feldmann H, et al. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology.* 2003;317(2):191-6.
31. Archer AM, Rico-Hesse R. High genetic divergence and recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology.* 2002;304(2):274-81.
32. Charrel RN, Feldmann H, Fulhorst CF, Khelifa R, de Chesse R, de Lamballerie X. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(5):1118-24.
33. Cajimat MN, Milazzo ML, Haynie ML, Hanson JD, Bradley RD, Fulhorst CF. Diversity and phylogenetic relationships among the North American Tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae). *Virology.* 2011;421(2):87-95.
34. Sevilla N, de la Torre JC. Arenavirus diversity and evolution: quasispecies in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:315-35.
35. Cajimat MN, Milazzo ML, Hess BD, Rood MP, Fulhorst CF. Principal host relationships and evolutionary history of the North American arenaviruses. *Virology.* 2007;367(2):235-43.

36. Vivo Md, Carmignotto AP, Gregorin R, Hingst-Zaher E, Iack-Ximenes GE, Miretzki M, et al. Checklist dos mamíferos do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*. 2011;11:111-31.
37. Weksler M, Lemos EMS, D'Andrea PS, Bonvicino CR. The Taxonomic Status of *Oligoryzomys mattogrossae* (Allen 1916) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae), Reservoir of Anajatuba Hantavirus. *American Museum Novitates*. 2017(3880):1-32.
38. Fulhorst CF, Milazzo ML, Carroll DS, Charrel RN, Bradley RD. Natural host relationships and genetic diversity of Whitewater Arroyo virus in southern Texas. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(1):114-8.
39. Lavergne A, de Thoisy B, Donato D, Guidez A, Matheus S, Catzefflis F, et al. Patawa Virus, a New Arenavirus Hosted by Forest Rodents in French Guiana. *Ecohealth*. 2015;12(2):339-46.
40. Li K, Lin XD, Wang W, Shi M, Guo WP, Zhang XH, et al. Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China. *Virology*. 2015;476:37-42.
41. Blasdel KR, Duong V, Eloit M, Chretien F, Ly S, Hul V, et al. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife*. 2016;5.
42. Olayemi A, Cadar D, Magassouba N, Obadare A, Kourouma F, Oyeyiola A, et al. New Hosts of The Lassa Virus. *Sci Rep*. 2016;6:25280.
43. Gryseels S, Baird SJ, Borremans B, Makundi R, Leirs H, Göuy de Bellocq J. When Viruses Don't Go Viral: The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):e1006073.
44. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Barreto-Vieira DF, Terças ACP, Teixeira BR, et al. Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop*. 2017;179:17-24.
45. García JB, Morzunov SP, Levis S, Rowe J, Calderón G, Enría D, et al. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology*. 2000;272(1):127-36.
46. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*. 1996;219(1):285-90.
47. Bonvicino CR, Oliveira J, Gentile R. A New Species Of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) From Eastern Brazil. *Zootaxa*. 2010;2336:19-25.
48. Bonvicino CR. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. *Soc Bras Mastozoologia*. 2011;62:7-11.

49. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ, Velleca WM. Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing: U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention; 1995.
50. Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M, et al. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W622-7.
51. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014;15(3):R46.
52. Cock PJ, Grünig BA, Paszkiewicz K, Pritchard L. Galaxy tools and workflows for sequence analysis with applications in molecular plant pathology. *PeerJ.* 2013;1:e167.
53. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.
54. Cuccuru G, Orsini M, Pinna A, Sbardellati A, Soranzo N, Travaglione A, et al. Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics.* 2014;30(13):1928-9.
55. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2071-3.
56. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.
57. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, et al. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010;Chapter 19:Unit 19.0.1-21.
58. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, et al. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 2005;15(10):1451-5.
59. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Team G. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11(8):R86.
60. Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle L, et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):193-202.
61. Bao Y, Chetvernin V, Tatusova T. Improvements to pairwise sequence comparison (PASC): a genome-based web tool for virus classification. *Arch Virol.* 2014;159(12):3293-304.

62. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 2010;27(2):221-4.
63. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(30):11030-5.
64. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012;61(3):539-42.
65. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999;73(1):152-60.

4.1.6. Artigo 6 - New bunya-like viruses: Highlighting their relations

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.2.** Analisar as relações filogenéticas entre os arenavírus e membros da família *Bunyviridae*.

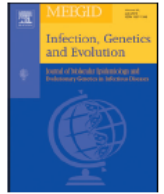
Objetivo específico:

- ✓ Realizar análises filogenéticas a partir de sequências nucleotídicas obtidas em bases de dados para verificar a relação entre os arenavírus e os bunyavirus, em especial os nairovirus.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista *Genetic, Infection and Evolution*

Fator de Impacto da Revista: 2,8

Referência: Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, de Lemos ER, Schrago CG. New bunya-like viruses: Highlighting their relations. *Infect Genet Evol.* 2017; 49: 164-173.



Research paper

New bunya-like viruses: Highlighting their relations

Alexandro Guterres^{a,b,*}, Renata Carvalho de Oliveira^a, Jorlan Fernandes^a,
Elba Regina Sampaio de Lemos^a, Carlos Guerra Schrago^b

^a Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 18 January 2017

Available online 19 January 2017

Keywords:

Bunyavirus supergroup

Arenaviruses

Bunyaviruses

Phleboviruses

Orthobunyaviruses

Tospoviruses

Evolutionary history

ABSTRACT

The standard virus classification scheme for arenaviruses and bunyaviruses shifted dramatically when several groups reported the detection and isolation of divergent groups of viruses in a variety of insect collections. Although these viral families can differ in terms of morphology, structure and genetics, recent findings indicate these viruses may have a shared evolutionary origin. To determine the phylogenetic relations among these families, we inferred phylogenetic trees using three methods. The Maximum Likelihood and Bayesian trees were rooted as suggested by the (molecular clock-rooted) BEAST tree. Our results highlight a noteworthy relation among these viral supergroups of different genome organizations. Our study suggests that the best scenario is the existence of at least three monophyletic supergroups, all of them well supported. The recent data indicate that these viruses are evolutionarily and genetically interconnected. While these supergroups appear to be closely related in our phylogenetic analysis, other viruses should be investigated in future research. In sum, our results also provide insights into the classification scheme, thereby providing a new perspective about the fundamental questions of family origins, diversity and genome evolution.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Most human pathogenic bunyaviruses and arenaviruses cause severe hemorrhagic fevers with a high rate of fatalities. Increasing number of outbreaks and the possibility of cases spreading over international borders has led to increased interest in these viruses and their relations. The ongoing threat of emerging hemorrhagic diseases has made the search for reservoir species with a history of coevolution, for example, with the mammarenaviruses, and hantaviruses, a priority (Charrel and de Lamballerie, 2010; de Oliveira et al., 2014; Zapata and Salvato, 2013). The origin, phylogenetic relationships and evolutionary history of viral genomes is a classic problem that has inspired a long series of questions and hypotheses in evolutionary biology. Recently, sequence analyses of emerging viruses have shown that genes from arenaviruses are potentially homologous to other negative-strand viruses such as bunyaviruses and filoviruses (Carter et al., 2012; Gallaher et al., 2001).

Viruses in the family *Bunyaviridae* (the bunyaviruses) share several molecular characteristics. Based on their differences, the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) has classified them into

five genera: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* and *Tospovirus* (Elliott, 2009). In 1975, this family was proposed to encompass viruses with morphological and structural similarities, but with diverse life cycles. The *Bunyaviridae* genome is comprised of three negative-sense RNA segments (large, medium and small) that employ a variety of coding strategies to generate a limited set of structural and non-structural proteins (Schmaljohn and Nichol, 2007). The large (L) RNA of these viruses codes for the transcriptase and replicase proteins and large RNA-dependent RNA polymerase (RdRp or L protein). Glycoproteins are coded by the medium (M) RNA, which generates a polyprotein that is proteolytically processed. In viruses of some genera, a non-structural protein (NSm) of unknown function is also included. The small (S) RNA codes for the nucleocapsid protein and also for a non-structural protein in viruses of several genera (Elliott and Schmaljohn, 2013; Elliott, 2014). For instance, the L and S segments of the tick-borne Crimean Congo hemorrhagic fever virus (family *Bunyaviridae*, genus *Nairovirus*) encode a polymerase and a nucleocapsid with strong similarity to the Lassa virus (family *Arenaviridae*, genus *Mammarenavirus*) (Carter et al., 2012).

The first discovery of a “virus of experimental lymphocytic choriomeningitis”, today well known as the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), occurred in 1933 (Armstrong and Lillie, 1934). However, only in 1976 was the family *Arenaviridae* established to include the genus *Arenavirus* with LCMV and Tacaribe complexes recognized. Members of the monogeneric family

* Corresponding author at: Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Pavilhão Helio e Peggy Pereira – 1° pav. Sala B115, Av. Brasil 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.

E-mail address: guterres@ioc.fiocruz.br (A. Guterres).

Arenaviridae had been reported to infect only rodents, except in one case of bats and ticks (Radoshitzky et al., 2015; Saylor et al., 2014). This scenario shifted dramatically when several groups published the detection and isolation of divergent arenaviruses in captive snakes (Bodewes et al., 2013; Stenglein et al., 2012). The new virus is characterized by ambisense coding and its L and NP genes are homologous to those found in arenaviruses (Zapata and Salvato, 2013). However, the GP sequences are homologous to filovirus envelope glycoproteins (family *Filoviridae*), and the Z gene sequences are homologous to host ubiquitin ligase (Bodewes et al., 2013; Hetzel et al., 2013; Stenglein et al., 2012).

Therefore, arenaviruses are currently classified in two different genera: *Mammarenavirus* and *Reptarenavirus*. Arenaviruses possess single-stranded bi-segmented RNA genomes. Each of the two RNA segments codes for two non-overlapping reading frames of opposite polarities: the viral RNA-dependent RNA polymerase (L protein) and a zinc-binding matrix protein (Z protein) for the large (L) genomic segment. The nucleocapsid protein (NP) and the glycoprotein precursor (GPC) are secondarily cleaved into the envelope proteins G1 and G2 for the small (S) genomic segment (Pinschewer et al., 2003; Qi et al., 2010; Shtanko et al., 2010).

The paradigmatic phylogenetic relation scheme for arenaviruses and bunyaviruses shifted dramatically when several groups independently reported the detection and in some cases the isolation of a divergent group of viruses in a diverse collection of insects, spiders and other arthropods (Frey et al., 2016; Li et al., 2015; Marklewitz et al., 2015). Notably, these new negative-sense RNA viruses were found to be spread across the major lineages of the family *Bunyaviridae*. Although these viral families differ in structure or genetics, these recent findings indicate that these viruses may have a shared evolutionary origin. In this study, we explore key aspects of the evolution of these viruses, particularly their phylogenetic relations, highlighting a perspective in the viral classification scheme, diversity and genome evolution.

2. Materials and methods

2.1. Compiled sequence data

The genomic sequences used in the study were all retrieved from the GenBank® database of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), including the protein sequences of the full genome of the *Arenaviridae* and *Bunyaviridae* families. Within the *Arenaviridae* and *Bunyaviridae* families, we retrieved representative sequences of each genus due to the very high number of species. We added novel lineages of bunyaviruses that have been discovered in insects, spiders, centipedes and other arthropods that might lead to the establishment of at least eight new genera. We retrieved two genera, also related to bunyaviruses (*Emaravirus* and *Tenuivirus*), that are recognized by the ICTV but have not yet been assigned to a family.

Multiple sequence alignment (MSA) were performed using MAFFT version 7 employing the E-INS-i algorithm and TCOFFEE version 11 applying the PSI-Coffee algorithm (Katoh and Standley, 2013; Notredame et al., 2000). Additionally, we used COBALT, which is a protein multiple sequence alignment tool that finds a collection of pairwise constraints derived from a conserved domain database, the protein motif database, and sequence similarity using RPS-BLAST, BLASTP and PHI-BLAST (Papadopoulos and Agarwala, 2007). The sequence alignment was limited to conserved domains, with ambiguously aligned regions removed using TrimAl (Capella-Gutiérrez et al., 2009). We measured alignment confidence based on a Transitive Consistency Score (TCS) web server. The TCS makes it possible to estimate the local reliability of protein MSAs using the TCS index. The purpose of an alignment reliability index is to discriminate between correctly and incorrectly aligned residues. This evaluation can be used to identify the aligned positions most likely to contain structurally analogous residues, as judged from BALiBASE and PREFAB structure-based reference alignments, and is

also most likely to support an accurate phylogenetic reconstruction (Chang et al., 2015; 2014).

2.2. Phylogenetic analyses

We estimated phylogenetic relations of the protein sequences from the three major open reading frames (RdRp, NP and glycoprotein) using (a) ML phylogenetic inference as implemented in PhyML 3 (Guindon and Gascuel, 2003) under the LG + G + I model of sequence evolution, and (b) a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method as implemented in MrBayes v3.2.5 (Ronquist et al., 2012). The MCMC settings consisted of two simultaneous independent runs with four chains each that were run for 10 million generations and sampled every 100th generation, yielding 100,000 trees. After eliminating 10% of the samples as burn-in, a consensus tree was built. Statistical support of the clades was measured by a heuristic search with 1000 bootstrap replicates in PhyML (Anisimova and Gascuel, 2006) and the Bayesian posterior probabilities in MrBayes. For the Bayesian analyses, we used a mixed aa model of evolution with γ -shaped distribution of rates across sites. This model allows selection to be integrated across all best-fit models. The best-fit evolutionary model was determined using MEGA version 6.06, using the Bayesian Information Criterion (Tamura et al., 2013).

A rooted timetree (relaxed molecular clock) of amino acid (aa) sequences was inferred using the Bayesian MCMC method available in the BEAST v1.8.4 package. (Drummond and Rambaut, 2007) We modeled the evolutionary rate evolution along branches by an uncorrelated lognormal prior, and the topologies by the Bayesian Skyline tree prior. Two independent runs were undertaken with sampling every 1000 generations. In BEAST, the same evolutionary model was employed as described above. We used Tracer v.1.6 to check for convergence and adequate mixing (i.e., an estimated sample size >200 for all relevant parameters). The TreeAnnotator program was used to generate a Maximum Clade Credibility (MCC) tree after eliminating the first 10% of the sampled trees as burn-in. Because the MCC tree is automatically rooted in the assumption of a molecular clock, it is possible to determine which viral lineages are most likely to be the stem lineage. The stem clade estimated by the BEAST tree was then used as an outgroup to root the phylogenetic trees inferred in the ML and Bayesian phylogenetic analyses.

2.3. Criteria for demarcation of the supergroup

The most universally used sequence-based virus classification tool is phylogenetic analysis. About 70% of the families and floating genera described in the Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) are supported by phylogenetic trees (King et al., 2012). The chief characteristics of members are presented with phylogenetic analyses of selected genes to support their relations. To help define suitable phylogenetic criteria for relation demarcation, each supergroup was considered to form phylogenetic group when it was clustered into a statistically supported monophyletic clade stem (BEAST/ML/MrBayes, >0.9/>90/>0.9).

3. Results

3.1. Database and multiple sequence alignment

We retrieved a total of 397 sequences from GenBank®: 131 NPs, 119 glycoproteins and 147 L RdRp sequences (Table S1). The aa sequences were aligned using COBALT, MAFFT and TCOFFEE multiple sequence alignment (MSA) methods, and each alignment estimated the positions most likely to contain structurally analogous residues. Starting with the transitive consistency score (TCS) scheme, we selected the MSA to be performed in the MAFFT algorithm.

3.2. Phylogenetic analyses of RdRp sequences

The phylogenetic inference based in the RdRp sequences suggests the existence of at least three monophyletic supergroup, all of them well-supported (Fig. 1). The Maximum Likelihood (ML) and Bayesian trees are rooted in the way suggested by the (molecular clock-rooted) BEAST tree. The first supergroup is bunya-like virus, comprised of one well-supported deeply rooted clade (BEAST/ML/MrBayes = 1/98/1) (Fig. 2). This supergroup is composed of a viral sequence of Wuhan insect virus 3 (GenBank AJG39263), found in the host *Aseillus* sp., occupying the basal position in the supergroup. The next bifurcation comprises two well-supported clades, one (1/94/1) of which includes the sequence of Shayang spider virus 2 (AJG39247), found in *Neoscona nautica*, in a sister relation to the clade of the *Jonvirus*, *Feravirus* and *Phasmaviruses* genera, all of them well supported as a monophyletic group (1/100/1). The other clade is composed of two phylogroups (1/70/1), the first including the sequence of Wenzhou shrimp virus 2 found in *Penaeus monodon*, occupying the basal position of the

phylogroup (0.97/†/0.87). The next bifurcation (*/*/1) within the phylogroup includes the genus *Hantavirus* (1/100/1) and the sequences that form a monophyletic clade (1/100/1), including Shuangao bedbug virus (AJG39248), Shuangao mosquito virus (AJG39252) and Jiangxia mosquito virus 2 (AJG39141), found in *Cimex hemipterus*, *Armigeres subalbatus* and *Culex tritaeniorhynchus*, respectively. The second phylogroup (1/91/1) is composed of the genus *Tospovirus* (1/100/1) as a stem lineage in the phylogroup, with the next bifurcation (0.82/†/0.96) within the phylogroup containing the genus *Emaravirus* (1/100/1), followed by the genera *Orthobunyavirus* and *Herbevirus*, all of them well-supported groups (1/100/1).

The second supergroup is arena-naïro-like viruses, composed of two well-supported deeply rooted clades (1/100/1), one of which includes the two genera *Mammarenavirus* and *Reptarenavirus*, henceforth referred to as arenaviruses (1/100/1). The other clade is from now on referred to as naïroviruses, and is composed of the genus *Naïrovirus* (1/100/1). The sequence Jiangxia mosquito virus 1 found in the *Culex tritaeniorhynchus* (GenBank AJG39240), although occupying a stem

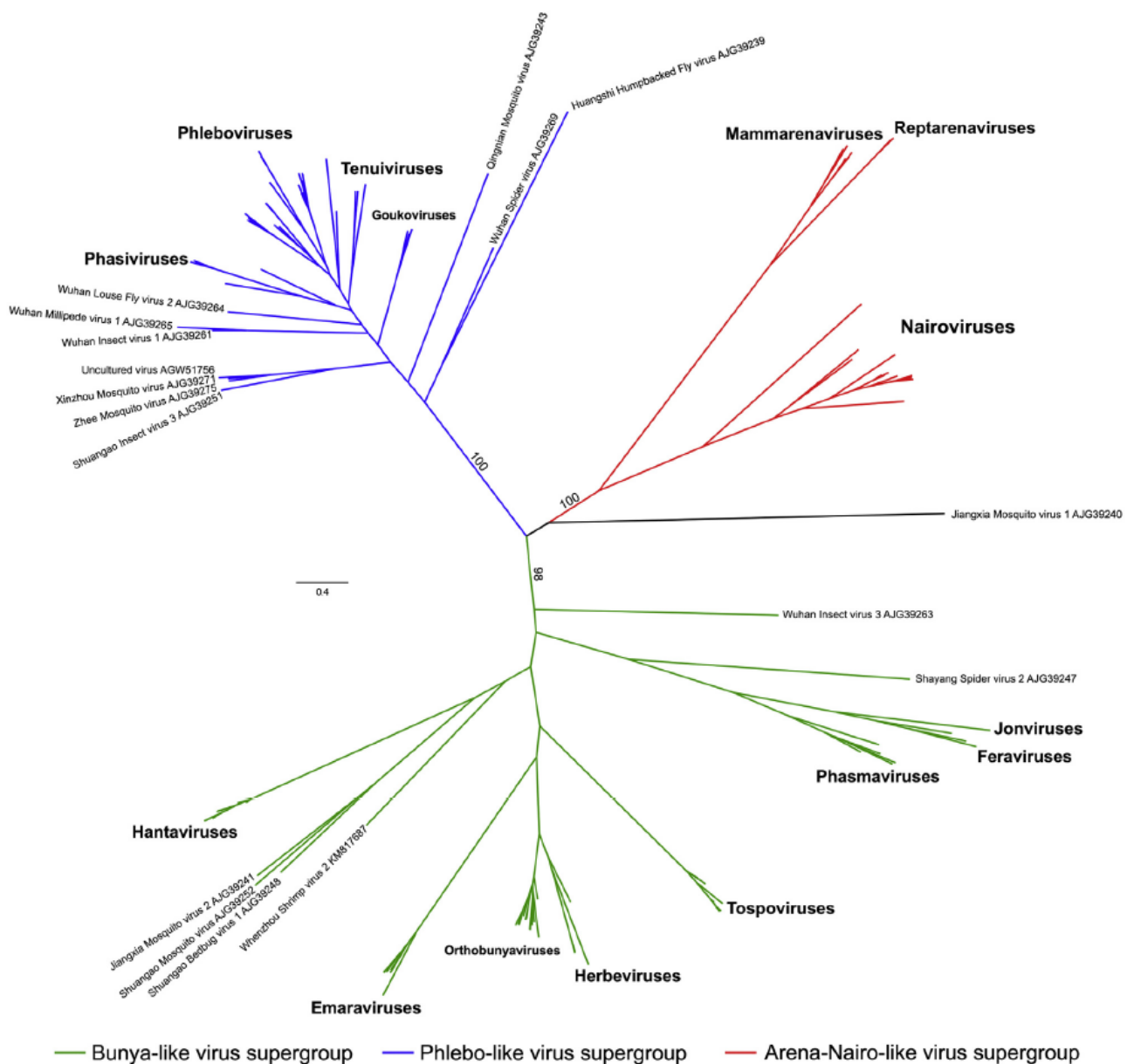


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree of bunya-like viruses based on the RdRp protein sequences, estimated using the ML method. In green, bunya-like virus supergroup; in blue, phlebo-like virus supergroup; and in red, Arena-Nairo-like supergroup. Numbers (>90%) above branches indicate bootstrap values of the supergroups. Scale bar represents number of amino acid substitutions per site. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

lineage to the arenaviruses, has uncertain basal position in the phylogenetic tree (*/†/†). The ML and MrBayes exhibit differences compared with the BEAST, and the Jiangxia mosquito virus 1 sequence occupies a stem lineage to the third family, referred to here as phlebo-like supergroup.

The phlebo-like virus supergroup is composed of one well-supported deeply rooted clade (1/100/1). Although this supergroup is well-supported as being a monophyletic clade in three phylogenetic methods, some of its relations in the next bifurcations are uncertain. The ML exhibited differences when compared with BEAST and MrBayes. The Huangshi humpbacked fly virus (AJG39239) found in unidentified Phoridae and the Wuhan spider virus (AJG39269) found in *Neoscona nautica* form a clade (1/†/0.98) that occupies a stem lineage to the phlebo-like supergroup, followed by the Qingnian mosquito virus (AJG39243) sequence found in *Culex quinquefasciatus*, comprising the stem sister clade (1/†/0.89). The next bifurcation (1/90/0.96) is formed by a monophyletic clade (1/100/1) comprised of Shuangao insect virus (AJG39251), Zhee mosquito virus (AJG39275), Xinzhou mosquito virus (AJG39271) and an uncultured virus (AGW51765) found in unidentified Chrysopidae, *Anopheles sinensis* (Zhee and Xinzhou) and *Culicine* sp., respectively. The next bifurcation (1/†/0.97) is comprised of the monophyletic genus *Goukovirus* (1/100/1), being an addition to the next bifurcation, containing a clade formed by Wuhan insect virus (AJG39261) and Wuhan millipede virus 1 (AJG39265), found in *Asellus* sp. and unidentified Polydesmidae, respectively. The Wuhan Louse fly virus 2 (AJG39264), found in unidentified Hippoboscoidea, comprised the stem sequence of the next bifurcation, although having an uncertain phylogenetic position (0.84/*/*), being close to a clade composed of three indoor clades. The first clade is formed by Wenzhou shrimp virus 1 (AJG39256) and the phylogroup composed of the genus *Phasivirus* (1/100/1) and Wuhan fly virus 1 (AJG39259), found in *Atherigona orientalis*. The second clade consists of the genus *Tenuivirus* (1/100/1) and Wenzhou shrimp virus 1 (AJG39256), found in *Panaeus monodon*. The third clade (1/†/1) is comprised of the genus *Phlebovirus*

(1/†/1) and blacklegged tick 1 and 2 viruses (AII01807, AII01801), found in *Ixodes scapularis* plus the Soybean cyst nematode associated with Uukuniemi virus (AEF56734), found in *Heterodera glycines*.

3.3. Phylogenetic analyses of NP sequences

The phylogenetic relations based on the NP sequences revealed minor differences compared with the RdRp trees, with relatively strong statistical support in some branches. Because of the high genetic diversity, we conducted the NP analyses by related groups within of the bunya-like virus supergroup. In the NP sequence tree of the first group, we evaluated *Phasmavirus*, *Feravirus* and *Jonvirus* genera (Fig. 3). The same topology of the L protein tree was found, with the *Feravirus* and *Jonvirus* genera branched monophyletically (1/100/1) subsequent to the clade of the genus *Phasmavirus* (0.70/99/1). The second group, formed by the genus *Hantavirus* and a new viral sequences found in invertebrates, was not included in the NP analyses due to the lack of NP sequences of these new invertebrate viruses. The third group, composed of the genera *Tospovirus*, *Emaravirus*, *Orthobunyavirus* and *Herbevirus* (Fig. 4), recovered as a monophyletic group (1/100/1) from the genus *Emaravirus* (plant-pathogenic viruses), was now found occupying a stem position in the group, different from what was retrieved in the polymerase tree. In the sister clade (0.74/100/1), the first bifurcation was comprised of the genus *Tospovirus* (1/100/1), followed by Shuangao insect virus 1 (AJG39311) (*/†/†) and the next bifurcation, composed of the genera *Herbevirus* (*/†/†), although having uncertain phylogenetic position. The Akhtuba virus (AIL53815) and Khurdun virus (AHL27171) formed a monophyletic clade (1/100/1), which was an uncertain sister clade (*/†/†) of the genus *Orthobunyavirus* (1/70/0.98). It is important to note that the ML and Bayesian tree topologies were different (†) in poorly supported branches. The main difference between the NP and L protein phylogenetic trees were the Shuangao insect virus 1, Akhtuba virus and Khurdun virus, which do not form a monophyletic clade within the genus *Herbevirus*.

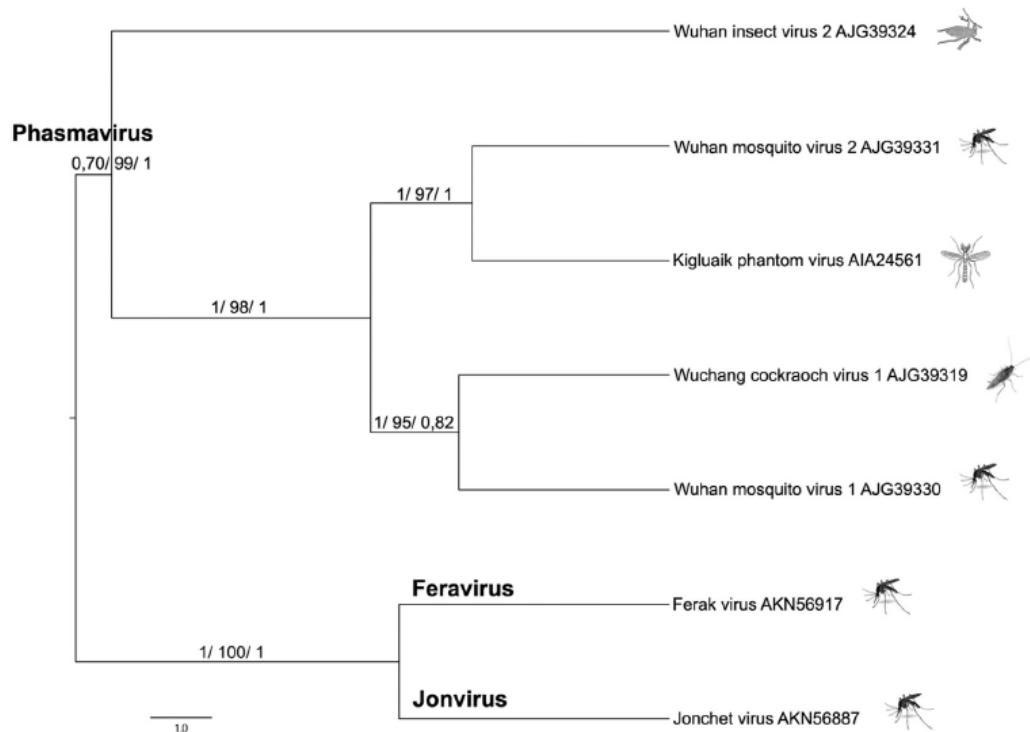


Fig. 3. Phylogenetic trees based on the NP protein (263 aa) sequences of feraviruses, jonviruses and phasmaviruses, estimated using ML and Bayesian methods. The MCC tree – shown here – was automatically rooted on the assumption of a molecular clock. The basal lineage estimated by the MCC tree was then used as an outgroup in the Bayesian and ML analyses. Numbers (>0.7/>70%/>0.7) above branches indicate posterior probabilities or bootstrap values (BEAST/ML/MrBayes). *Indicates values below 0.7/70. †Exhibited difference between BEAST, ML trees and MrBayes tree-building method topology. Illustration of some reservoirs/hosts.

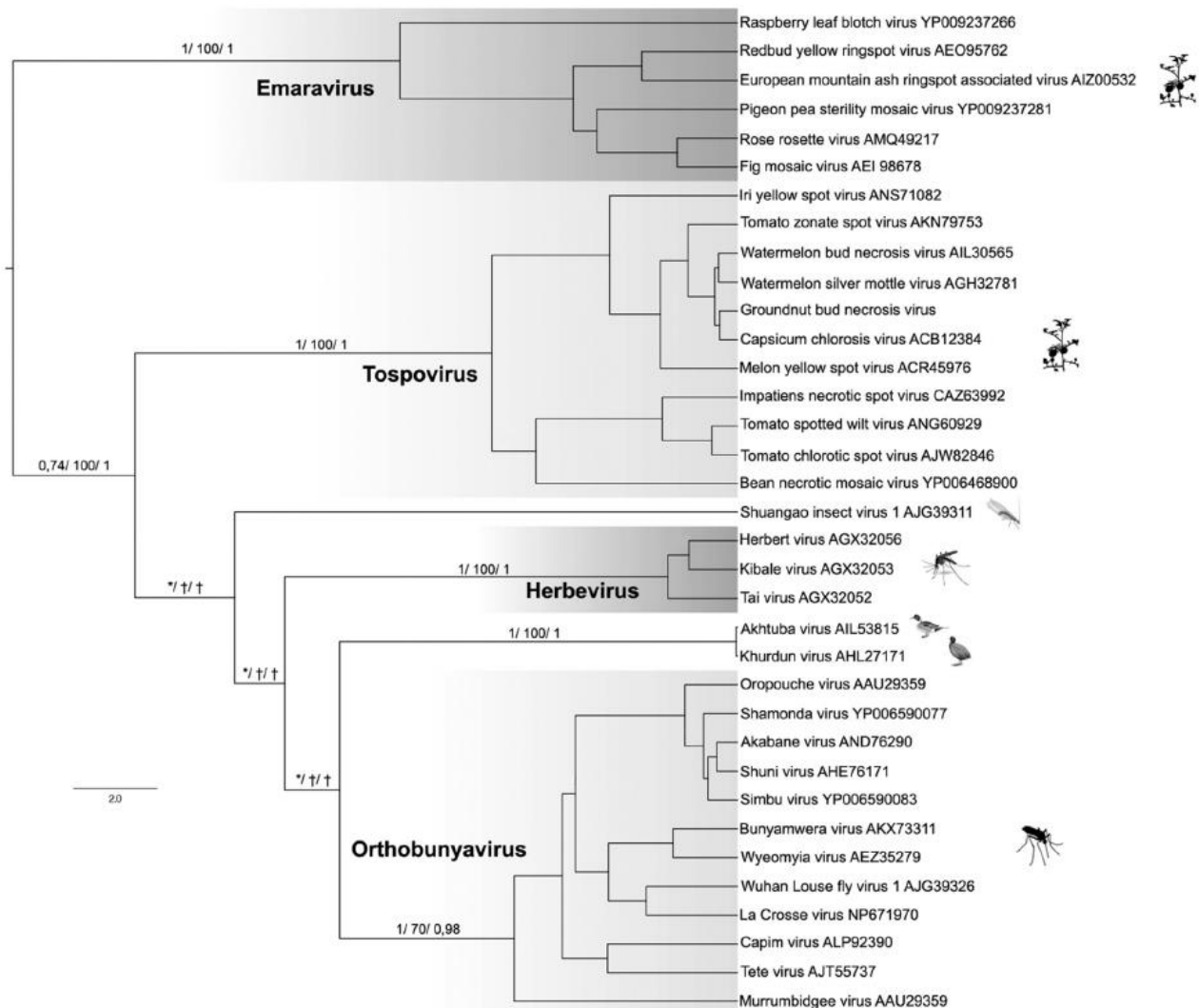


Fig. 4. Phylogenetic trees based on the NP protein (166 aa) sequences of emaraviruses, herbeviruses, orthobunyavirus and tospoviruses, estimated using ML and Bayesian methods. The MCC tree – shown here – was automatically rooted on the assumption of a molecular clock. The basal lineage estimated by the MCC tree was then used as an outgroup in the Bayesian and ML analyses. Numbers ($>0.7/>70\%/>0.7$) above branches indicate posterior node probabilities or bootstrap values (BEAST/ML/Mrbayes). *Indicates values below 0.7/70. †Exhibited difference between BEAST, ML trees and MrBayes tree-building method topology. Illustration of some reservoirs/hosts.

The phylogenetic inference based on the NP sequences of the arenavirus-like virus supergroup produced highly similar topologies in relation to the L sequence tree (Fig. 5). The nairoviruses were recovered as a monophyletic clade (1/100/1). This group was composed of Shayang spider virus 1 (AJG39310), found in the host *Neoscona nautica* occupying the basal position in the nairoviruses. The next bifurcation is formed by a monophyletic clade (1/100/1), which is comprised of Wuhan millipede virus 2 (AJG39329), Sanxia water strider virus 1 (AJG39309) and Xinzhou spider virus (AJG39333), found in unidentified Polydesmidae, unidentified Gerridae and *Neoscona nautica*, respectively. The next bifurcation (1/95/1) is comprised of a monophyletic clade of the viruses found in ticks. Within the arenaviruses (1/100/1), as expected the genus *Reptarenavirus* (1/100/1) formed one monophyletic group that is deeply rooted to the genus *Mammarenavirus* (1/86/0.99). Mammarenaviruses were divided into two distinct groups. Old World and New World mammarenaviruses fall into two separate groups, corresponding to the Lassa-Lymphocytic choriomeningitis virus (1/93/1) and Tacaribe serocomplexes (1/86/0.99), respectively. The NW mammarenaviruses were divided into three lineages, also known as clades A, B and C, which were well-supported as monophyletic.

The final alignment length of the family phlebo-like virus supergroup was 69 amino acids for NP datasets. This reduced size was uninformative, so in our phylogenetic analysis the effective sample size (ESS) of some parameters was under 200, indicating parameters did not converge (data not shown). Trees based on glycoprotein sequences were affected in our phylogenetic inference. All of the species included in this study clearly did not constitute a distinct monophyletic genus. The tree topologies that we estimated using glycoproteins were not consistent, indicating that the distinctly varied sizes of proteins adversely affected our phylogenetic analyses.

4. Discussion

The classification of bunyaviruses does not obey any strictly defined criteria, although they are unified by common characteristics, such as having a single strand with negative sense, a segmented RNA genome, an enveloped, spherical virion of about 80–120 nm in diameter, a virion composed of four structural proteins, a cytoplasmic site of replication and intracellular budding at the Golgi complex. Mature virions contain two glycoproteins, named Gn and Gc, which are embedded in the viral envelope, a nucleocapsid (N) protein that forms a complex with the

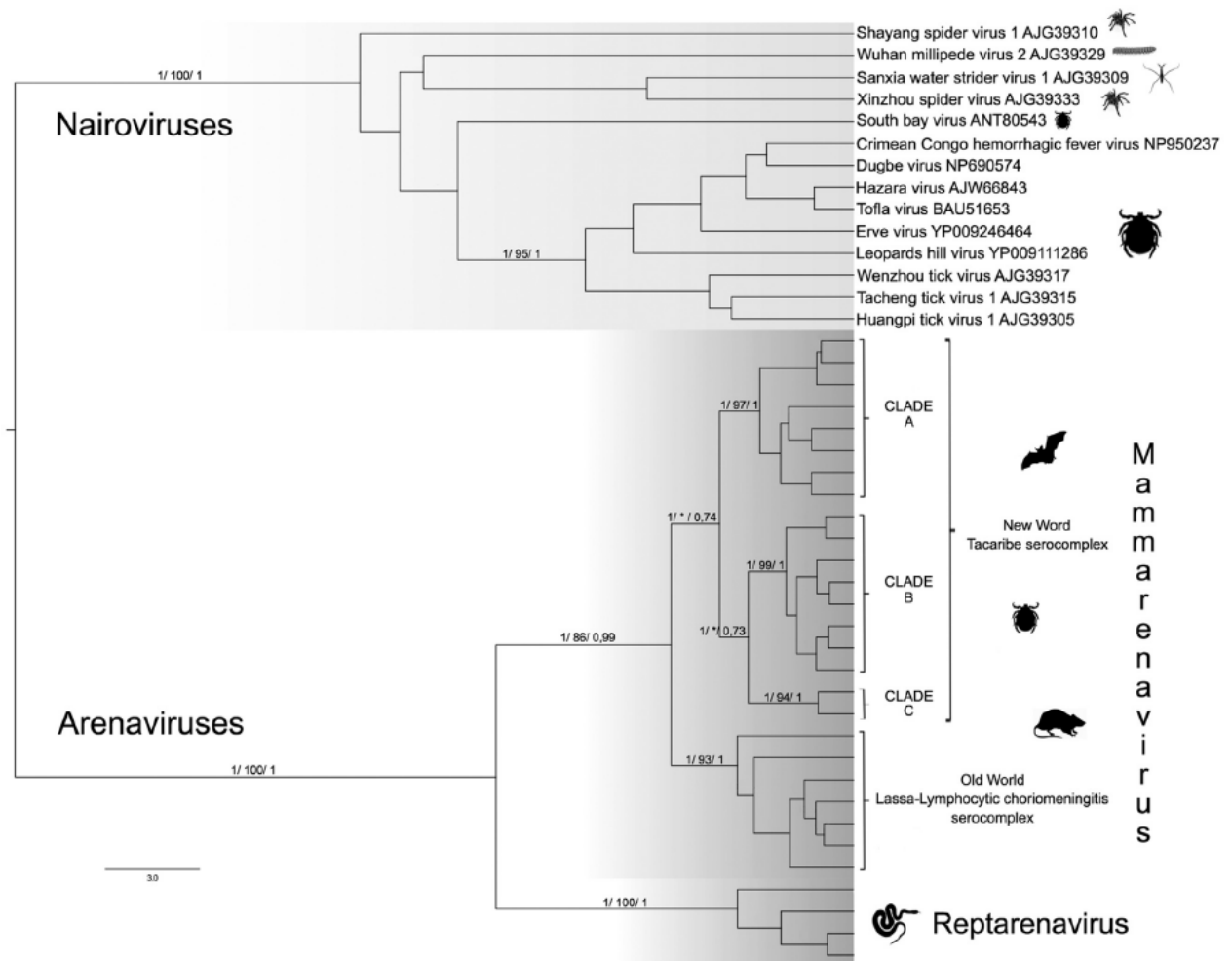


Fig. 5. Phylogenetic trees based on the NP protein (299 aa) sequences of arenaviruses and nairoviruses estimated using ML and Bayesian methods. The MCC tree – shown here – was automatically rooted on the assumption of a molecular clock. The basal lineage estimated by the MCC tree was then used as an outgroup in the Bayesian and ML analyses. Numbers (>0.7 / $>70\%$ / >0.7) above branches indicate posterior node probabilities or bootstrap values (BEAST/ML/Mrbayes). *Indicates values below 0.7/70. Illustration of some reservoirs/hosts.

RNA genome segments, called the ribonucleoprotein complex (RNP), and an RNA-dependent RNA polymerase named L protein, which contains an N-terminal endonuclease domain (Elliot and Schmaljohn, 2013; Elliott, 2014; Plyusnin and Elliot, 2011). However, bunyaviruses show major differences in biological behavior and replication strategy. Moreover, the distinguishing features among members of the five genera are differences in the size of genome segments and proteins (for example, L protein of genus *Nairovirus* with about 12.2 Kb–450 kDa and genus *Hantavirus* 6.5 Kb–250 kDa), different consensus terminal sequences and different coding strategies for the additional non-structural proteins NSs and NSm. Additionally, host and vector associations vary among the genera [1,3]. Therefore, within the family of *Bunyaviridae*, tospoviruses are the only ones that infect plants and are transmitted by thrips (Rotenberg et al., 2015). Viruses of the other genera infect vertebrates and are transmitted by blood-feeding arthropods, with the exception of hantaviruses. Nairoviruses are transmitted by ticks (Messina et al., 2015), orthobunyaviruses mainly by mosquitoes, and phleboviruses by sandflies, mosquitoes and ticks (Horne and Vanlandingham, 2014). Human infections by hantaviruses result from exposure to aerosolized rodent excreta containing pathogenic viruses, and they are associated with multiple species of rodents, shrews, moles and bats (de Oliveira et al., 2014).

Biologically, these viruses are fairly diverse and have been reported in a wide range of host species. In this study, we compared the genomes of arenaviruses, bunyaviruses and divergent group of novel viruses to

assess their relations. Despite the complex evolutionary histories of these viruses, the phylogenetic signals are coherent enough to obtain a consensus phylogeny, which unequivocally points to the common ancestry of these viruses. In summary, recent studies have led to the accumulation of compelling evidence that points to a common ancestry of the arena-nairo-like virus supergroup, bunya-like supergroup and phlebo-like supergroup. Within the bunya-like viruses, each of the supergroups comes across as a clade assembled into four major branches, one of which encompasses the bunya-like supergroup, the second one the arena-nairo-like supergroup formed by the arenaviruses and nairoviruses, the third branch consisting of Jiangxia mosquito virus 1, with uncertain basal position in the phylogenetic tree, and the fourth consisting of the phlebo-like supergroup. Several groups have independently published phylogenetic analyses with a large part of these viruses, providing similar topologies (Junglen, 2016; Li et al., 2015; Marklewitz et al., 2015). However, in none of these studies did the authors use all the new genera and/or new viral sequences, a employed in this study.

The new bunya-like viruses display a wide variety of genome organizations, including two, three or four segments, besides several differences in biological behavior and replication strategy (Elliot and Schmaljohn, 2013; Guu et al., 2012; Mielke-Ehret and Mühlbach, 2012; Plyusnin and Elliot, 2011). Recently, Li and collaborators proposed a novel viral family, the *Chuviridae*. Although monophyletic, the chuviruses display a wide variety of genome organizations including

unsegmented, bi-segmented and circular forms (Li et al., 2015). The phylogenetic tree of evolutionary relations between many groups of negative-sense RNA viruses (including arena-, bunya- and filovirus) suggests a division between the segmented and unsegmented viruses. The identification of this diverse virus family provides a new perspective on the virus classification scheme, which opens up an important line of future research (Dudas and Obbard, 2015). The *Bunyaviridae* family is undergoing a thorough taxonomic revision by the ICTV, and in the next release it will become an order (*Bunyavirales*) with eight families: *Feraviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Jonviridae*, *Nairoviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae* and *Tospoviridae* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016). Although bunya-like viruses are well represented in the proposal, arenaviruses are not included yet in this new taxonomic order. According to our results and other studies, *Arenaviridae* should be considered in future taxonomic changes as a possible family or genus related to Nairo-like bunyaviruses. Furthermore, with the inclusion of arenaviruses, three large branches are created, which can change all taxonomic proposals.

Even more convincing evidence for the evolutionary link between arenaviruses and nairoviruses has come from phylogenetic analysis of the NP and L protein. Despite the pronounced differences in genome organization and complexity, members of the two families have an unexpected evolutionary link. It has become apparent that at the genome level nairoviruses are no more similar to the other members of the bunya-like viruses than to the arenaviruses. Recently, a study analyzed a novel bunyavirus group from mosquitoes (Marklewitz et al., 2015). These authors evaluated the relations between novel bunyaviruses with other bunyaviruses and arenaviruses. The genus *Nairovirus* was placed in a basal relation compared with all other bunyaviruses and was considered to be closely related to arenaviruses. As proposed earlier, our trees rooted in a way that suggested that the (molecular clock-rooted) arenaviruses are closely related to the nairoviruses (Carter et al., 2012; Marklewitz et al., 2015; Vieth et al., 2004). However, these groups do not take a basal position with respect to the remaining bunyaviruses. In general, the phylogenetic grouping of nairoviruses that are very well supported with sister clades to the arenaviruses support the view that nairoviruses and arenaviruses are a supergroup. Nairoviruses include many species, all of which are either maintained by arthropods or transmitted by ticks through bats, birds, eulipotyphla or rodents (Kuhn et al., 2016; Plyusnin and Elliot, 2011). Arenaviruses, on the other hand, have been associated mainly with rodents and more recently to boid snakes (Zapata and Salvato, 2013). However, the Tacaribe virus is a mammarenavirus for which a rodent host has never been specified. This virus was first isolated from bats and mosquitoes, and since that one-time isolation, it has not been isolated from any vertebrate or invertebrate hosts (Downs et al., 1963). Recently, the Tacaribe virus was isolated from a pool of *Amblyomma americanum* (lone star ticks) and its complete genome was sequenced (Sayler et al., 2014). This fact leads us to believe that the answer for other mammarenaviruses without a defined reservoir, such as the Sabiá virus, Lujo virus and Chapare virus, can be found in arthropods (Briese et al., 2009; Delgado et al., 2008; Gonzalez et al., 1996). This notable feature highlights an important evolutionary link between nairoviruses and arenaviruses, the invertebrates hosts.

Importantly, in the bunya-like virus supergroup and phlebo-like virus supergroup, our phylogenetic analysis revealed no particular trend for the *Emaravirus*, *Tospovirus* and *Tenuivirus* genera (plant pathogenic viruses) to form a stem lineage. However, it has been proposed that RNA viruses of plants were acquired through three processes that contributed to the evolution of related viruses in plants and animals: i) evolution from a common ancestral virus predating the divergence of plants and animals; ii) horizontal transfer of viruses, for example, through insect vectors; and iii) parallel origin from related genetic elements (Dolja and Koonin, 2011). This scenario that RNA viruses of plants were acquired from animals via horizontal virus transfer is compatible with the markedly higher diversity and prevalence of animal

RNA viruses compared to the relative scarcity of these viruses in plants (Guu et al., 2012).

A different method uses the fossil record of the hosts groups to calibrate viruses' evolutionary rates (Bennett et al., 2014). Hantaviruses exhibit an astonishing degree of phylogenetic correspondence with their hosts. These important findings are an indication that the full time scale of hantavirus evolution has been appreciated only now (Guo et al., 2013; Guterres et al., 2015; Holmes and Zhang, 2015). Recently, researchers have proposed that hantaviruses are very ancient viruses that already existed at the estimated diversification point of major placental clades, a diversification that occurred approximately 90–100 million years ago (Plyusnin and Sironen, 2014). However, it is logical to assume that the evolutionary history of hantaviruses is even deeper in the past, and should include transmission of an ancestral hantavirus harbored by an insect to a mammalian host. Our studies (molecular clock-rooted) also provide important insights into the hantaviruses, which seem to be closely related to new viruses discovered in invertebrates, including one found in shrimp. One notable feature is that the Wuhan insect virus 3 found in *Asellus* sp. (isopod crustaceans) is a stem lineage of the bunya-like virus supergroup. Accordingly, the current study provides a tempting evidence to speculate could bunya-like viruses first appeared in the sea? Indeed, the close phylogenetic relationships among some viruses found in marine invertebrates within the tree supports the occurrence posterior evolutionary events (spill-over, host switching) between terrestrial hosts and marine invertebrates.

Determining the date of bunya-like viruses' origin and the rates of their diversification into major lineages correlated with host lineages is challenging given the absence of an independent method of calibration. Some studies have identified endogenous viral elements (EVEs) over 10 non-retroviral families in the eukaryote genome. When the attachment occurs, the integrated endogenous virus genomes evolve at the same host mutation rates, and their sequence is likely to be stably preserved. Therefore, the genomic fossil record may represent an alternative for studying viral evolutionary history on timescales spanning millions of years (Feschotte and Gilbert, 2012; Johnson, 2010; Katourakis, 2013). In 2009, Geuking and collaborators performed an illegitimate recombination between an exogenous non-retroviral RNA virus, LCMV (genus *Mammarenavirus*) and an endogenous IAP retrotransposon, which led to the reverse transcription of exogenous viral RNA. The resulting complementary DNA was integrated into the host's genome with an IAP element (Geuking et al., 2009). The RNA virus has been found in the genomes of mammal and insect vectors associated with a total of seven viral families, including segmented (*Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*) and non-segmented (*Bornaviridae*, *Filoviridae* and *Rhabdoviridae*) negative-sense RNA viruses. EVEs have already been identified in nairoviruses and *phleboviruses* (Katourakis and Gifford, 2010). Interestingly, novel sequences have been characterized from arthropods, and they are most closely related to hantaviruses, reinforcing that the evolutionary history of hantaviruses is even deeper in the past. These data are striking and indicate that the origin of hantavirus may be arthropods (Li et al., 2015; Marklewitz et al., 2015).

An understanding of the timescale of evolution is critical for comparative virology but remains elusive for many RNA viruses. For example, molecular estimates of the age of the common ancestor of known filoviruses fall into two time ranges. One range is coincident with the rise of agriculture, from 7100 to 10,400 years ago (Carroll et al., 2013; Li and Chen, 2014; Suzuki and Gojobori, 1997). The other range is from the Middle Pleistocene 155,000 years ago (Negredo et al., 2011) or from the orthologous filovirus EVEs, which have been described in mouse and rat genomes. These data yield a minimum age of 30 million years for the family *Filoviridae* (Belyi et al., 2010; Taylor et al., 2010). A leading example is foamy viruses, complex retroviruses that infect a variety of placental mammals (Wu et al., 2012). Initially, a comparison of the phylogenies of simian foamy viruses and OW primates suggested that they co-specified with each other for

>30 million years (Switzer et al., 2005). However, the recent discovery of endogenous foamy virus-like elements in the genome of the coelacanth (*Latimeria chalumnae*) suggests that foamy viruses and their vertebrate hosts likely codiverged >407 million years ago (Han and Worobey, 2012).

5. Conclusion

An important question in the arenaviruses, bunyaviruses and novel related lineages—and the source of considerable debate—is the evolutionary history of the events discussed here. Our results highlight the remarkable relation among these viral supergroups of different genome organizations. Our study suggests that the best scenario is the existence of at least three monophyletic supergroups, all of them well supported. The first bunya-like virus supergroup is composed of emaraviruses, feraviruses, jonviruses, hantaviruses, herbevirus, orthobunyaviruses, phasmaviruses and tospoviruses. The arena-nairo-like supergroup exhibited a statistically supported monophyletic cluster, reinforcing the inclusion of arenaviruses in the bunyavirus group. This notable phylogenetic relationship can be the answer for mammarenaviruses without a defined mammalian reservoir, which can be found in arthropods. Lastly, a phlebo-like virus supergroup arises, formed by goukoviruses, phasmaviruses, phleboviruses, tenuiviruses and the divergent group of viruses not assigned to a genus. An important piece of evidence revealed by our phylogenetic analyses was the absence of a particular stem lineage trend for the *Emaravirus*, *Tospovirus* and *Tenuivirus* genera (plant pathogenic viruses). Accordingly, in order to learn the evolutionary relationship between segmented viruses of the three supergroups, and because of the wide diversity (genome organizations, replication strategy, hosts and among others), we named them “bunya-like viruses”. The recent data reinforce that these viruses are evolutionarily and genetically interconnected. While these supergroups appear to be closely related in our phylogenetic analysis (molecular clock-rooted), other viruses should be investigated in future research. Our results also provide insights into the classification scheme, thereby providing a new perspective about the fundamental questions of family origins, diversity and genome evolution.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.019>.

Competing interests

No competing financial interests exist. The authors have no conflicts of interest or disclosures to make concerning this work.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: AG. Performed the experiments: AG CGS. Analyzed the data and interpretation: AG RCO JF ERS CGS. Wrote the paper: AG CGS. Revised the manuscript: AG RCO JF ERS CGS.

References

- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55:539–552. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150600755453>.
- Armstrong, C., Lillie, R.D., 1934. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Rep.* 49, 1019–1027.
- Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M., 2010. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate Genomes. *PLoS Pathog.* 6:1–13. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001030>.
- Bennett, S.N., Gu, S.H., Kang, H.J., Arai, S., Yanagihara, R., 2014. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses. *Trends Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.008>.
- Bodewes, R., Kik, M.J.L., Stalin Raj, V., Schapendonk, C.M.E., Haagmans, B.L., Smits, S.L., Osterhaus, A.D.M.E., Raj, V.S., Schapendonk, C.M.E., Haagmans, B.L., Smits, S.L., Osterhaus, A.D.M.E., 2013. Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes

- with inclusion body disease in The Netherlands. *J. Gen. Virol.* 94:1206–1210. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.051995-0>.
- Briese, T., Paweska, J.T., McMullan, L.K., Hutchison, S.K., Street, C., Palacios, G., Khristova, M.L., Weyer, J., Swanepoel, R., Egholm, M., Nichol, S.T., Lipkin, W.I., 2009. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* 5, e1000455. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000455>.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T., 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25: 1972–1973. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.
- Carroll, S.A., Towner, J.S., Sealy, T.K., McMullan, L.K., Khristova, M.L., Burt, F.J., Swanepoel, R., Rollin, P.E., Nichol, S.T., 2013. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 87:2608–2616. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03118-12>.
- Carter, S.D., Surtees, R., Walter, C.T., Ariza, A., Bergeron, É., Nichol, S.T., Hiscox, J.A., Edwards, T.A., Barr, J.N., 2012. Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 86:10914–10923. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01555-12>.
- Chang, J.-M., Di Tommaso, P., Lefort, V., Gascuel, O., Notredame, C., 2015. TCS: a web server for multiple sequence alignment evaluation and phylogenetic reconstruction: figure 1. *Nucleic Acids Res.* 43:W3–W6. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv310>.
- Chang, J.M., Di Tommaso, P., Notredame, C., 2014. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 31:1625–1637. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu117>.
- Charrel, R.N., de Lamballerie, X., 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 140:213–220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.027>.
- de Oliveira, R.C., Guterres, A., Fernandes, J., D'Andrea, P.S., Bonvicino, C.R., de Lemos, E.R.S., 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses* 6:1929–1973. <http://dx.doi.org/10.3390/v6051929>.
- Delgado, S., Erickson, B.R., Agudo, R., Blair, P.J., Vallejo, E., Albariño, C.G., Vargas, J., Comer, J.A., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Olson, J.G., Nichol, S.T., 2008. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000047>.
- Dolja, V.V., Koonin, E.V., 2011. Common origins and host-dependent diversity of plant and animal viromes. *Curr. Opin. Virol.* 1:322–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.007>.
- Downs, W.G., Anderson, C.R., Spence, L., Aitken, T.H., Greenhall, A.H., 1963. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 640–646.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>.
- Dudas, G., Obbard, D.J., 2015. Are arthropods at the heart of virus evolution? *Elife* 9. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.06837>.
- Elliot, R.M., Schmaljohn, C., 2013. Bunyaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields's Virology*. Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA, pp. 1244–1282.
- Elliott, R.M., 2009. Bunyaviruses and climate change. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:510–517. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02849.x>.
- Elliott, R.M., 2014. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:673–685. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3332>.
- Feschotte, C., Gilbert, C., 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat. Rev. Genet.* 13:283–296. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3199>.
- Frey, K.G., Biser, T., Hamilton, T., Santos, C.J., Pimentel, G., Mokashi, V.P., Bishop-lilly, K.A., 2016. Bioinformatic characterization of mosquito viromes within the Eastern United States and Puerto Rico: discovery of novel viruses. *Evol. Bioinforma.* 12:1–12. <http://dx.doi.org/10.4137/EBO.S38518.TYPE>.
- Gallaher, W.R., DiSimone, C., Buchmeier, M.J., 2001. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol.* 1:1. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-1-1>.
- Geuking, M.B., Weber, J., Dewannieux, M., Gorelik, E., Heidmann, T., Hengartner, H., Zinkemagel, R.M., Hangartner, L., 2009. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. 323, 393–396.
- Gonzalez, J.P., Bowen, M.D., Nichol, S.T., Rico-Hesse, R., 1996. Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology* 221:318–324. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1996.0381>.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- Guo, W.-P., Lin, X.-D., Wang, W., Tian, J.-H., Cong, M.-L., Zhang, H.-L., Wang, M.-R., Zhou, R.-H., Wang, J.-B., Li, M.-H., Xu, J., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2013. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* 9, e1003159. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>.
- Guterres, A., Oliveira, R.C.D., Fernandes, J., De Lemos, E.R.S., 2015. Is the evolution of Hantavirus driven by its host? *Infect. Genet. Evol.* 35:142–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.002>.
- Guu, T.S.Y., Zheng, W., Tao, Y.J., 2012. Bunyavirus: structure and replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726:245–266. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_11.
- Han, G.Z., Worobey, M., 2012. An endogenous foamy-like viral element in the coelacanth genome. *PLoS Pathog.* 8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002790>.
- Hetzl, U., Sironen, T., Laurinmäki, P., Liljeroos, L., Patjas, A., Henttonen, H., Vaheri, A., Artelt, A., Kipar, A., Butcher, S.J., Vapalahti, O., Hepojoki, J., 2013. Isolation, identification, and characterization of novel arenaviruses, the etiological agents of bovid inclusion body disease. *J. Virol.* 87:10918–10935. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01123-13>.
- Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2015. The evolution and emergence of hantaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 10:27–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.007>.

- Home, K.M., Vanlandingham, D.L., 2014. Bunyavirus–vector interactions. *Viruses* <http://dx.doi.org/10.3390/v6114373>.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, I., 2016. Bunyavirales. URL https://talk.ictvonline.org/files/proposals/animal_dsrna_and_srna_viruses/m/animal_rna_minus_under_consideration/6398.
- Johnson, W.E., 2010. Endless forms most viral. *PLoS Genet.* 6, e1001210. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001210>.
- Junglen, S., 2016. ScienceDirect evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses – a case study in the family Bunyaviridae. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16:81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.017>.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772–780. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Katzourakis, A., 2013. Paleovirology: Inferring Viral Evolution From Host Genome Paleovirology: Inferring Viral Evolution From Host Genome Sequence Data.
- Katzourakis, A., Gifford, R.J., 2010. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* 6, e1001191. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001191>.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carsten, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- Kuhn, J., Wiley, M., Rodriguez, S., Bao, Y., Prieto, K., Travassos da Rosa, A., Guzman, H., Savji, N., Ladner, J., Tesh, R., Wada, J., Jahrling, P., Bente, D., Palacios, G., 2016. Genomic Characterization of the Genus Nairovirus (Family Bunyaviridae). *Viruses* 8:164. <http://dx.doi.org/10.3390/v8060164>.
- Li, Y.H., Chen, S.P., 2014. Evolutionary history of Ebola virus. *Epidemiol. Infect.* 142: 1138–1145. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268813002215>.
- Li, C.X., Shi, M., Tian, J.H., Lin, X.D., Kang, Y.J., Chen, L.J., Qin, X.C., Xu, J., Holmes, E.C., Zhang, Y.Z., 2015. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife* 4:1–26. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05378>.
- Marklewitz, M., Zirkel, F., Kurth, A., Drosten, C., Junglen, S., 2015. Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:1–6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1502036112>.
- Messina, J.P., Pigott, D.M., Golding, N., Duda, K.A., Brownstein, J.S., Weiss, D.J., Gibson, H., Robinson, T.P., Gilbert, M., William Wint, G.R., Nuttall, P.A., Gething, P.W., Myers, M.F., George, D.B., Hay, S.I., 2015. The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* trv050. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trv050>.
- Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H.P., 2012. Emaravirus: A novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses* 4:1515–1536. <http://dx.doi.org/10.3390/v4091515>.
- Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F., Dopazo, H., Molero, F., Juste, J., Quetglas, J., Savji, N., de la Cruz Martínez, M., Herrera, J.E., Pizarro, M., Hutchison, S.K., Echevarría, J.E., Lipkin, W.I., Tenorio, A., 2011. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302:205–217. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
- Papadopoulos, J.S., Agarwala, R., 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23:1073–1079. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>.
- Pinschewer, D.D., Perez, M., de la Torre, J.C., 2003. Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J. Virol.* 77:3882–3887. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.6.3882-3887.2003>.
- Plyusnin, A., Elliot, R.M., 2011. Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology. Caister Academic Press, Norfolk.
- Plyusnin, A., Sironen, T., 2014. Evolution of hantaviruses: co-speciation with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.008>.
- Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L.M., Dong, H., Wallat, G.D., Ly, H., Liang, Y., Dong, C., 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468:779–783. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09605>.
- Radoshitzky, S.R., Bao, Y., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Clawson, A.N., Clegg, C.S., DeRisi, J.L., Emonet, S., Gonzalez, J.-P., Kuhn, J.H., Lukashevich, I.S., Peters, C.J., Romanowski, V., Salvato, M.S., Stenglein, M.D., de la Torre, J.C., 2015. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 160:1851–1874. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2418-y>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Rotenberg, D., Jacobson, A.L., Schneeweis, D.J., Whitfield, A.E., 2015. Thrips transmission of tospoviruses. *Curr. Opin. Virol.* 15:80–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003>.
- Sayler, K.A., Barbet, A.F., Chamberlain, C., Clapp, W.L., Alleman, R., Loeb, J.C., Lednický, J.A., Kuhn, J.H., 2014. Isolation of tacaribe virus, a caribbean arenavirus, from host-seeking amblyomma americanum ticks in Florida. *PLoS One* 9:1–16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115769>.
- Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T., 2007. Bunyaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Field's Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1741–1789.
- Shtanko, O., Imai, M., Goto, H., Lukashevich, I.S., Neumann, G., Watanabe, T., Kawaoka, Y., 2010. A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J. Virol.* 84:5415–5422. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02417-09>.
- Stenglein, M.D., Sanders, C., Kistler, A.L., Ruby, J.G., Franco, J.Y., Reavill, D.R., Dunker, F., Derisi, J.L., 2012. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. *MBio* 3, e00180-12–e00180-12. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00180-12>.
- Suzuki, Y., Gojobori, T., 1997. The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses. *Mol. Biol. Evol.* 14:800–806. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025820>.
- Switzer, W.M., Salemi, M., Shanmugam, V., Gao, F., Cong, M.-E., Kuiken, C., Bhullar, V., Beer, B.E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., Tooze, Z., Villinger, F., Holmes, E.C., Heneine, W., 2005. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* 434: 376–380. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03341>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Taylor, D.J., Leach, R.W., Bruenn, J., 2010. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol. Biol.* 10:193. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>.
- Vieth, S., Torda, A.E., Asper, M., Schmitz, H., Günther, S., 2004. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* 318:153–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.009>.
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 86:10999–11012. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01394-12>.
- Zapata, J.C., Salvato, M.S., 2013. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. *Viruses* 5:241–278. <http://dx.doi.org/10.3390/v5010241>.

4.2. ESTUDOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS EM POPULAÇÕES RURAIS

As amostras de soro foram incluídas no estudo para a realização do objetivo 3.2.3, após aprovação do comitê de ética em pesquisa humana do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz do projeto sob o título: “*Infecção por robovírus e rickettsias lato sensu em diferentes populações rurais do Brasil*”, sob o número CAAE 61629416.2.1001.5248 (Anexo 9.3). Todas as amostras foram encaminhadas para o LHR pelos pesquisadores e instituições parceiras que desenvolveram projetos de pesquisa com populações rurais em regiões de interesse como discriminadas a seguir:

a) 206 amostras de soro de residentes do assentamento rural Ramal do Granado, localizado no Acre, do projeto intitulado “*Dinâmica de transmissão da dengue e outras arboviroses em área rural e seus determinantes: estudo longitudinal na Amazônia ocidental brasileira*” sob a coordenação do Dr. Marcelo Urbano da Universidade de São Paulo, Dr^a. Monica da Silva Nunes da Universidade Federal do Acre com a colaboração da Dr^a. Claudia Lamarca Vitral da Universidade Federal Fluminense;

b) 466 amostras de soro de indivíduos participantes do projeto: “*Epidemiologia das hepatites virais em assentados em Goiás*”, sob a coordenação da Dr^a. Sheila Araújo Teles e colaboração da Dr^a. Regina Maria Bringel Martins, da Universidade Federal de Goiás;

c) 108 amostras de população rural do estado do Mato Grosso do projeto “*Aspectos Epidemiológicos Da Malária No Estado De Rondônia No Período De 2010 A 2014, Com Ênfase No Tempo Decorrido Entre O Início Dos Sintomas E O Tratamento Dos Pacientes*”, sob a coordenação do Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso e parceria com a Dr^a. Ana Claudia Pereira Terças da Universidade Estadual do Mato Grosso;

d) 319 amostras de soro de população quilombola do estado do Mato Grosso do Sul do projeto: “*Aspectos epidemiológicos e moleculares das hepatites A, B, C, Delta, E e dos vírus HIV e HTLV em afro-descendentes de Mato Grosso do Sul*”, coordenado pela Dr^a. Ana Rita Coimbra Motta de Castro Fiocruz Mato Grosso do Sul e Bárbara Vieira Lago Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

4.2.1. Artigo 7 - Silent arenavirus infection in individuals living in Colniza, Mato Grosso, Brazil

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.3.** Pesquisar a ocorrência de infecções por mammarenavírus em diferentes populações, consideradas de risco, em regiões onde a circulação desses vírus em roedores tenha sido confirmada.

Objetivo específico:

- ✓ Realizar inquéritos sorológicos em populações de agricultores familiares e em populações residentes em ambientes de interface rural e silvestre;
- ✓ Descrever aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por mammarenavírus.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.

Fator de Impacto da Revista: 1,1

Referência: Fernandes J, Coelho TA, Oliveira RC, Guterres A, Oliveira EC, Terças ACP, Levis SC, Fontes CJF, Atakana M, Lemos ERS. Silent arenavirus infection in individuals living in Colniza, Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018, 51(6): 881-882.

Silent arenavirus infection in individuals living in Colniza, Mato Grosso, Brazil

**Jorlan Fernandes^[1], Thayssa Alves Coelho da Silva^[1], Renata Carvalho de Oliveira^[1],
Alexandro Guterres^[1], Elaine Cristina de Oliveira^{[2],[3]}, Ana Claudia Pereira Terças^[4],
Silvana C. Levis^[5], Cor Jesus Fernandes Fontes^[2], Marina Atakana^[2],
Elba Regina Sampaio de Lemos^[1]**

- [1]. Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
[2]. Hospital Universitário Julio Müller, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.
[3]. Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.
[4]. Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra, MT, Brasil.
[5]. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Argentina.

Dear Editor,

More than half of all the infectious diseases that affect humans have a zoonotic origin, and as anthropogenic impacts on ecosystems accumulate, the threat of zoonotic disease grows¹. The exploitation of forests for timber and mining of gold and other minerals in Brazil has multiple environmental impacts including the associated deforestation, migration of populations, dramatic demographic growth, and sudden changes in the socioeconomic structure². This has been highlighted by articles published in the *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*²⁻⁵. However, we have observed that most of these studies addressing health concerns are focused on malaria, with relatively little attention given to other potential diseases, many of which might be misdiagnosed as malaria.

Arenavirus hemorrhagic fever is a severe emerging disease characterized by systemic and neurological disorders with high lethality rates in South America, where, to date, five species of mammarenavirus have been associated with human disease: Machupo and Chapare (Bolivia), Junín (Argentina), Guanarito (Venezuela), and Sabiá (Brazil) viruses⁶. In Brazil, little is known about this rodent-borne infection; only one fatal case of Brazilian hemorrhagic fever was described in the 1990s, and two other cases of nonfatal laboratory-acquired infections were subsequently confirmed^{6,7}.

We conducted a study to estimate the prevalence of anti-arenavirus antibodies among individuals living in Três Fronteiras district, Colniza municipality, Mato Grosso state, Brazil. The

study region is divided into three distinct community clusters, according to occupational activity: (i) mining (where mining companies are concentrated); (ii) extraction and processing of wood; and (iii) village (where subsistence trade predominates). This region has no basic sanitation, electricity or access to other basic amenities. Between 2000 and 2007, Colniza presented one of the highest population growth rates in the period – 15.3%. The municipality has also presented high rates of deforestation, having been identified as one of the top cities responsible for the deforestation of the Amazon rainforest⁸.

One hundred and eight (108) serum samples from a malaria survey conducted in 2013 were tested for anti-mammarenavirus IgG antibodies using ELISA according to Riera et al. (1997)⁹ at a 1:100 dilution. Demographic and socioeconomic data were collected during randomized home visits conducted in July 2013 among individuals living in Três Fronteiras district, Colniza municipality via the administration of a structured questionnaire to respondents. The study was approved by the Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz Ethical Committee (protocol no. CAAE 61629416.2.1001.5248).

Most of the participants were male (63/108, 58.3%), the mean age was 29 (range: 1–66) years and 67.6% (73/108) self-declared as brown/*pardo* (mixed race). More than half of the study population (81/108, 75.0%) had received <5 years of formal education (elementary school level in Brazil). The main reported work activities were temporarily activities involving mining or agriculture (74/108, 68.5%), followed by vegetal exploration (21/108, 19.1%), and housekeeping (13/108, 12.5%).

Of 108 samples, two (1.85%) tested positive for anti-mammarenavirus IgG; both were females (1- and 35-years-old) and lived in houses made of wood, with daily activities related to housekeeping. Neither of these had current acute malaria infection or known comorbidities. Arenavirus infection can occur in different age groups, as shown by

Corresponding Author: Jorlan Fernandes.
e-mail: jorlan@ioc.fiocruz.br
Received 25 February 2018
Accepted 20 September 2018



Maiztegui (1975)¹⁰, although most infections caused by South American arenaviruses are reported in individuals between 15 and 40 years old¹⁰. Regarding studies conducted in Latin America, higher IgG rates have been reported in an indigenous population from Colombia (3.1%)¹¹. However, lower prevalence rates (0.5%)¹² were reported in convalescent sera obtained from 220 non-malarial febrile patients from the northern coast of Colombia. The prevalence found in this study was similar to that observed in a study conducted by Machado et al. (2010)¹³, in which five individuals (5/343, 1.4%), also from Mato Grosso state, had antibodies against arenavirus. Recently, in our previous study, we have demonstrated the circulation of arenavirus in *Calomys callidus* rodents in the same region¹⁴. Although the arenavirus detected in these rodents is unrelated to the human disease, it is important to highlight the increasing evidence of arenavirus infections in humans and rodents in Mato Grosso state^{13,14}.

Mining activities and wood exploitation create ecological changes that can contribute to diversity loss and dislocation of wild animals, resulting in frequent contact between humans and rodent reservoirs in various settings (not only at the workplace but also in human habitations, as evidenced by our results). A similar scenario involving deforestation and sociodemographic changes was described during the emergence of Junín and Guanarito viruses in Argentina and Venezuela, respectively⁶. Furthermore, three arenaviruses have been detected in the Brazilian Amazon region: Amapari, Cupixi and Flexal viruses, the latter being implicated in mild disease due to laboratory-acquired infection^{6,13}.

Individuals living in areas under the influence of mining settlements and wood exploitation enterprises should be included as a population at risk for arenaviruses, and potentially for other zoonotic infections that occur in the Amazon region. Thus, serological surveys can be helpful when addressing potential hazards associated with arenavirus infections driven by the socio-environmental effects of mining and related activities.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge Alba Valéria Gomes de Melo of Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso, Cuiabá, MT – Brazil for her collaboration.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

This research was supported by FIOCRUZ, *Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, Universidade Federal de Mato Grosso, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso*, proposal nº 005-2015, grant

number 219718/2015, *Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, grant number 404762/2016-6.

REFERENCES

1. Wood C. Environment. Environmental change and the ecology of infectious disease. *Science*. 2014;(6214)346:1192.
2. Duarte EC, Fontes CJF. Associação entre a produção anual de ouro em garimpos e incidência de malária em Mato Grosso - Brasil, 1985-1996. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(6):665-8.
3. Couto AA, Calvosa VS, Lima JE, Souza JM. Evolução da resistência in vitro do *Plasmodium falciparum* a antimaláricos em área de prospecção de ouro no Estado do Amapá, entre 1983 e 1990. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1993;26(4):215-20.
4. Silbergeld EK, Nash D, Trevant C, Strickland G.T, Souza JM, Silva RSU. Mercury exposure and malaria prevalence among gold miners in Pará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):421-9.
5. Santos VR, Yokoo EM, Souza-Santos R, Atanaka-Santos M. Fatores socioambientais associados à distribuição espacial de malária no assentamento Vale do Amanhecer, Município de Juruena, Estado de Mato Grosso, 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):47-53.
6. Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol*. 2015;160(7):1851-74.
7. Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LTM, Ferreira IB, Rocco IM, et al. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet*. 1994;343(8894):391-2.
8. Maciel GBML, Espinosa MM, Atanaka-Santos M. Epidemiologia da malária no município de Colniza, Estado de Mato Grosso, Brasil: estudo descritivo do período de 2003 a 2009. *Epidemiol. Serv Saúde*. 2013;22(3):465-74.
9. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol*. 1997;41(6):305-10.
10. Maiztegui JI. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull World Health Organ*. 1975;52(4-6):567-75.
11. Restrepo B, Rodas JD, Montoya-Ruiz C, Zuluaga AM, Parra-Henao G, Agudelo-Flórez P. Serological evidence of *Leptospira* spp., dengue, hantavirus and arenavirus infection in Embera-Katio indigenous population, Colombia. *Rev Chilena Infectol*. 2016;33(4):472-3.
12. Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Urabá (Antioquia), Colombia. *Biomedica*. 2013;33(1):99-107.
13. Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(3):229-33.
14. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Barreto-Vieira DF, Terças ACP, Teixeira BR, et al. Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop*. 2018;179:19-24.

4.2.2. Artigo 8 - Arenavirus and hantavirus survey in rural population from Acre: Neglected treats from Brazilian Amazon

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.3.** Pesquisar a ocorrência de infecções por mammarenavírus em diferentes populações, consideradas de risco, em regiões onde a circulação desses vírus em roedores tenha sido confirmada.

Objetivo específico:

- ✓ Realizar inquéritos sorológicos em populações de agricultores familiares e em populações residentes em ambientes de interface rural e silvestre;
- ✓ Descrever aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por mammarenavírus.

Situação do manuscrito: Artigo submetido ao periódico *The Journal of Infection in Developing Countries*.

Fator de Impacto da Revista: 1,3

Referência: Fernandes J, Coelho TA, Oliveira RC, Guterres A, Vitral CL, de Oliveira JM, Silva-Nunes M, Horta MA, Levis SC, Ferreira MU, Lemos ERS. Arenavirus and hantavirus survey in rural population from Acre: Neglected treats from Brazilian Amazon. *J Infect Develop Count*, 2018.

Arenavirus and hantavirus survey in rural population from Acre: Neglected treats from Brazilian Amazon

Jorlan Fernandes^{1*}, Thayssa Alves Coelho¹, Renata Carvalho de Oliveira¹, Alexandro Guterres¹, Claudia Lamarca Vitral², Jaqueline Mendes de Oliveira³, Mônica da Silva Nunes⁴, Marco Aurélio Horta⁵, Silvana C. Levis⁶, Marcelo Urbano Ferreira⁷, Elba Regina Sampaio de Lemos^{1*}

¹Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

²Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, Brasil

³Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

⁴Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Acre, Rio Branco - AC, Brasil

⁵Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

⁶Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Argentina

⁷Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

* **Corresponding Author:** Elba Regina Sampaio de Lemos and Jorlan Fernandes, Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil; Fax & Tel: +55 21 2562-1727; email: elba.lemos@ioc.fiocruz.br, jorlan@ioc.fiocruz.br.

Running title: Arenaviruses and hantaviruses in rural population from Amazon

Key words: Hantavirus, Arenavirus, Amazon, rural settlers, zoonosis

Dear Editor,

The Amazon region (Amazon River Basin) is a vast territory encompassing parts of nine South American countries, including a large portion of Brazil. The region also contains the largest tropical rainforest in the world, with a climate characterized by high temperatures, humidity and copious rainfall, and the densest and most varied ecosystem in the world [1].

Demographic density in the Amazon region of Brazil is low (4.7 persons/km²) and many areas are nearly bereft of healthcare facilities. Paradoxically, an intense urbanization process is taking place in the region [1,2]. Since the 1970s, Brazilian government has been creating rural settlements in the Amazon, where subsistence agriculture and farming are the main economic activities.

Brazilian Amazon region have favorable conditions for the transmission of numerous tropical diseases, which pose particular risks for populations exposed to precarious housing and working conditions [2]. Nevertheless, few studies have address rodent-borne diseases (arenavirus and hantavirus) as potential hazard to individuals in this region, although human and rodent infections have been reported in North Brazil, mostly related to hantavirus [3,4,5,6,7]. The present study aimed to examine the seroprevalence of these emergent pathogens in a rural population in a Brazilian Western Amazonian region.

The examined area is collectively known as Ramal do Granada (9°41'S–9°49'S, 67°05'W–67°07'W), a sparsely populated rubber tapper settlement in Acrelândia municipality in the state of Acre, that became part of the Pedro Peixoto Agricultural Settlement Project. Blood samples were collected during a cross-sectional survey in 2004 and kept in -20 °C freezer [8]. In total, 206 serum samples were submitted for serological analysis, using ELISA assays according to the previous published protocol [9]. The results were used to analyze the data together with information gathered through a structured questionnaire [8]. The study has been approved by the Research Ethics Committee for Experimentation in Human Beings at the Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, as reported previously [8] and by Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Oswaldo Cruz Ethical Committee, number CAAE 61629416.2.1001.5248.

Aiming to test the association among variables, chi-square tests (X^2) were used to verify those variables that presented a relationship with the outcome variable (positivity for Arenavirus IgG) in order to perform a modeling process. Univariate logistic regression analyzes should be performed between serology results and those other variables that demonstrated association with the outcome by chi-square analysis. Data analysis was performed using the statistical package R (version 3.1.1).

The age of the 206 individuals included in this study ranged from few months to 90 years (24.43 median years). Most of the participants were female 51.5% (106), farmers 28.6% (59) or students 28.2% (58) living in houses made of wood 82.5% (170) and have no access to sewerage system and garbage collection. Variables are presented on Table 1.

Table 1. Arenavirus seropositivity and Chi-square test (*p-value*) per categorical variable in Ramal do Granada population, Acre, Brazil.

Categorical variable	Number of subjects (%)	Seropositivity (%) (95% CI)	X² p-value
Age			<i>0.10</i>
<12	62 (30.1)	0 (0.0)	
13-17	25 (12.1)	2 (8.0) (2.2-25.0)	
18-30	51 (24.8)	3 (5.9) (2.0-15.9)	
>31	68 (33.0)	1 (1.5) (0.3-7.9)	
Sex			<i>0.44</i>
Women	106 (51.5)	4 (3.8) (1.5-9.3)	
Men	100 (48.5)	2 (2.0) (0.6-7.0)	
Time of residence in the land			<i>0.38</i>
< 5 years	69 (33.5)	2 (2.9) (0.8-10.0)	
6 – 15 years	80 (38.8)	1 (1.2) (0.2-6.7)	
> 16 years	57 (27.7)	3 (5.3) (1.8-14.4)	
House material			<i>0.52</i>
Brick	15 (7.3)	0 (0.0)	
Straw	21 (10.2)	0 (0.0)	
Wood	170 (82.5)	6 (3.5) (1.6-7.5)	
Sewage			<i>0.52</i>
Septick tank	22 (10.7)	0 (0.0)	
Open trench	170 (82.5)	6 (3.5) (1.6-7.5)	
Other	14 (6.8)	0 (0.0)	
Main activity developed on the property			<i>0.94</i>
Agriculture	44 (21.4)	1 (2.3) (0.4-11.8)	
Cattle raising	134 (65.0)	4 (3.0) (1.2-7.4)	
None	28 (13.6)	1 (3.6) (0.6-17.7)	
Pets on the property			<i>0.45</i>
No	17 (8.3)	0 (0.0)	
Yes	189 (91.7)	6 (3.2) (1.5-6.8)	
Hunting and fishing			<i>0.35</i>
No	70 (34.5)	1 (1.4) (0.3-7.7)	
Yes	133 (65.5)	5 (3.8) (1.6-8.5)	
Profession			<i>0.57</i>
Farmer	59 (28.6)	1 (1.7) (0.3-9.0)	
Housekeeping	35 (17.0)	2 (5.7) (1.6-18.6)	
Student	58 (28.2)	2 (3.4) (1.0-11.7)	
Education worker	12 (5.8)	1 (8.3) (1.5-35.4)	
Other school activities ^a	28 (13.6)	0 (0.0)	
Other ^b	14 (6.8)	0 (0.0)	

a Includes teachers and school staff (cleaners and cooks).

b Including all occupations with fewer than three mentions.

None of the individuals had antibodies against hantavirus. However, studies conducted in Amazon region have demonstrated low prevalence ratios 1.1% and 0.8% in Amazon basin rural populations from Peru and Brazil, respectively [3,10]. The low seroprevalence to hantavirus observed in these studies was attributed to low agricultural activity on these particular regions, as seen in here where the main activity was cattle raising (Table 1). Evidences of hantavirus circulations in wild rodents, *Oligoryzomys microtis* and *Proechimys cuvieri*, have been found in Acre state, although no Hantavirus Pulmonary Syndrome cases have been identified yet [7]. Therefore, more studies need to be conducted in the state to evaluate the impact of hantavirus infections in humans and rodents.

Arenavirus antibodies were detected in six subjects, with an overall IgG seroprevalence rate of 2.91% detected in young and adults individuals ranging from 16 to 36 years old. The seropositivity rate was slightly higher in females (3.8%) than males (2.0%). It is worthy to mention that five of six individual with antibodies against arenavirus mentioned hunting and fishing for subsistence. No significant association was found between arenavirus seropositivity and work activities or other variables (Table 1), probably because of the low seroprevalence ratio, although the prevalence observed was higher than those found in other studies conducted in Brazil [5].

To date only one case of Brazilian hemorrhagic fever was described, which was caused by Sabiá mammarenavirus, in São Paulo, southeastern Brazil [11,5]. However, four arenavirus have been identified in rodents during surveys conducted in Amazon region from Brazil: Amapari (*Neacomys guianae*), Cupixi (*Hylaeamys megacephalus*), Flexal (unidentified oryzomyini) and recently Latino viruses, demonstrating the potential for arenavirus emergence in this region [5,6].

Deforestation in the Pedro Peixoto settlement has increased over the last decades due to agriculture and the poor technology applied to farming, increasing both the contact between humans and wildlife and the probability of the emergence of infectious diseases [12]. The high prevalence of zoonotic infections reported by previous studies undertaken with Ramal do Granada inhabitants suggests that they are exposed to a wide variety of pathogens [8,12,13,14]. Many of these diseases, as dengue, yellow fever and malaria, responsible for hundreds of cases, could be easily misleading for arenavirus cases, especially considering many inequalities still exist with regard to access to healthcare services and to training and distribution of healthcare professionals, despite advances in the Brazilian public health system. Similar ecological and economic scenario was found during the emergence of Venezuelan Hemorrhagic fever, caused by Guanarito virus, firstly recognized during a dengue fever in Venezuela, when health authorities and physicians notice that “atypical” dengue

hemorrhagic cases which continued to occur at Portuguesa state, although cases have decreased all over the country [15].

Historically, the North and Northeast regions of Brazil, which include most of the Amazon River Basin, have the greatest social inequalities and the highest prevalence of infectious diseases [1,2,4]. Identification of human arenavirus infection in the Amazon Basin adds this emergent disease to differential diagnoses of febrile tropical diseases and urges for the inclusion of these viruses on the syndromic surveillance approach for febrile hemorrhagic diseases.

Further studies in the area are needed to understand the mechanism by which Amazon rural population is exposed to these zoonotic agents and to characterize the circulating arenavirus species responsible for human infections. The present study reinforces the necessity of supporting networks for promotion and protection of individual and collective health in states from Brazilian Amazon region, especially for measures concerning rodent-borne diseases.

Acknowledgment

This research was supported by FIOCRUZ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 404762/2016-6. The authors gratefully acknowledge Marcelo Alves Pinto (Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia – IOC/FIOCRUZ) for his collaboration.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Taail PL (2009) The Status of Infectious Disease in the Amazon Region. *Emerg Infect Dis* 15: 625.
2. Penna G, Pinto LF, Soranz D, Glatt R (2009) High Incidence of Diseases Endemic to the Amazon Region of Brazil, 2001–2006. *Emerg Infect Dis* 15:626-632.
3. Gimaque JBL, Bastos MS, Braga WSM, Oliveira CMC, Castilho MC, Figueiredo RMP, Galusso ES, Itapirema EF, Figueiredo LTM, Mourão MPG (2012) Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 135-137.

4. de Oliveira RC, Cordeiro-Santos M, Guterres A, Fernandes J, de Melo AX, João GA, Novais MA, Travassos da Rosa ES, Vasconcelos PF, Vilges de Oliveira S, de Albuquerque BC, de Lemos ER (2014) Rio Mamoré vírus and hantavírus pulmonar syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 20:1568-1570.
5. Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT (2010) Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:229-233.
6. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Barreto-Vieira DF, Terças ACP, Teixeira BR, da Silva MAN, Caldas GC, de Oliveira Coelho JMC, Barth OM, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ERS (2017) Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop* 179: 19-24.
7. Nunes ML, Oliveira SV, ElkhouryMR, Fonseca LX, Pereira SVC, Caldas EP, Guimarães JCN, Travassos da Rosa ES, Bonvicino CR, D'Andrea PS (2015) Evidência de circulação de hantavirus em área silenciosa da Região Amazônica. *Rev Pan-Amaz Saude* 6: 63-67.
8. da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, da Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, Ferreira MU (2008) Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg* 79:624-635.
9. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM (1997) Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol* 41:305-310.
10. Oré RMC, Forshey BM, Huaman A, Villaran MV, Long KC, Kochel TJ, Guevara C, Montgomery JM, Alvarez CA, Vilcarromero S, Morrison AC, Halsey ES (2012) Serologic Evidence for Human Hantavirus Infection in Peru. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 683-689.
11. Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LT, Ferreira I, Rocco IM, da Rosa AP, Vasconcelos PF, Pinheiro FP, LeDuc JW, Rico-Hesse R, Gonzalez JP, Jahrling PB, Tesh RB (1994) New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 12:391-392.
12. Mota BE, Trindade GS, Diniz TC, da Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, Rodrigues GO, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil (2010) *Arch Virol* 155:1139-1144.
13. da Silva-Nunes M, de Souza VA, Pannuti CS, Sperança MA, Terzian AC, Nogueira ML, Yamamura AM, Freire MS, da Silva NS, Malafronte RS, Muniz PT, Vasconcelos HB, da Silva EV, Vasconcelos PF, Ferreira MU (2008) Risk factors for dengue virus infection in rural Amazonia: population-based cross-sectional surveys. *Am J Trop Med Hyg* 79:485-494.

- 14.** Vitral CL, da Silva-Nunes M, Pinto MA, de Oliveira JM, Gaspar AM, Pereira RC, Ferreira MU (2014) Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. *BMC Infect Dis* 14:458.
- 15.** Salas R, de Manzione N, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, Betancourt A, Godoy O, Bruzual R, Pacheco ME, Ramos B (1991) Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 338:1033-1036.

4.2.3. Artigo 9 - Seroprevalence of rodent-borne viruses among Afrodescendant Communities from Brazil

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.3.** Pesquisar a ocorrência de infecções por mamarenavírus em diferentes populações, consideradas de risco, em regiões onde a circulação desses vírus em roedores tenha sido confirmada.

Objetivo específico:

- ✓ Realizar inquéritos sorológicos em populações de agricultores familiares e em populações residentes em ambientes de interface rural e silvestre;
- ✓ Descrever aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por mamarenavírus.

Situação do manuscrito: Artigo a ser submetido à publicação no periódico *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

Fator de Impacto da Revista: 2,1

Referência: Fernandes J, Coelho TA, Oliveira RC, Guterres A, Guedes LSAS, Teixeira BR, Niel C, Levis SC, Lago BV, Castro ARCM, Lemos ERS. Seroprevalence of rodent-borne viruses among Afrodescendant Communities from Brazil. *Int J Environ Res Pub Health*. 2018.

Seroprevalence of rodent-borne viruses among Afrodescendant Communities from Brazil

Jorlan Fernandes^{1*}, Thayssa Alves Coelho¹, Renata Carvalho de Oliveira¹, Livia Stefânia Alves Lima Guedes², Bernardo Rodrigues Teixeira³, Christian Niel⁴, Silvana C. Levis⁵, Barbara Vieira Lago^{4,6}, Ana Rita Coimbra Motta de Castro^{2,7}, Elba Regina Sampaio de Lemos^{1*}

1 - Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 - RJ, Brasil; thayssa.coelho@hotmail.com (T.A.C.); reoliveira@ioc.fiocruz.br (R.C.O)

2 - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, CEP 79070-900 - MS, Brasil; lilima_sm@yahoo.com.br (L.S.A.L.G.)

3 - Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 - RJ, Brasil; brt@ioc.fiocruz.br (B.R.T.)

4 - Laboratório de Virologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 - RJ, Brasil; niel@ioc.fiocruz.br (C.N.)

5 - Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Monteagudo 2510, Pergamino, Argentina; slevis0@yahoo.com (S.C.L)

6 - Laboratório de Hepatites Virais, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, CEP 21040-360 - RJ, Brasil; barbaravl@ioc.fiocruz.br (B.V.L.)

7 - Fundação Oswaldo Cruz, Mato Grosso do Sul, Campo Grande, CEP 79.081-746 - MS, Brasil; anacastro@fiocruz.br (A.R.C.M.C.)

* **Corresponding authors:** Elba Regina Sampaio de Lemos elba.lemos@ioc.fiocruz.br and Jorlan Fernandes jorlan@ioc.fiocruz.br, phone: +55 21 2562-1727.

Keywords

Afrodescendant communities, Arenavirus, Hantavirus, Rodent-borne diseases, zoonosis, vulnerability, quilombolas

Abstract: Many African migrants came to the American continent as slaves. Historically, some escaped from gold mines and farms, setting in remote valleys, as main actions of resistance to the slave system. These runaway-slave descendant communities are called *quilombos*, a group with distinct ethnic-racial identity, specific behavioral, including geographic isolation and conservative habits. The objective was to investigate the prevalence of rodent-borne viruses in two afro-descendant communities from Mato Grosso do Sul state, Brazil. A total of 319 individuals from Furnas do Dionísio and São Benedito/Tia Eva were enrolled, 12 (3.76%) had anti-rodent-borne viruses and the prevalence by community varied from 2.40% (3/125) to 4.50% (9/194). Seven (2.19%) were anti-arenavirus reactive, and 9 (2.82%) had anti-hantavirus antibodies. The literature includes limited data on the health of *quilombola* communities, but all works emphasized the importance of conducting research involving this social group, given the disparity in local healthcare attention to these communities compared to the general population. The findings resulting from this work allows to verify the vulnerability and the still precarious health conditions of *quilombola* groups, especially those from rural areas. Thus, this study points to the need of measures to prevent and improve the health access for this ethnic group.

Rodent-borne diseases have been a global health concern, since the discovery of an increase in the number of different pathogens whose cycles depend on rodents in many ways [1]. Moreover, global climate change and transitions in human settlement patterns are linked as one of the main drivers of the increased problems with rodent-borne pathogens, especially in developing countries [1,2,3].

Hantaviruses and arenaviruses are naturally occurring viruses of rodents, and human infections are classic examples of emerging diseases due to encroachment of sprawling urban, agricultural, and cattle-raising areas into habitats of rodents [1,3,4]. These two distinct groups of negative-stranded RNA viruses are associated with different species of rodent host of the family Muridae [5]. The infected host sheds virus into the environment in urine, feces and saliva, humans become infected by the inhalation of aerosolized virus particles [4,5].

Brazil has very diverse rural populations that represent about 36% of the entire country, including settlers and *campesinos*, indigenous people, extractivists and family farmers and *quilombolas* (afrodescendant communities) [6].

Many African migrants came to the American continent as slaves. Historically, some escaped from gold mines and farms, settling in remote valleys, as main actions of resistance to the slave system [7,8]. These runaway-slave descendant communities are called *quilombos* since their establishment in early times during colonization of South American countries [9]. Groups with distinct ethnic-racial identity, specific behavioral features, including geographic isolation and conservative habits, inhabit these territories [7,8].

In Brazil, there are 2,474 communities (13,087 families) whose history and tradition allows them to be identified as remnants of *quilombos*, 77% located in rural areas, where the main activities are based on family farming and extractivism [10,6,8]. Thus, low access to health services, education, electrical light, sanitation are still issues faced by some *quilombola* communities [8]. The objective of the present study was to investigate the prevalence of rodent-borne viruses (hantavirus and arenavirus) IgG antibodies and the association with demographic variables and risk factors in two afro-descendant communities in Mato Grosso do Sul state, Midwestern Brazil.

Mato Grosso do Sul state has 22 *quilombola* communities composed by approximately 441 families. Furnas do Dionísio a rural *quilombo*, the largest in the state, with 1018.27 hectares, placed in the Jaraguari municipality, and formed by about 100 families [10]. The economy is based on subsistence agriculture, production of vegetables, flour and sugar cane derivative and livestock. São Benedito / Tia Eva an urban *quilombola* community, constituting a neighborhood of Campo Grande (capital of Mato Grosso do Sul state), which has approximately 97 families [10]. Many are employed in urban jobs and, because of this

specificity of being an urban black community, the conflicts and problems existing in the community make it different from the others [10]. This study was approved by Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz Ethical Committee, number CAAE 61629416.2.1001.5248 and by the Research and Ethics Committee of Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, number CAAE 35103214.0.1001.0021.

Fisher exact's test were undertaken to evaluate risk factors associated with hantavirus and arenavirus infections (defined as IgG reactivity for one or both viruses). Statistical significance was assessed at the 0.05 probability level in all analyses. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (IC 95%) were also estimated. Statistical evaluations were performed using the statistical package R (version 3.4.3).

A total of 319 individuals, 189 participants from Furnas dos Dionísios and 130 from São Benedito/Tia Eva were enrolled for this study, between June and December 2015. Serum samples were tested for IgG antibodies for hantavirus and arenavirus using antigens described by [11,12] and tested as follow. ELISA was performed in a 96-round-bottom-well-microplates (Thermo Scientific™) coated with 100 µl of the cell lysate diluted in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, one-half of the plate with the infected cell lysate (Junín mammarenavirus strain XJC13 or Maciel hantavirus strain #9) and the other half uninfected cell lysate (Vero C76 - ATCC® CRL-1587™). The plates were kept at 4°C overnight and then washed five times with 0.1% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) in PBS. The wells were then filled with 100 µl of diluted test sera, starting at 1:100 dilution in PBS with 0.1% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) and 5.0% skimmed milk (BD Difco™). The plates were incubated for 1 hour at 37°C, washed as previously and 100 µl of goat Anti-Human IgG peroxidase conjugated (Sigma-Aldrich®, USA) at 1:2000 dilution was placed in each well and incubated for 1 hour at 37°C. Plates were washed five times and 100 µl of ABTS™ substrate (Sigma-Aldrich®, USA) was added to the plates that were kept for 30 minutes at 37°C. Objective reading of ELISA results was performed by determination of absorbencies at 405 and 450 nm. The cut off was determined by the mean optical densities (OD) of the negative controls plus three standard deviations at 1:100 dilution.

The population ranged in age from two to 89 years (average 34.44 years), 57.05% (182/319) were females and 42.95% (137/319) males. Most of these individuals had low education levels, 74.92% (239/319) had 1-9 years of formal education and 94,34% (300/319) receives less than three minimum wages (US\$330) per family per month, 71.47% (228/319) of the houses had no sewage system and 52.35% (167/319) no tap water service. Sociodemographic differences for both communities are shown on Table 1 and 2. Afrodescendant population, along with Amerindians, continues to be one of the most

disadvantaged, presenting higher rates of segregation, poverty, unemployment, illiteracy and migration, associated with less access to health services and environmental sanitation [8,13,14].

Table 1. Distribution of characteristic, prevalence of seropositivity, Odds Ratio (with Confidence Interval) and Fisher exact's test p-value for Furnas do Dionísio Afrodescendant community, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Furnas do Dionísio	N (%)	Seropositivity (%)	Odds Ratio (95% CI)	Fisher exact's test p-value
Age				0.07
<18	58 (30.69)	2 (3.45)		
18-40	62 (32.8)	1 (1.61)		
41-60	52 (27.51)	3 (5.77)		
>60	17 (8.99)	3 (17.65)		
Gender				
Women	103 (54.5)	4 (3.88)	1.52	0.73
Men	86 (45.5)	5 (5.81)	(0.39-5.87)	
Scholarity				0.55
< 1 year	15 (7.94)	1 (6.67)		
1 – 9 years	139 (73.54)	8 (5.76)		
10 – 12 years	31 (16.4)	0		
Higher education	4 (2.12)	0		
Monthly income				0.07
<1 minimum wage*	84 (44.44)	5 (5.95)		
1-3 minimum wages	102 (53.97)	3 (2.94)		
>3 minimum wages	3 (1.59)	1 (33.33)		
Occupation				0.69
Farmer	80 (42.33)	3 (3.75)		
Housewife	28 (14.81)	2 (7.14)		
Retired/Unemployed	8 (4.23)	1 (12.5)		
Student	47 (24.87)	2 (4.26)		
Work in school	5 (2.65)	0		
Child (non-school age)	6 (3.17)	0		
Construction	2 (1.06)	0		
Others	13 (6.88)	1 (7.69)		
Access to potable water			0.55	1.00
No	154 (81.91)	8 (5.19)	(0.01-4.38)	
Yes	34 (18.09)	1 (2.94)		
Sanitation			1.99	0.39
No	150 (79.37)	6 (4)	(0.30-9.87)	
Yes	39 (20.63)	3 (7.69)		

* minimum wage (US\$330)

Table 2. Distribution of characteristic, prevalence of seropositivity, Odds Ratio (with Confidence Interval) and Fisher exact's test p-value for São Benedito/Tia Eva Afrodescendant community, Mato Grosso do Sul, Brazil.

São Benedito/Tia Eva	N (%)	Seropositivity (%)	Odds Ratio (95% CI)	Fisher exact's test p-value
Age				0.31
<18	23 (17.69)	1 (4.35)		
18-40	52 (40)	0		
41-60	40 (30.77)	2 (5)		
>60	15 (11.54)	0		
Gender				
Women	79 (60.77)	1 (1.27)	3.15	0.56
Men	51 (39.23)	2 (3.92)	(0.16-189.95)	
Scholarity				0.67
< 1 year	8 (6.15)	0		
1 – 9 years	77 (59.23)	3 (3.9)		
10 – 12 years	40 (30.77)	0		
Higher education	5 (3.85)	0		
Monthly income				0.22
<1 minimum wage*	9 (6.98)	1 (11.11)		
1-3 minimum wages	105 (81.4)	2 (1.9)		
>3 minimum wages	15 (11.63)	0		
Occupation				0.61
Farmer	6 (4.62)	0		
Housewife	40 (30.77)	1 (2.5)		
Retired/Unemployed	13 (10)	0		
Student	20 (15.38)	1 (5)		
Work in school	10 (7.69)	0		
Child (non-school age)	3 (2.31)	0		
Construction	12 (9.23)	1 (8.33)		
Others	26 (20)	0		
Access to potable water				1.00
No	12 (9.23)	0		
Yes	118 (90.77)	3 (2.54)		
Sanitation			0.74	1.00
No	78 (60)	2 (2.56)	(0.01-14.69)	
Yes	52 (40)	1 (1.92)		

* minimum wage (US\$330)

Of the 319 individuals, 12 (3.76%) were positive for rodent-borne viruses, 7 (2.19%) were anti-arenavirus reactive, and 9 (2.82%) had anti-hantavirus antibodies; four samples were reactive for both viruses (1.25%). The prevalence by community varied from 2.40% (3/125) in São Benedito/Tia Eva to 4.50% (9/194) in Furnas do Dionísio, the difference was not statistically significant (p-value = 0.37; Odds ratio = 2.11; 95% CI = 0.56-7.97). Although expected, this difference is not always higher in rural population studies as we would suppose. Studies have demonstrated that urban population can be more exposed to rodent borne

diseases, resulting in higher prevalence [15]. A slight higher percentage of men were reactive 5.11% (7/137), while the prevalence in women was 3.29% (6/182). There was no job related activities shared between the seroreactive individuals, most of them were students (3/12), had activities related to housekeeping (3/12), agriculture (3/12) or were retired (1/12) or had other not specified activities (2/12).

Arenaviruses are the causative agent of South American hemorrhagic fevers in Argentina, Bolivia, Venezuela and Brazil, and produce hundreds cases annually, with a case-fatality ratio as high as 35% [4]. Only one case of Brazilian hemorrhagic fever was reported during the 90's, in Cotia city, São Paulo state, and the reservoir for Sabiá virus, is still unknown [15]. In a recent study, a sympatric occurrence of Latino and Oliveros arenaviruses in *Calomys callosus* and *Necromys lasiurus*, respectively was detected in two counties in Mato Grosso do Sul, Sidrolândia and Dois irmãos do Buriti [17]. Although there is no evidence of human disease caused by these viruses, the serological evidence shown here alongside with studies queried in different rural populations from Brazilian mid-west, where prevalence range from 1.80 (2/108) to 2.12% (3/141), raises the question if could these infections be caused by Latino and/or Oliveros viruses [18,19,20]. On the other hand, maybe another arenavirus could be involved in human infections in this region.

Interestingly, Andersen et al. 2012 [21] have demonstrated the evidence for positive selection in LARGE and interleukin 21 (IL21), two genes implicated in arenavirus infectivity and immunity. Their results suggest that natural selection may have targeted variants giving rise to alternative splicing or differential gene expression of LARGE and IL21 in West African populations. Overall, they support the hypothesis that selective pressures imposed by Lassa virus may have led to the emergence of particular alleles conferring resistance to Lassa fever, an endemic arenavirus hemorrhagic fever in West Africa [21]. Maybe some genetic trades herded from their ancestors may implicate in some degree of resistance of afrodescendant reminiscent in *quilombola* communities to arenavirus infections caused by some arenavirus, resulting in milder disease or even unapparent cases.

Hantavirus prevalence found in *quilombolas* in this present study is similar to those found in highly endemic areas for hantavirus pulmonary syndrome (HPS) as Santa Catarina 2.30% (6/257); 3.50% (12/340) [22,23] and São Paulo state 1.23% (7/567); 4.33% (47/1083) [24,25]. These values were higher than the one found for rural population from HPS nonendemic areas as Amazonas state 0.80% (1/122) to 0.90% (7/797) [15]. Mato Grosso Sul has been a silent area for hantavirus circulation for a long time, only in recent years (2012) the first human cases have been reported, and to data 7 cases of HPS were detected [26]. Hantavirus genotype responsible for HPS cases is still unknown. Nonetheless, Juquitiba virus

have been characterized in *Oligoryzomys matogrossae* (= *fornesi*) in Cassilândia municipality [27]. These rodents have peridomestic affinities, being captured in and around human habitations, what could contribute for human infections for those involved in housekeeping activities or that spent most part of the day indoors, children and elderly people [27, 28]. Highlighting exposure risk associated with less documented risk factors, such as women in slum and rural villages, as also shown by a sero-epidemiological of hantavirus in healthy people in rural and urban slum communities from Chile. A higher proportion of positive samples was found among individuals from rural villages (1.3%) and slums (1.5%) [28]. Seropositivity among other factors to householding occupations (homemaker, retired, or student) reinforces indoors as a possible local of infection.

The literature includes limited data on the health of *quilombola* communities, most are related to sexual transmitted infections, blood-borne pathogens and intestinal parasites, all emphasized the importance of conducting research involving this social group, given that there is a disparity in local healthcare attention to this population compared to the general population of Brazil [8,13,14,29,30,31,32]. In addition, the health service is still deficient despite actions to prevent and improve the community.

The findings resulting from this work allows to verify the vulnerability and the still precarious health conditions of *quilombola* groups, especially those from rural areas. Other factors related to the disability in the life quality of these families are the sanitary condition and the degradation of the environment, which, consequently, contributes to the emergence of diseases in these communities. Thus, this study along with others cited here points the need of measures to prevent and improve health access, through the improvement of medical assistance, sanitary and environmental conditions of families, which, therefore, will reflect on the improvement of their health conditions.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Monteagudo, Pergamino - Argentina for the donation of antigens used in this work.

FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by FIOCRUZ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - Fundec, Universidade Federal do Mato Grosso

do Sul and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 404762/2016-6.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(3):221-70. doi: 10.1080/10408410902989837. PubMed PMID: 19548807.
2. Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ.* 2000;78(9):1136-47. PubMed PMID: 11019462; PubMed Central PMCID: PMC2560843.
3. Prist PR, D Andrea PS, Metzger JP. Landscape, Climate and Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome Outbreaks. *Ecohealth.* 2017;14(3):614-29. Epub 2017/06/15. doi: 10.1007/s10393-017-1255-8. PubMed PMID: 28620680.
4. Charrel RN, Coutard B, Baronti C, Canard B, Nougairede A, Frangeul A, et al. Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals. *Antiviral Res.* 2011;90(2):102-14. Epub 2011/02/26. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.02.009. PubMed PMID: 21356244.
5. Goeijenbier M, Wagenaar J, Goris M, Martina B, Henttonen H, Vaheri A, et al. Rodent-borne hemorrhagic fevers: under-recognized, widely spread and preventable - epidemiology, diagnostics and treatment. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39(1):26-42. Epub 2012/06/07. doi: 10.3109/1040841X.2012.686481. PubMed PMID: 22670688.
6. IBGE. Classificação e caracterização dos espaços rurais e urbanos do Brasil: uma primeira aproximação. IBGE, Coordenação de Geografia - Rio de Janeiro: Estudos e Pesquisa. Informação Geográfica. ISSN 1517-1450; 2017. 84 p.
7. Conde BE, Ticktin T, Fonseca AS, Macedo AL, Orsi TO, Chedier LM, et al. Local ecological knowledge and its relationship with biodiversity conservation among two Quilombola groups living in the Atlantic Rainforest, Brazil. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187599. Epub 2017/11/28. doi: 10.1371/journal.pone.0187599. PubMed PMID: 29182637; PubMed Central PMCID: PMC5705149.
8. Bezerra VM, Medeiros DS, Gomes KeO, Souza R, Giatti L, Steffens AP, et al. [Health survey in Quilombola communities (descendants of Afro-Brazilian slaves who escaped from slave plantations that existed in Brazil until abolition in 1888) in Vitória da Conquista in the state of Bahia (COMQUISTA Project), Brazil: methodological aspects and descriptive analysis]. *Cien Saude Colet.* 2014;19(6):1835-47. PubMed PMID: 24897483.
9. Fortes-Lima C, Gessain A, Ruiz-Linares A, Bortolini MC, Migot-Nabias F, Bellis G, et al. Genome-wide Ancestry and Demographic History of African-Descendant Maroon Communities from French Guiana and Suriname. *Am J Hum Genet.* 2017;101(5):725-36. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.09.021. PubMed PMID: 29100086; PubMed Central PMCID: PMC5673667.

10. Urquiza AHA, Santos Ld. Regularização fundiária de comunidades quilombolas em Mato Grosso do Sul/Brasil. *Rev Bras Polít Públicas (Online)*. 2017;7(2):231-47.
11. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol*. 1997;41(6):305-10. PubMed PMID: 9607087.
12. Guzmán C, Mattar S, Levis S, Pini N, Figueiredo T, Mills J, et al. Prevalence of antibody to hantaviruses in humans and rodents in the Caribbean region of Colombia determined using Araraquara and Maciel virus antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(2):167-71. PubMed PMID: 23579795; PubMed Central PMCID: PMC3970671.
13. Motta-Castro AR, Yoshida CF, Lemos ER, Oliveira JM, Cunha RV, Lewis-Ximenez LL, et al. Seroprevalence of Hepatitis B virus infection among an Afro-descendant community in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):13-7. Epub 2003/04/09. PubMed PMID: 12700856.
14. Damazio SM, Lima MeS, Soares AR, Souza MA. Intestinal parasites in a quilombola community of the Northern State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3). doi: 10.1590/S0036-46652013000300007. PubMed PMID: 23740008.
15. Gimaque JB, Bastos MeS, Braga WS, Oliveira CM, Castilho MaC, Figueiredo RM, et al. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):135-7. PubMed PMID: 22310547.
16. Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LT, Ferreira I, Rocco IM, et al. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet*. 1994;343(8894):391-2. PubMed PMID: 7905555; PubMed Central PMCID: PMC3313646.
17. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, de Carvalho Serra F, Bonvicino CR, D'Andrea PS, et al. Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species. *Infect Genet Evol*. 2015;33:242-5. Epub 2015/05/11. doi: 10.1016/j.meegid.2015.05.010. PubMed PMID: 25975978.
18. Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(3):229-33. PubMed PMID: 20563486.
19. Andersen KG, Shylakhter I, Tabrizi S, Grossman SR, Happi CT, Sabeti PC. Genome-wide scans provide evidence for positive selection of genes implicated in Lassa fever. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1590):868-77. doi: 10.1098/rstb.2011.0299. PubMed PMID: 22312054; PubMed Central PMCID: PMC3267117.
20. Pereira GW, Teixeira AM, Souza MS, Braga AD, Santos Junior GS, Figueiredo GG, et al. Prevalence of serum antibodies to hantavirus in a rural population from the Southern State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):117-9. PubMed PMID: 22370840.
21. Souza WM, Machado AM, Figueiredo LT, Boff E. Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):131-5. Epub 2011/04/01. PubMed PMID: 21468477.
22. Holmes R, Boccanera R, Figueiredo LT, Mançano SR, Pane C. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of São Paulo State, Brazil. *Emerg*

- Infect Dis. 2000;6(5):560-1. doi: 10.3201/eid0605.000523. PubMed PMID: 10998393; PubMed Central PMCID: PMCPMC2627945.
23. Badra SJ, Maia FG, Figueiredo GG, Dos Santos Junior GS, Campos GM, Figueiredo LT, et al. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cássia dos Coqueiros, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(4):468-70. Epub 2012/07/05. PubMed PMID: 22767095.
 24. Saúde Md. Informes Epidemiológicos: Hantavirose por Unidade Federada Provável de Infecção e Ano. Brasil, 1993 - 2010. Brasília: Ministério da Saúde: Área Técnica de Hantavirose, 2010.
 25. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, Strecht L, Casado F, Gomes de Oliveira FC, et al. Characterization of Jucituba virus in *Oligoryzomys fomesi* from Brazilian Cerrado. *Viruses.* 2014;6(4):1473-82. Epub 2014/03/26. doi: 10.3390/v6041473. PubMed PMID: 24674957; PubMed Central PMCID: PMCPMC4014705.
 26. Muñoz-Zanzi C, Saavedra F, Otth C, Domancich L, Hott M, Padula P. Serological evidence of hantavirus infection in apparently healthy people from rural and slum communities in southern Chile. *Viruses.* 2015;7(4):2006-13. Epub 2015/04/17. doi: 10.3390/v7042006. PubMed PMID: 25912713; PubMed Central PMCID: PMCPMC4411687.
 27. Batista JE, Saddi VA, Carvalho KP, Ribeiro AA, Segati KD, Carneiro MA, et al. Human papillomavirus genotypes 68 and 58 are the most prevalent genotypes in women from quilombo communities in the state of Maranhão, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2017;55:51-5. Epub 2017/01/11. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.001. PubMed PMID: 28088590.
 28. Reis NR, Motta-Castro AR, Silva AM, Teles SA, Yoshida CF, Martins RM. Prevalence of hepatitis C virus infection in quilombo remnant communities in Central Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(6):359-60. PubMed PMID: 19082380.
 29. Nascimento LB, Carneiro MA, Teles SA, Lopes CL, Reis NR, Silva AM, et al. [Prevalence of infection due to HTLV-1 in remnant quilombos in Central Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):657-60. PubMed PMID: 20209350.
 30. Matos MA, Reis NR, Kozłowski AG, Teles SA, Motta-Castro AR, Mello FC, et al. Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(9):899-905. Epub 2009/02/12. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.01.013. PubMed PMID: 19217131.

4.2.4. Artigo 10 - Rodent-borne viruses survey in rural settlers from Central Brazil

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.3.** Pesquisar a ocorrência de infecções por hantavírus em diferentes populações, consideradas de risco, em regiões onde a circulação desses vírus em roedores tenha sido confirmada.

Objetivo específico:

- ✓ Realizar inquéritos sorológicos em populações de agricultores familiares e em populações residentes em ambientes de interface rural e silvestre;
- ✓ Descrever aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por hantavírus.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Fator de Impacto da Revista: 2,6

Referência: J. Fernandes, R. C. Oliveira, T. A. Coelho, R. M. B. Martins, K. A. A. Caetano, M. A. P. Horta, S. Levis, M. A. S. Carneiro, S. A. Teles, E. R. S. Lemos. Rodent-borne viruses and rural settlers in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019, 114: e180448.

Rodent-borne viruses survey in rural settlers from Central Brazil

Jorlan Fernandes¹, Renata Carvalho de Oliveira¹, Thayssa Alves Coelho¹,
Regina Maria Bringel Martins², Karlla Antonieta Amorim Caetano³,
Marco Aurélio Pereira Horta⁴, Silvana Levis⁵, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro²,
Sheila A Teles³, Elba Regina Sampaio de Lemos^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, GO, Brasil

³Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem, Goiânia, GO, Brasil

⁴Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Argentina

Anthropogenic environmental changes arising from settlement and agriculture include deforestation and replacement of natural vegetation by crops providing opportunities for pathogen spillover from animals to humans. This study aimed to investigate the prevalence of rodent-borne virus infections in seven rural settlements from Midwestern Brazil. Of the 466 individuals tested 12 (2.57%) were reactive for orthohantavirus and 3 (0.64%) for mammarenavirus. These rural settlers lived under unfavorable infrastructure, socioeconomic disadvantages, and unsanitary conditions, representing a risk for rodent-borne infections. Development of public policies towards the improvement of health, sanitation and awareness of rodent-borne diseases in improvised camps and settlements is imperative, in order to reduce morbidity and mortality caused by these diseases.

Key words: hantavirus - arenavirus - rural settlers - rodent-borne diseases

Human behavior, especially spatial expansion of agriculture, has been implicated as drivers of some recent emerging disease events that had important impact on human health.⁽¹⁾ Anthropogenic environmental changes caused by settlement and agriculture include habitat deforestation, fragmentation, and replacement of natural vegetation by crop fields.⁽²⁾ These changes modify wildlife population structure and migration and reduce biodiversity by creating environments that favor particular hosts, vectors, and/or pathogens.^(1,2)

Rural settlers are a growing population in Brazil, where currently 9,256 rural settlements are listed, occupying an area of 88,314,857 hectares (three times the size of the United Kingdom).⁽³⁾ These settlements were established to encourage landless rural workers on unproductive properties to be relocate to potentially productive areas through a system of land grants. Often, before they own the land, they live in camps, where living conditions are unfavorable.⁽⁴⁾ In addition, many families live in rudimentary housing, devoid of piped water, electricity, selective garbage collection, conditions that favors proliferation and increases chances of contact with rodents.^(4,5,6) In this context of social vulnerability and environmental degradation, this study aimed to investigate the prevalence of rodent-borne viruses (hantaviruses and mammarenaviruses) infections in rural settlers from Brazil.

Human infections caused by hantaviruses and mammarenaviruses are associated with the natural cycle of these viruses, and transmission usually occurs by inhalation of aerosolised rodent excreta.⁽⁷⁾ Brazil occupies most of the eastern portion of South America, supporting several biomes with multiple natural ecosystems that account for the reported regional differences and temporal trends of hantavirus pulmonary syndrome (HPS).⁽⁸⁾ To date, more than 2,000 HPS cases have been reported and six hantavirus genotypes have been identified as pathogenic to humans in Brazil: Juitituba, Araraquara, Castelo dos Sonhos, Laguna Negra, Anajatuba and Rio Mamore viruses. These viruses are transmitted by wild rodent reservoirs of the species *Oligoryzomys nigripes*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys utaritensis*, *Calomys callidus*, *Oligoryzomys mottogrossae* and *Oligoryzomys microtis*, respectively.^(7,8) In contrast, only one case of Brazilian haemorrhagic fever was described in 1990, which was caused by Sabiá mammarenavirus, for which the animal reservoir is still unknown.⁽⁹⁾

A cross-sectional study was conducted in rural settlements from southwest of Goiás state, Central Brazil. Individuals from seven rural settlement projects established in Perolândia (Lagoa do Bonfim and Três Pontes) and Jataí (Santa Rita, Rio Claro, Nossa Senhora de Guadalupe, Terra e Liberdade and Gurita) counties (Figure) were interviewed using a standard questionnaire to record their sociodemographic and behavioral characteristics, as reported previously.^(4,5) Blood was collected (10 mL) from all participants, and serum samples were tested by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-hantavirus and mammarenavirus immunoglobulin G (IgG).^(10,11) This study was approved by the Research and Ethics Committee of Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás number 127/2010, and by Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz Ethical Committee, number CAAE 61629416.2.1001.5248.

doi: 10.1590/0074-02760180448

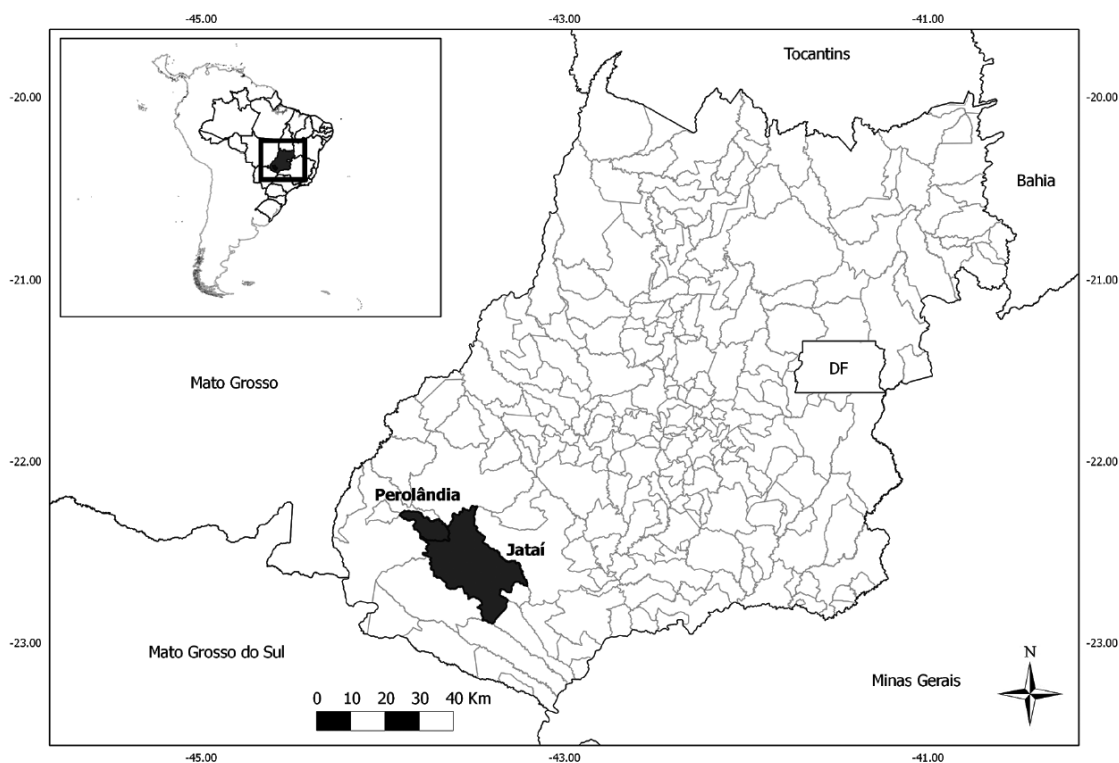
Financial support: FIOCRUZ, CAPES, FAPEG, CNPq (grant nº 404762/2016-6), Universidade Federal de Goiás.

+ Corresponding author: elba.lemos@ioc.fiocruz.br

Received 24 September 2018

Accepted 27 November 2018





Map of Goiás state, Midwestern Brazil, showing the municipalities of Jataí and Perolândia.

Briefly, 96-round-bottom-well-microplates (Thermo Scientific™) were coated with 100 μ L of the cell lysate diluted in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. One-half of the plate with the infected cell lysate (Junin mammarenavirus strain XJC13 or Maciel orthohantavirus strain #9) and the other half with the uninfected cell lysate (Vero C76- ATCC® CRL-1587™). The plates were kept overnight at 4°C, and then washed five times with 0.1% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) in PBS. The wells were then filled with 100 μ L diluted test sera, starting at 1:100 dilution. As diluent, PBS with 0.1% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) and 5.0% skim milk (BD Difco™) was used. The plates were incubated for 1 h at 37°C. After five washes, 100 μ L of goat Anti-Human IgG peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories- KPL, Gaithersburg, MD) conjugated at 1:2000 dilution was placed in each well and the plates were incubated for 1 h at 37°C. The five washes were repeated and 100 μ L of ABTS [2, 2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)] substrate (KPL, Gaithersburg, MD) was added to each well. The plates were kept for 30 min at 37°C. Objective reading of ELISA results was performed by determination of absorbencies at 405 and 450 nm. The cut-off was determined by the mean optical densities (OD) of the negative controls plus three standard deviations at 1:100 dilution.

Aiming to test the association among variables, chi-square tests (χ^2) were used to verify those variables that presented a relationship with the outcome variable (detection of anti-hantavirus IgG antibodies) in order to perform a modeling process. Univariate logistic regression

analyses were performed between serology results and those other variables that demonstrated association with the outcome by χ^2 analysis with p-value under 30% and Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were estimated. Data analysis was performed using the statistical package R (version 3.1.1).

Nearly half of the population was male (52.1%). The median age was 41 years (minimum: 2; maximum: 93), and monthly income of approximately \$210.00 USD (minimum: 39; maximum: 3460, USD, approximately). Most are self-declared mixed race (60.1%) and had a maximum of nine years of formal schooling (82.5%). About 68.0% of all participants had lived in canvas or improvised plastic tents in provisory settlements (Table).

Of the 466 individuals enrolled in the study, 12 (2.57%) were reactive for orthohantavirus and 3 (0.64%) for mammarenavirus. One individual was reactive for both tests, but high titers for orthohantavirus (1:6400) were found. Arenavirus antibodies were found only in Terra e Liberdade settlement (3/141 - 2.1%) in both sex (two men and one woman) with ages ranging from 16 to 66 years. Although we do not have detailed information on the medical history of these individuals, all of them reported having been hospitalised at some point for not specified clinical (not surgical) reasons.

Hantavirus antibodies were present in all seven settlements, with prevalence ranging from 0.9% (1/101 - Nossa Senhora de Guadalupe), 1.4% (2/141 - Terra e Liberdade), 2.0% (1/47 - Santa Rita), 4.0% (1/25 - Lagoa do Bonfim), 4.3% (4/92 - Gurita) and Rio Claro (1/23) to 5.4% (2/37 - Três Pontes). Six individuals referring to hospitalisation for not specified clinical reasons at some

TABLE
Distribution of characteristic, prevalence of seropositivity (detection of anti-hantavirus IgG antibodies)
and chi-square test (p-value) for rural population in Goiás, Brazil

Variable	N (%)	Seropositivity (%)	χ^2 p-value	OR (95%CI)
Age			0.29	
≤ 18	118 (25.3)	1 (0.8)		1
19-40	110 (23.6)	2 (1.8)		2.16 (0.19-24.2)
41-60	191 (41.0)	8 (4.2)		5.11 (0.63-41.4)
> 61	47 (10.1)	1 (2.1)		2.54 (0.15-41.4)
Sex			0.88	
Female	223 (47.9)	6 (2.7)		
Male	243 (52.1)	6 (2.5)		
Settlement			0.59	
Terra	141 (30.3)	2 (1.4)		
Guadalupe	101 (21.7)	1 (1.0)		
Gurita	92 (19.7)	4 (4.3)		
Santa Rita	47 (10.1)	1 (2.1)		
Três Pontes	37 (7.9)	2 (5.4)		
Rio Claro	23 (4.9)	1 (4.3)		
Lagoa	25 (5.4)	1 (4.0)		
Monthly income (USD)			0.75	
≤ 330	325 (72.9)	9 (2.8)		
331-660	113 (25.3)	2 (1.8)		
≥ 661	8 (1.8)	0 (0.0)		
School (years)			0.15	
≤ 4	202 (46.3)	8 (4.0)		1
5-9	170 (39.0)	3 (1.8)		0.43 (0.10-2.17)
≥ 10	64 (14.7)	0 (0.0)		-
Smoke			0.18	
No	302 (75.9)	6 (2.0)		1
Yes	95 (29.9)	5 (5.3)		2.74 (0.81-9.19)
Time living in the settlement (days)			0.09	
≤ 30	85 (18.4)	2 (2.4)		1
31-60	265 (57.5)	4 (1.5)		0.63 (0.11-3.53)
≥ 61	111 (24.1)	6 (5.4)		2.37 (0.46-12.05)
Time living in camps (months)			0.36	
≤ 50	160 (51.3)	4 (2.5)		
50-100	116 (37.2)	5 (4.3)		
≥ 100	36 (11.5)	0 (0.0)		
Garbage			0.49	
Burnt	267 (59.7)	5 (1.9)		
Buried	19 (4.3)	0 (0.0)		
Collected	145 (32.4)	5 (3.4)		
Other	16 (3.6)	1 (6.2)		
Sanitation			0.47	
No	100 (21.7)	1 (1.0)		
Yes	361 (78.3)	11 (3.0)		

point of their lives. There was no statistically significant difference between the evidence of hantavirus infection and the variables showed in Table. Due to low number of mammarenavirus reactive samples, statistical analyses were performed considering only hantavirus reactivity.

Encroachment of human settlements and agriculture on natural ecosystems results in expansion of transition zones between these two ecological systems, where species assemblages from different habitats can mix.^(2,12) This provides new opportunities for pathogen spillover, genetic

diversification, and adaptation. Associations between disease emergence in transition areas have been suggested for several diseases, including yellow fever, HPS, Nipah virus encephalitis, rabies, cholera, leptospirosis.^(7,13,14)

HPS is considered a rural disease and consequently rural dwellers as well as individuals who are often in contact with the rural area are considered as risk group. Goiás state has 98 confirmed HPS cases, since 2000.^(7,8,15) Two hantaviruses have been detected in the state, Araraquara and Jucituba virus in *N. lasiurus* and *O. nigripis* rodents, respectively.⁽¹⁶⁾ The prevalence of anti-hantavirus IgG antibodies detected in this study is in accordance with prevalence found in different studies conducted in rural populations from Brazil (0.4% to 22.0%),^(17,18,19,20,21,22,23) but is lower than the one found for Jataí municipality 3.9% (95% CI: 2.3-5.7).⁽²⁴⁾ According to Guzmán et al.,⁽¹¹⁾ this difference could be explained by the lower sensitivity found in the serological testes using Maciel orthohantavirus when compared to those obtained using Araraquara orthohantavirus. Studies also show considerable serological prevalence for hantavirus in men, that seem to link hantavirus infection and field related activities. This fact was not observed in our study, probably due to the rudimentary living conditions, especially during their time in improvised camps, where man and woman could be exposed in their habitations during indoors activities, as reported in works conducted in Brazil and Chile.^(19,22,25)

Mammarenavirus prevalence is variable in different endemic areas. Our results are comparable with ones found in other South American countries. In Argentina, studies demonstrated low prevalence of unapparent infections ranging from 1.93% (3/155) to 4.44% (24/540) for rural populations from Córdoba and Buenos Aires provinces, respectively.⁽²⁶⁾ The prevalence of Guanarito virus infection among humans from Portuguesa state, Venezuela, was 2.60% (5/195), all adults living in rural areas and two had previously been reported as Venezuelan hemorrhagic fever cases.⁽²⁷⁾ Machado et al.⁽²⁸⁾ observed that 1.40% (5/343) individuals living in the municipality of Nova Xavantina (Mato Grosso state, Brazil), who presented fever with unidentified etiology, presented antibody titers against arenavirus. It is important to notice that Argentina and Venezuela are endemic countries for arenavirus hemorrhagic fevers, with several reported cases. Thus, during the emergence of American hemorrhagic fever a scenario of sociodemographic expansion and increased deforestation was described in Argentina and Venezuela,^(26,27) the same factors that are present in the studied area.

To date there are few evidences of arenaviruses causing human infections in Brazil; the presence of antibodies in rural population in similar rates to those found in endemic countries points out for a probable silent circulation of mammarenaviruses in rural areas of Brazil.^(28,29) The only settlement where serological evidences for arenavirus were found (Terra e Liberdade - Jataí county) is 953 km of distance from the probable local of infection of the first and only case of Brazilian hemorrhagic fever reported.⁽⁹⁾ To date, at least eight mammarenavirus have been described in Brazil, two from Midwestern states.

^(30,31) The identification of seroreactivity in just one settlement could represent a local circulation of a distinct mammarenavirus, especially considering the natural nidity attributed to some mammarenaviruses.⁽³²⁾

Until Brazilian government established these settlements between 1998 and 2007, many of the landless rural residents lived in this precarious condition, arranging in canvas or plastic tents, for many years. The long period under unfavorable infrastructure, socioeconomic disadvantages, and unsanitary conditions may represent a risk of acquiring hantavirus and mammarenavirus infections. The intense process of degradation in recent decades, with large areas planted with monoculture crops, can favor generalist rodent species in interspecific competition with other rodents, mostly habitat specialists. The general behavior of many rodent-borne reservoirs as *N. lasiurus* and *O. nigripes* make these species highly adaptable to man-made environments.⁽¹⁶⁾ The ecological pattern of these rodents associated with deep anthropogenic changes areas provide by improvised camps or rural settlements greatly increases the chances of contact between humans and infected rodents, mainly due to the potential increase in population density and the narrowing of environments shared with humans.^(2,6,16)

Rodent-borne infections are highly lethal diseases especially in rural areas, where poor people that depend on the land to survive are constantly exposed to rodents, with low access to medical care. Implementation of public policies towards the improvement of health access, sanitation and awareness of rodent-borne diseases in improvised camps and settlements is needed, in order to prevent human infection and reduce morbidity and mortality caused by these diseases. In the future, sustainable agricultural systems that minimise the risk of emerging disease will therefore be essential to meet the requirements of the rising rural settlers' population, while protecting human health and conserving biodiversity and the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Gabriel Rosa Cavalcanti (Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz), Ágabo Macedo da Costa e Silva, Gabryella Teixeira dos Santos (Universidade Federal de Goiás - UFG) and Bernardo Teixeira (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz) for their collaboration and technical support.

AUTHORS' CONTRIBUTION

JF, RCO, TAC, MAPH and SL performed lab experiments, processed the data; RMBM, KAAC, MASC and SAT conducted field studies; JF, RCO and ERS� draft the manuscript; ERS� and SAT conceived the study and coordinated the resources.

REFERENCES

1. Vandegrift KJ, Wale N, Epstein JH. An ecological and conservation perspective on advances in the applied virology of zoonoses. *Viruses*. 2011; 3(4): 379-97.
2. Jones BA, Grace D, Kock R, Alonso S, Rushton J, Said MY, et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(21): 8399-404.
3. Wittman H. Reframing agrarian citizenship: land, life and power in Brazil. *J Rural Stud*. 2009; 25(1): 120-30.

4. Pinheiro RS, Aratijo LA, Caetano KA, Matos MA, Carneiro MA, Teles SA. Intermediate endemicity of hepatitis A virus infection in rural settlement projects of Southwest Goiás, Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2015; 52(3): 200-3.
5. Freitas NR, Teles SA, Caetano KAA, Matos MA, Carneiro MADS, Gardinali NR, et al. Hepatitis E seroprevalence and associated factors in rural settlers in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(5): 675-9.
6. Mota BE, Trindade GS, Diniz TC, da Silva-Nunes M, Braga EM, Urbano-Ferreira M, et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol.* 2010; 155(7): 1139-44.
7. de Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ER. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses.* 2014; 6(5): 1929-73.
8. Pinto VL, de Sousa AI, de Lemos ER. Regional variations and time trends of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(10): 2166-71.
9. Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LT, Ferreira I, Rocco IM, et al. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet.* 1994; 343(8894): 391-2.
10. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol.* 1997; 41(6): 305-10.
11. Guzmán C, Mattar S, Levis S, Pini N, Figueiredo T, Mills J, et al. Prevalence of antibody to hantaviruses in humans and rodents in the Caribbean region of Colombia determined using Araraquara and Maciel virus antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(2): 167-71.
12. Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and disease emergence: dynamics at the Wildlife-Livestock-Human interface. *Trends Ecol Evol.* 2017; 32(1): 55-67.
13. Despommier D, Ellis BR, Wilcox BA. The role of ecotones in emerging infectious diseases. *EcoHealth.* 2006; 3(4): 281-9.
14. Pfeiffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors.* 2010; 3(1): 35.
15. Menezes HR, Moreli ML, Sousa AL, Costa VG. Cross-sectional study on case fatality rate due to hantavirus infection in Goiás state, Brazil, 2007-2013. *Epidemiol Serv Saude.* 2016; 25(3): 519-30.
16. Guterres A, de Oliveira RC, Fernandes J, Maia RM, Teixeira BR, Oliveira FCG, et al. Co-circulation of Araraquara and Juititaba Hantavirus in Brazilian Cerrado. *Microb Ecol.* 2017; 75(3): 783-9.
17. Gimaque JBL, Bastos MS, Braga WSM, de Oliveira CMC, Castilho MC, de Figueiredo RMP, et al. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(1): 135-7.
18. Pereira GW, Teixeira AM, Souza MS, Braga AD, Santos Jr GS, Figueiredo GG, et al. Prevalence of serum antibodies to hantavirus in a rural population from the Southern state of Santa Catarina, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(1): 117-9.
19. Souza WM, Machado AM, Figueiredo LT, Boff E. Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(2): 131-5.
20. Holmes R, Boccanera R, Figueiredo LT, Mançano SR, Pane C. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of São Paulo state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(5): 560-1.
21. Badra SJ, Maia FG, Figueiredo GG, dos Santos Jr GS, Campos GM, Figueiredo LT, et al. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cássia dos Coqueiros, state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(4): 468-70.
22. Amaral CD, Costa GB, de Souza WM, Alves PA, Borges IA, Toldado AL, et al. Silent orthohantavirus circulation among humans and small mammals from Central Minas Gerais, Brazil. *EcoHealth.* 2018; 15(3): 577-89.
23. de Oliveira RC, Guterres A, Teixeira BR, Fernandes J, Penna Jr JM, Oliveira Jr RJ, et al. A fatal hantavirus pulmonary syndrome misdiagnosed as dengue: an investigation into the first reported Case in Rio de Janeiro state, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 97(1): 125-9.
24. Moreli ML, Novaes DPDS, Flor EC, Saivish MV, Costa VGD. Seropositivity diagnosis for hantavirus in Jataí, Goiás state, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(4): 530-4.
25. Muñoz-Zanzi C, Saavedra F, Otth C, Domancich L, Hott M, Padula P. Serological evidence of hantavirus infection in apparently healthy people from rural and slum communities in southern Chile. *Viruses.* 2015; 7(4): 2006-13.
26. Weissenbacher MC, Sabattini MS, Avila MM, Sangiorgio PM, de Sensi MR, Contigiani MS, et al. Junin virus activity in two rural populations of the Argentine hemorrhagic fever (AHF) endemic area. *J Med Virol.* 1983; 12(4): 273-80.
27. Tesh RB, Wilson ML, Salas R, de Manzione NM, Tovar D, Ksiazek TG, et al. Field studies on the epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever: implication of the cotton rat *Sigmodon alstoni* as the probable rodent reservoir. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49(2): 227-35.
28. Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, state of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43(3): 229-33.
29. Fernandes J, Coelho TA, Oliveira RC, Guterres A, Oliveira EC, Terças ACP, et al. Silent arenavirus infection in individuals living in Colniza, Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(6): 881-2.
30. Fernandes J, Guterres A, de Oliveira RC, Chamberlain J, Lewandowski K, Teixeira BR, et al. Xapuri virus, a novel mammarenavirus: natural reassortment and increased diversity between New World viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 120.
31. Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Serra FC, Bonvicino CR, D'Andrea OS, et al. Co-circulation of Clade C new world arenaviruses: new geographic distribution and host species. *Infect Genet Evol.* 2015; 33: 242-5.
32. Salazar-Bravo J, Dragoo JW, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG, Yates TL. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect Genet Evol.* 2002; 1(3): 191-9.

4.3. RESTITUIÇÃO DE RESULTADOS E ESTRATÉGIAS DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE

O terceiro e último eixo teve como objetivo realizar a restituição dos resultados não somente para as instituições de saúde das regiões incluídas no estudo, com o propósito de alertar sobre a necessidade e importância da vigilância das arenaviroses, mas principalmente para a população rural, em atendimento ao Plano Brasil sem Miséria, cujo incentivo à agricultura familiar precisa estar associado com medidas que diminuam o contato da população com agentes infecciosos transmitidos por roedores.

Assim, foram desenvolvidas estratégias de comunicação que pudessem servir como fontes de informação sobre as doenças transmitidas por roedores, com ênfase na prevenção dessas doenças, resultando na produção de um folder e de uma cartilha sobre o tema, com a colaboração e financiamento da Organização Pan-americana de saúde (OPAS) e do apoio de outro projeto intitulado *“Eco-epidemiologia de mamíferos silvestres e seu papel na transmissão da peste bubônica e síndrome pulmonar por hantavírus no Nordeste brasileiro: avaliação de risco para populações rurais atendidas pelo programa Brasil sem Miséria”* desenvolvido no âmbito do convênio CAPES.

Em adição, considerando a importância da restituição dos resultados como estratégia de sensibilização dos profissionais da saúde, todos os resultados gerados pela pesquisa de mamarenavírus em roedores e humanos foram repassados às autoridades responsáveis, secretarias municipais e estaduais de saúde, afim de formentar ações relacionadas à vigilância e à prevenção das infecções por esses vírus. Orientações sobre prevenção foram enviadas para coordenadores dos projetos envolvendo populações rurais, citados na seção anterior, que ainda desenvolvem trabalho com as mesmas.

4.3.1. Nota Técnica – Secretaria Estadual de Saúde do Mato Grosso

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.4.** Restituir os resultados para os serviços de saúde visando à incorporação de ações de prevenção e controle das arenavirose à vigilância integrada das doenças transmitidas por roedores, como hantavirose, peste e leptospirose, em conjunto com as ações já implantadas pelo Brasil sem miséria.

Objetivo específico:

- ✓ Elaborar notas técnicas e/ou informativos para profissionais da área da saúde e do meio ambiente visando esclarecer, com foco na prevenção, sobre a possibilidade de ocorrência da arenavirose e sua associação com roedores, de maneira que a doença possa ser reconhecida com a realização do diagnóstico e tratamento precoces.

Situação: publicado *on-line* em 26 de janeiro de 2018.



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
COORDENADORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

NOTA INFORMATIVA Nº 01/2018

ASSUNTO: Alerta e orientação aos Gestores do SUS e Profissionais de Saúde sobre a importância da vigilância e prevenção das febres hemorrágicas por arnavírus no estado do Mato Grosso.

ALERTA: Secretaria de Estado da Saúde do Mato Grosso alerta aos Gestores do SUS e Profissionais de Saúde para a importância da vigilância da febre hemorrágica por arnavírus nos municípios mato-grossenses em razão da detecção de vírus em roedores silvestres e da evidência sorológica de infecção humana.

A DETECÇÃO DO VÍRUS EM ROEDORES SILVESTRES

Um estudo com 148 roedores provenientes dos municípios de Sapezal, Comodoro, Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra foi realizado nos anos de 2010 e 2015. Fragmentos parciais do genoma dos arnavírus foram detectados em seis animais da espécie *Calomys callidus* nos municípios de Tangará da Serra e Sapezal. Sequenciamento parcial do material genético viral apresentou similaridade com o arnavírus Latino presente também na Bolívia e no Mato Grosso do Sul, até o momento sem associação com doença em humanos.

EVIDÊNCIA SOROLÓGICA EM HUMANOS

Foi realizada uma pesquisa por anticorpos da classe IgG anti-arnavírus em 110 indivíduos do município de Colniza, norte do estado. Dois participantes foram reativos no teste, indicando contato com arnavírus.

A DOENÇA

A febre hemorrágica por arnavírus compõe a lista de doenças de notificação compulsória publicada na Portaria nº 204/GM/MS, de 17 de fevereiro de 2016, sendo classificada entre as doenças de notificação imediata, ou seja, que devem ser notificadas em até 24 horas.

A febre hemorrágica por arnavírus é uma doença infecciosa febril aguda, com manifestações hemorrágicas e neurológicas, cuja letalidade pode chegar a 30%. Assim como na hantavirose, o vírus é mantido na natureza em roedores silvestres e transmitido a partir da inalação de aerossóis contaminados com excretas (saliva, urina e fezes) de roedores infectados. No Brasil o arnavírus responsável por causar doença no homem é o vírus Sabiá. Outras espécies de arnavírus são responsáveis por doença na América
Jeus JF, et al. Alerta e orientação aos Gestores do SUS e Profissionais de Saúde sobre a importância da vigilância e prevenção das febres hemorrágicas por arnavírus no estado do Mato Grosso. In: Mato Grosso. **NOTA INFORMATIVA Nº 01/2018 - Gerência de Doenças e Agravos Endêmicos da SES/MT.** Cuiabá: SES, 2018.



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
COORDENADORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

latina como o vírus Junín na Argentina, Guanarito na Venezuela e os vírus Machupo e Chapare, na Bolívia.

Estão sob maior risco indivíduos que se expõe a roedores silvestres durante as suas atividades diárias, profissionais ou recreativas. Podemos destacar moradores de áreas rurais, trabalhadores agrícolas, trabalhadores da agroindústria, agentes de saúde, porém não se limitando somente a estes.

SUSPEITA CLÍNICA

Difícilmente será possível diagnosticar a doença em seu início devido ao quadro clínico inespecífico e muito similar a outros agravos, principalmente com a febre amarela, dengue e a síndrome pulmonar por hantavírus que, junto com a febre hemorrágica por arenavírus, compõem o grupo das quatro febres hemorrágicas causadas por vírus no Brasil.

Sem qualquer visibilidade, por falta de conhecimento dos profissionais de saúde, especialmente durante ocorrência de surtos das arboviroses, cujo diagnóstico diferencial deve ser realizado, o quadro clínico é caracterizado por febre associada com mialgia, cefaleia retro-ocular, fotofobia, epigastralgia, entre outras manifestações, e que evolui com hemorragia, com ou sem sinais neurológicos, geralmente com evolução rápida e grave, com desfecho fatal a partir do sétimo dia de doença. O uso de ribavirina nos primeiros dias, cuidados hemodinâmicos e ventilatórios em unidade de terapia intensiva (UTI) parecem reduzir a letalidade da doença.

No diagnóstico diferencial deve ser considerada a exposição e a situação de risco, com ênfase nos antecedentes epidemiológicos como contato com roedores reservatórios, atividades ou sua estada em ambientes de risco. Além das viroses citadas acima, a febre hemorrágica por arenavírus deve ser incluída também no diagnóstico diferencial com malária, febre maculosa brasileira, meningococemia, entre outras doenças. Com quadro clínico e laboratorial semelhante à febre amarela e à dengue, com a presença de leucopenia associada com linfocitose e trombocitopenia, o diagnóstico laboratorial específico pode ser realizado pelo Laboratório de Referência Regional para Hantaviroses do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

PREVENÇÃO

A prevenção se baseia em evitar ou diminuir a exposição direta ou indireta do indivíduo à roedores e suas excretas. Para evitar a instalação e a proliferação de roedores silvestres, devem-se adotar medidas como (i) não acumular objetos e matérias sem uso no interior e ao redor do domicílio, (ii) aparar a vegetação em um raio de pelo menos 40 metros ao redor do domicílio e anexos (paiol, abrigo de animais, silo e outros), limitar a área de plantio a mesma distância (iii) acondicionar alimentos, produtos agrícolas, grãos e rações em recipientes fechados, de preferência, esses recipientes devem estar sobre prateleiras ou estrados a pelo menos 40 cm do solo, (iv)

Jeus JF, et al. Alerta e orientação aos Gestores do SUS e Profissionais de Saúde sobre a importância da vigilância e prevenção das febres hemorrágicas por arenavírus no estado do Mato Grosso. In: Mato Grosso. NOTA INFORMATIVA Nº 01/2018 - Gerência de Doenças e Agravos Endêmicos da SES/MT. Cuiabá: SES, 2018.



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
COORDENADORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

vedar fendas e outras aberturas na casa ou anexos, (v) remover diariamente, no período noturno, as sobras dos alimentos de animais domésticos, (vi) caso não exista coleta seletiva do lixo, o mesmo deve ser enterrado, respeitando uma distância mínima de 30 m da casa e anexos, (vii) os produtos colhidos, assim como os restos de colheita, não devem pernoitar no campo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado do Mato Grosso possui um grande número de doenças endêmicas agravadas por fatores sociais e ambientais, além de ter como limite, na parte oeste, a Bolívia, um país onde casos fatais de febre hemorrágica pelo arnavírus Machupo e Chapare têm sido confirmados. Diante do exposto, principalmente pelas evidências apresentadas neste informe, alertamos para a necessidade de se intensificar a vigilância das febres hemorrágicas por arnavírus, considerando não somente a possibilidade de sua ocorrência silenciosa no estado, mas também para o significativo número de casos suspeitos de arboviroses sem etiologia laboratorial confirmada.

Cuiabá, 08 de janeiro de 2018.

Colaboradores:

1- Alba Valéria Gomes de Melo; Elaine Cristina de Oliveira - Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica/SES/MT.

2- Jorlan Fernandes de Jesus; Renata Carvalho de Oliveira; Elba Regina Sampaio de Lemos - Laboratório de Hantaviroses e Ricktsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ.

3- Ana Cláudia Pereira Terças - Universidade do Estado de Mato Grosso, UNEMAT, Câmpus de Tangará da Serra – MT.

Jeus JF, et al. Alerta e orientação aos Gestores do SUS e Profissionais de Saúde sobre a importância da vigilância e prevenção das febres hemorrágicas por arnavírus no estado do Mato Grosso. In: Mato Grosso. **NOTA INFORMATIVA Nº 01/2018 - Gerência de Doenças e Agravos Endêmicos da SES/MT.** Cuiabá: SES, 2018.

4.3.2. Alerta sobre infecções por arnavírus nas Américas – Organização Pan Americana de Saúde

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.4.** Restituir os resultados para os serviços de saúde visando à incorporação de ações de prevenção e controle das arenavirose à vigilância integrada das doenças transmitidas por roedores, como hantavirose, peste e leptospirose, em conjunto com as ações já implantadas pelo Brasil sem miséria.

Objetivo específico:

- ✓ Elaborar notas técnicas e/ou informativos para profissionais da área da saúde e do meio ambiente visando esclarecer, com foco na prevenção, sobre a possibilidade de ocorrência da arenavirose e sua associação com roedores, de maneira que a doença possa ser reconhecida com a realização do diagnóstico e tratamento precoces

Situação: em revisão junto á OPAS.

Febres hemorrágicas e outras infecções causadas por mammarenavírus nas Américas

Considerando o cenário atual das Américas com a emergência do vírus Zika e a re-emergência da febre amarela assim como a instabilidade sócio econômica de alguns países da América Latina, recomenda-se aos Estados membros que permaneçam vigilantes quanto aos casos de febres hemorrágicas ou outras infecções associadas aos arenavírus.

Os arenavírus são membros da família Arenaviridae, recentemente dividida em dois gêneros, Reptararenavirus e Mammarenavirus, que são constituídos por 30 espécies virais reconhecidas, das quais somente os mammarenavírus apresentam importância para saúde humana.

FEBRES HEMORRÁGICAS POR ARENAVÍRUS NAS AMÉRICAS

Nas Américas existe uma grande diversidade de mammarenavírus assim como de roedores reservatórios e, neste cenário, cinco vírus se destacam: (i) vírus Junín, agente etiológico da **Febre Hemorrágica Argentina (FHA)**, que historicamente acometia aproximadamente 3.500 indivíduos anualmente, com uma mortalidade de 15% a 30%. No entanto, após a instituição de uma vacina de vírus atenuado, a epidemiologia da FHA mudou drasticamente e, atualmente, em torno de 23 casos anuais da doença são notificados. A incidência dessa doença é maior durante o período de colheita, afetando principalmente homens entre 15-59 anos que realizem algum tipo de atividade agrícola. Desde sua descoberta em 1955, as áreas de abrangência da doença vêm se expandindo de 16.000 km² para 150.000 km², com mais de três milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, segundo dados disponibilizados pelo governo Argentino. Na Argentina, reuniões do *Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina* ocorrem anualmente e medidas envolvendo estabelecimento de um banco de plasma imune para o tratamento da FHA e imunização de populações residentes em áreas de risco já foram estabelecidas; (ii) vírus Machupo, causador da **Febre Hemorrágica Boliviana (FHB)** - descrita em 1959 em comunidades isoladas no oeste da Bolívia, somente em 1963 foi isolado de amostras de fígado de um paciente. Entre 1976 a 1993 nenhum caso foi notificado, mas a partir de 1994 a doença reemergiu e, desde então, pequenos surtos continuam ocorrendo, principalmente em regiões agrícolas; (iii) vírus Guanarito, agente etiológico da **Febre Hemorrágica Venezuelana (FHV)**, foi identificado durante um surto de febre hemorrágica grave em 1989, na Venezuela, identificado em moradores de regiões rurais. Nos anos de 1992 a 2002 houve uma diminuição do número de casos da doença, apesar da constante circulação do vírus em ciclos enzoóticos. Em 2002

novos surtos foram identificados e, desde então, casos esporádicos de FHV ocorrem na região central do país; (iv) vírus Sabiá (SABV), agente etiológico da **Febre Hemorrágica Brasileira (FHBr)**, foi isolado de um caso fatal ocorrido no estado de São Paulo no ano de 1990. Dois casos adicionais de FHBr ocorreram durante a manipulação de isolados virais no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA). O reservatório deste vírus ainda não foi identificado; (v) vírus Chapare, que assim como o SABV, foi identificado a partir de amostras de um único caso fatal, em 2008, na Bolívia, cujo reservatório natural, até o momento, ainda é desconhecido. Há relatos de associação de casos de FHA causada pelo vírus Ocozocoautla de Espinosa no México e pelo vírus Whitewater Arroyo nos EUA.

Os reservatórios naturais dos mammarenavírus são roedores, com exceção do vírus Tacaribe que foi encontrado em morcegos do gênero *Artibeus*. Diferentes espécies de roedores das subfamílias Sigmodontinae e Neotominae são infectados por mammarenavírus do Novo Mundo.

Os ciclos enzoóticos na natureza são mantidos através de transmissão horizontal por exposição de animais suscetíveis às excretas infectadas, a partir da transmissão vertical e principalmente por encontro agonísticos entre esses animais. Os roedores, considerados reservatórios primários, na dependência da espécie viral envolvida e da idade em que o animal foi infectado, podem apresentar: (i) uma infecção crônica, com capacidade de transmitir o vírus vertical e horizontalmente, ou (ii) podem eliminar a infecção a partir de uma resposta imune efetiva contra o vírus.

Acredita-se que a exposição humana aos arenavírus ocorre, principalmente, a partir da inalação de aerossóis contendo partículas virais procedentes de urina, fezes ou saliva de roedores silvestres infectados, ou mordeduras. Existem relatos de transmissão pessoa-pessoa, por contato íntimo ou por infecção nosocomial e por transplante de órgãos. Pessoas com contato direto ou indireto com vida silvestre, trabalhadores rurais, operadores de tratores ou máquinas de colheitas, profissionais de saúde e laboratoristas são particularmente susceptíveis a infecções por arenavírus.

Situação atual

Nas Américas existe um silêncio em relação às infecções por arenavírus apesar dos casos reportados na Argentina, Bolívia, Brasil, EUA e Venezuela. Assim, casos de febres hemorrágicas por arenavírus continuam a ser confirmados na Argentina, numa média de 25 a 30 casos por ano, esporadicamente na Bolívia e Venezuela. No entanto, a crescente evidência da circulação desses vírus em diferentes países do continente vem chamando atenção, com

estudos que comprovam a circulação desses vírus em roedores no México, na Colômbia e na Guiana Francesa, além da detecção viral em novas áreas nos EUA e no Brasil.

Considerando o número de doenças endêmicas de grande impacto quantitativo, sob o ponto de vista de saúde pública, como a malária, dengue e a febre amarela, é muito provável, em decorrência da semelhança clínica, que casos de febre hemorrágica por mammarenavírus não estejam sendo identificados. Estudos conduzidos na Colômbia vêm identificando infecção por mammarenavírus em pacientes com suspeita clínica inicial de malária, assim como a circulação deste agente viral em populações indígenas do país. No Brasil, no México e na Guiana Francesa um crescente número de evidências quanto à circulação desses vírus em roedores tem sido reportado na última década, enquanto que em Trinidad e Tobago morcegos infectados por mammarenavírus vêm sendo identificados.

É preciso chamar a atenção quanto à detecção do vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) em roedores na Colômbia e na Guiana Francesa, além de surtos reportados nos EUA e da já conhecida circulação na Argentina. O LCMV representa um risco para saúde humana, principalmente de indivíduos imunossuprimidos e mulheres grávidas. Esse vírus tem como reservatório *Mus musculus*, espécie de roedor que se encontra distribuída globalmente e presente no ambiente urbano e no peridomicílio. Considerado um vírus emergente associado com infecção em indivíduos transplantados, LCMV deve ser incluído também como um dos agentes associados com malformações congênitas. Assim, diante do recente cenário epidemiológico, no qual foi intensificada a vigilância de casos de distúrbios neurológicos, em especial da microcefalia decorrente da infecção pelo vírus Zika nas Américas, LCMV deve ser investigado, além de outras causas conhecidas como herpes, toxoplasmose e sífilis.

RECOMENDAÇÕES

Frente às informações apresentadas, recomenda-se que todos os países membros das Américas intensifiquem a vigilância de casos de infecção por mammarenavírus, pautando-se principalmente na detecção, investigação e controle dos casos.

Vigilância

A vigilância das infecções por arenavírus em áreas silenciosas deve fazer parte de um sistema abrangente de vigilância sindrômica febril envolvendo componentes clínicos e laboratoriais. Os mammarenavírus, considerando o histórico do paciente, devem ser incluídos no diagnóstico diferencial de malária, dengue, febre amarela e síndrome pulmonar por hantavírus, entre outros agravos. A detecção de um único caso em uma área que não era

conhecida por ter infecções por arnavírus deve desencadear uma avaliação epidemiológica abrangente, incluindo a análise de fatores de risco / exposição e uma avaliação ecológica / ambiental para a identificação dos potenciais animais reservatórios visando, subsequentemente ao desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da doença na região.

Com o aumento de número de casos em qualquer área onde a transmissão de arnavírus é conhecida, preconiza-se desencadear uma investigação epidemiológica e principalmente ecológica/ambiental como uma oportunidade de expandir o conhecimento sobre o vírus.

Alerta-se também para a vigilância de casos importados de áreas endêmicas devido ao grande fluxo de pessoas nas Américas motivadas por lazer, trabalho, oportunidades em geral ou distúrbios sociais. A migração de pessoas pode não só ocasionar o deslocamento do patógeno, mas também dos animais reservatórios, introduzindo novos focos da doença em diferentes regiões das Américas.

Manejo dos casos

A possibilidade de se realizar o diagnóstico precoce da doença, cujo quadro clínico inicial é inespecífico e semelhante a outros agravos, é muito reduzida, especialmente quando a mesma é totalmente desconsiderada pelo serviço de saúde em períodos de epidemia de dengue ou febre amarela, por exemplo, conforme mencionado anteriormente. Com espectro clínico amplo, caracterizado por febre associada com mialgia, cefaleia retro-ocular, fotofobia, epigastralgia, entre outras manifestações, a febre hemorrágica por mammarenavírus evolui com hemorragia, com ou sem sinais neurológicos. Geralmente o paciente apresenta um quadro infeccioso de evolução rápida e grave, com desfecho fatal a partir do sétimo dia de doença.

Para aumentar a suspeita clínica, deve-se usar uma combinação de fatores: (i) sensibilização dos profissionais de saúde quanto à possibilidade de ocorrência das arnaviroses (ii) levantamento minucioso dos dados epidemiológicos quanto à possível exposição dos casos prováveis, (iii) disponibilização do diagnóstico laboratorial para arnaviroses pela rede de vigilância do país.

O tratamento clínico efetivo depende, em grande parte, da administração cuidadosa de medicamentos intravenosos soluções, monitoramento hemodinâmico e suporte. Dada a rápida progressão das febres hemorrágicas por mammarenavírus, casos graves devem ser transferidos imediatamente para unidades de terapia intensiva (UTI). O uso de ribavirina nos primeiros dias parece reduzir a letalidade da doença. A transfusão de plasma imune nos

primeiros dias da doença reduziu a letalidade dos casos de FHA, mas não está disponível para outras arenaviroses.

Prevenção e controle

As estratégias de prevenção e controle devem ser focadas na conscientização dos profissionais de saúde visando aumentar a detecção e o tratamento oportuno da doença. Na detecção de casos ou surtos, campanhas e ações devem ser voltadas para a população com objetivo de reduzir o contato das pessoas com os roedores. As medidas devem ser adaptadas às realidades locais. As medidas preventivas devem abranger os riscos relacionados às atividades de trabalho (agricultores) e ao lazer (ecoturismo) incluindo as pessoas que se envolvem em atividades ao ar livre, como camping ou caminhadas.

A implementação de gestão ambiental integrada, com o objetivo de realizar coleta de animais para investigação da presença do vírus de forma preventiva também deve ser estimulada.

A única vacina em uso no momento é a Candid#1 do vírus Junín atenuado e tem sido utilizada exclusivamente nas áreas endêmicas da Argentina. Em estudos experimentais a vacina também apresentou bons resultados na prevenção de infecções pelo vírus Machupo.

REFERÊNCIAS

- Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, Rodas JD. [Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Urabá (Antioquia), Colombia]. *Biomedica*. 2013 Sep;33 Suppl 1:99-107.
- Bisordi I, Levis S, Maeda AY, Suzuki A, Nagasse-Sugahara TK, de Souza RP, Pereira LE, Garcia JB, Cerroni Mde P, de A e Silva F, dos Santos CL, da Fonseca BA. Pinhal Virus, a New Arenavirus Isolated from *Calomys tener* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015 Nov;15(11):694-700.
- Briggiler A, Sinchi A, Coronel F, Sánchez Z, Levis S, Taylor J, Enria D. Los nuevos escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica Argentina desde la introducción de la vacuna a virus junín vivo atenuado (Candid#1): una experiencia en trabajadores golondrinas. *Rev Peru Med Exp y Salud Publica*. 2015 32(1), 165-171.
- Cajimat MN, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF. Ocozocoautla de espinosa virus and hemorrhagic fever, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2012 Mar;18(3):401-5.

Cajimat MN, Milazzo ML, Mauldin MR, Bradley RD, Fulhorst CF. Diversity among Tacaribe serocomplex viruses (Family Arenaviridae) associated with the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*). *Virus Res.* 2013 Dec 26; 178(2):486-94.

Castellar A, Guevara M, Rodas JD, Londoño AF, Arroyave E, Díaz FJ, Levis S, Blanco PJ. [First evidence of lymphocytic choriomeningitis virus (Arenavirus) infection in *Mus musculus* rodents captured in the urban area of the municipality of Sincelejo, Sucre, Colombia]. *Biomedica.* 2017 Apr 1;37(0):75-85.

Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, Barreto-Vieira DF, Terças ACP, Teixeira BR, da Silva MAN, Caldas GC, de Oliveira Coelho JMC, Barth OM, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ERS. Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Trop.* 2017 Dec 5; 179:17-24.

Fernandes J, de Oliveira RC, Guterres A, de Carvalho Serra F, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Cunha RV, Levis S, de Lemos ER. Co-circulation of Clade C New World Arenaviruses: New geographic distribution and host species. *Infect Genet Evol.* 2015 Jul; 33:242-5.

Inizan CC, Cajimat MN, Milazzo ML, Barragán-Gomez A, Bradley RD, Fulhorst CF. Genetic evidence for a tacaribe serocomplex virus, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jun; 16(6):1007-10.

Knust B, Ströher U, Edison L, Albariño CG, Lovejoy J, Armeanu E, House J, Cory D, Horton C, Fowler KL, Austin J, Poe J, Humbaugh KE, Guerrero L, Campbell S, Gibbons A, Reed Z, Cannon D, Manning C, Petersen B, Metcalf D, Marsh B, Nichol ST, Rollin PE. Lymphocytic choriomeningitis virus in employees and mice at multipremises feeder-rodent operation, United States, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014 Feb; 20(2):240-7.

Lavergne A, de Thoisy B, Donato D, Guidez A, Matheus S, Catzefflis F, Lacoste V. Patawa Virus, a New Arenavirus Hosted by Forest Rodents in French Guiana. *Ecohealth.* 2015 Jun; 12(2):339-46.

Lavergne A, de Thoisy B, Tirera S, Donato D, Bouchier C, Catzefflis F, Lacoste V. Identification of lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus in house mouse (*Mus musculus*, Rodentia) in French Guiana. *Infect Genet Evol.* 2016 Jan; 37:225-30.

Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 May-Jun; 43(3):229-33.

Malmlov A, Seetahal J, Carrington C, Ramkisson V, Foster J, Miazgowiec KL, Quackenbush S, Rovnak J, Negrete O, Munster V, Schountz T. Serological evidence of arenavirus circulation among fruit bats in Trinidad. *PLoS One.* 2017 Sep 27;12(9):e0185308.

Mattar S, Guzman C, Arrazola J, Soto E, Barrios J, Pini N, Levis S, Salazar-Bravo J, Mills JN. Antibody to arenaviruses in rodents, Caribbean Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jul; 17(7):1315-7.

Milazzo ML, Cajimat MN, Mauldin MR, Bennett SG, Hess BD, Rood MP, Conlan CA, Nguyen K, Wekesa JW, Ramos RD, Bradley RD, Fulhorst CF. Epizootiology of Tacaribe serocomplex viruses (Arenaviridae) associated with neotomine rodents (Cricetidae, Neotominae) in southern California. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015 Feb; 15(2):156-66.

Milazzo ML, Campbell GL, Fulhorst CF. Novel arenavirus infection in humans, United States. *Emerg Infect Dis.* 2011 Aug; 17(8):1417-20.

Restrepo B, Rodas JD, Montoya-Ruiz C, Zuluaga AM, Parra-Henao G, Agudelo-Flórez P. [Serological evidence of *Leptospira* spp., dengue, hantavirus and arenavirus infection in Embera-Katío indigenous population, Colombia]. *Rev Chilena Infectol.* 2016 Aug; 33(4):472-473.

Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, DeRisi JL, Emonet S, Gonzalez JP, Kuhn JH, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V, Salvato MS, Stenglein MD, de la Torre JC 2015. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol* 160: 1851-1874.

Sabino-Santos G Jr, Maia FG, Jonsson CB, Goodin DG, Salazar-Bravo J, Figueiredo LT. Serologic Evidence of Mammarenaviruses among Wild Rodents in Brazil. *J Wildl Dis.* 2016 Jul; 52(3):766-9.

4.3.3. Folder sobre prevenção de doenças transmitidas por roedores

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.4.** Restituir os resultados para os serviços de saúde visando à incorporação de ações de prevenção e controle das arenavirose à vigilância integrada das doenças transmitidas por roedores, como hantavirose, peste e leptospirose, em conjunto com as ações já implantadas pelo Brasil sem miséria.

Objetivo específico:

- ✓ Elaborar materiais informativos e educativos para comunidade agrícola das regiões estudadas com foco na prevenção de doenças transmitidas por roedores.



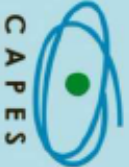
Como sei se tenho ratos em casa?

- ❖ Barulhos como sons de roer, corridas e guinchos.
- ❖ Fezes em cantos e próximo a alimentos.
- ❖ Buracos no chão, cantos de paredes e muros.
- ❖ Presença de portas, móveis, roupas, parapetos e alimentos roídos.
- ❖ Ninhos feitos de papel roído, trapos e pelos.
- ❖ Animais (cães e gatos) inquietos, principalmente próximo a buracos ou locais de armazenamento de alimentos.
- ❖ Estes sinais podem estar presentes no interior da casa, forros, dentro de armários e eletrodomésticos como fogões e geladeiras.
- ❖ Estes animais também podem estar presentes em anexos da casa como patios, canis, estábulos e galinheiros.

Patrocinadores



Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses



CAPES



Endereços Importantes:

Endereço do LHR:

Avenida Brasil, 4365 – Manginhos – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 21045-900
Pavilhão Helio e Peggy Pereira, 4º andar, sala B116 – Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ – TEL/Fax: (021) 2562-1897
lhr@ioc.fiocruz.br e
elemos@ioc.fiocruz.br

Endereços na Internet:

Fiocruz: www.fiocruz.br
IOC: www.ioc.fiocruz.br
Ensino do IOC: <http://ensino.ioc.fiocruz.br>
Intranet IOC: <https://intranet.ioc.fiocruz.br/>
Elaboração: Jorlan Fernandes
Aprovação: Drª Elba Lemos
Designer: Angélica Mares-Guia

Doenças transmitidas por roedores



Doenças transmitidas por roedores

Estou doente e o rato com isso?

Roedores são responsáveis pela transmissão, através de mordidas e contato com urina e fezes, de diversas doenças como a leptospirose, a peste, a hantavirose e a arenavirose, entre outras doenças já identificadas no Brasil.

Onde eles vivem?

Roedores podem aparecer em qualquer lugar onde encontre alimentos, água e abrigo. Pode fazer ninhos dentro e ao redor das casas, locais de armazenamento de alimento e ração e também nas plantações, principalmente de grãos como milho, soja, arroz e canaviais.



Como evito que os roedores entrem em casa?



Dentro de casa, coloque toda a comida em sacos ou caixas fechadas numa altura de pelo menos 40 cm do chão.



Guarde os alimentos em recipientes fechados e sempre lave os pratos e utensílios de cozinha imediatamente depois de usá-los.

Não deixe restos de alimentos no chão.

Jogue no lixo qualquer alimento roído.

Coloque o lixo ensacado em latas bem fechadas em locais altos para ser recolhido depois.



Caso esse serviço não esteja disponível, enterre o lixo ensacado.

Não jogue lixo em riachos, valas ou na mata.

Não deixe mato próximo à sua residência. O plantio de capim e outros grãos deve ser feito a pelo menos 50 metros de distância da casa, paiol ou alojamento.



Mantenha a área em volta de casas, galpões e alojamentos sempre limpa.

Não acumule madeira, entulhos ou garratas. Caso seja necessário coloque as pilhas de lenha, ou outro produto em estruturas suspensas do chão.



Os pilares do paiol, depósitos de alimentos ou madeira, pelo menos a 70 cm do solo.

Mantenha o local onde vivem os animais sempre limpo, recolhendo sempre a sobra de comida.

Não deixe restos alimentares de animais no chão e recolha os comedouros no período noturno.



Mantenha jardins e quintais bem cuidados.

Fechem bem frestas de portas, janelas, caixas de gordura e de esgoto.

Tape todos os buracos em paredes, rodapés e telhas na casa, paiol e alojamentos.

Dicas úteis na prevenção de doenças

Cortar garratas pet (garratas plásticas de refrigerante ou água) e colocar com a bolsa virada para baixo. Assim os roedores não conseguem subir. O mesmo pode ser feito de latão ou outro material.



Evite descansar em locais fechados com restos de alimentos ou estoque de grãos ou rações.



Não descansa em baixo de máquinas de colheita!

Antes de entrar num local fechado a dias, **abra portas e janelas**. E só realize a limpeza após no **mínimo 1 hora**. **Não varra**, passe no chão pano molhado com água sanitária, sabão e água.

Não deixe calçados em locais expostos. Guarde-os em armários ou afastados do chão, evite que ratos possam urinar dentro deles.

4.3.4. Cartilha sobre prevenção de doenças transmitidas por roedores

Relação do manuscrito com os objetivos: Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao seguinte objetivo: **3.2.4.** Restituir os resultados para os serviços de saúde visando à incorporação de ações de prevenção e controle das arenavirose à vigilância integrada das doenças transmitidas por roedores, como hantavirose, peste e leptospirose, em conjunto com as ações já implantadas pelo Brasil sem miséria.

Objetivo específico:

- ✓ Elaborar materiais informativos e educativos para comunidade agrícola das regiões estudadas com foco na prevenção de doenças transmitidas por roedores.

ORLANDINHO EM

O ENIGMA DO RATO



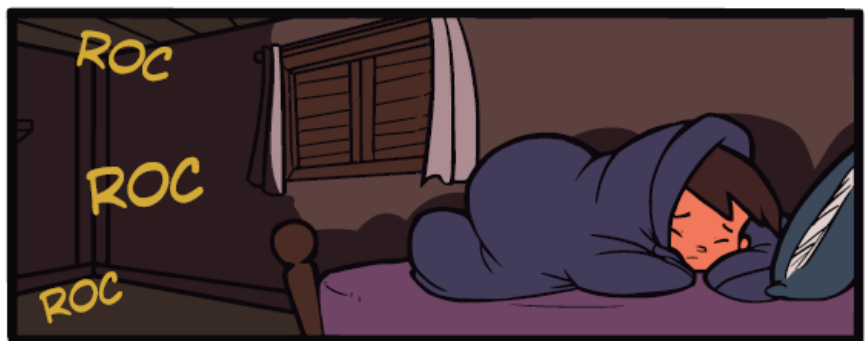


Esta cartilha foi concebida durante o desenvolvimento de um projeto de doutorado, alinhado ao Plano Brasil Sem Miséria (PBSM), pelo Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, com o apoio da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS).

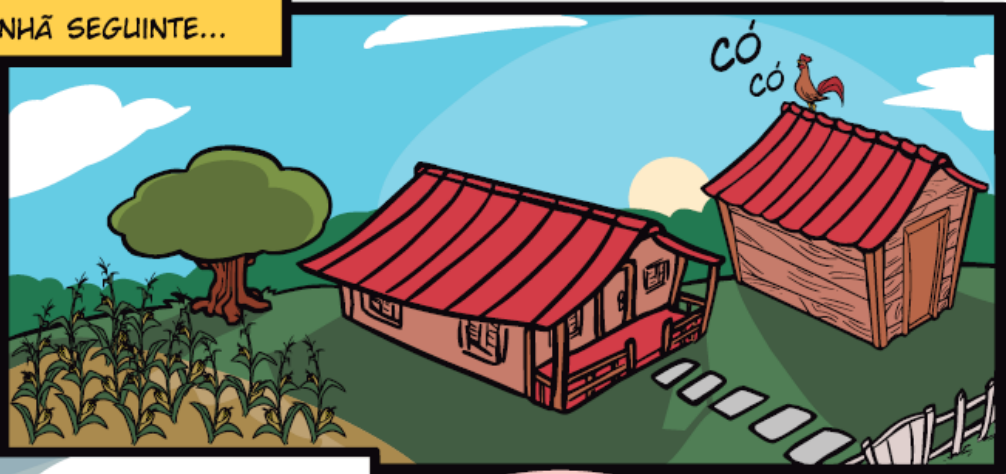
Visando alertar sobre a importância de se incluir a vigilância epidemiológica associada a zoonoses aos programas de incentivo à agricultura e à preservação ambiental, a cartilha conta uma história ambientada em uma comunidade rural, onde os personagens descobrem o impacto das atividades agrícolas na dinâmica de transmissão das doenças transmitidas por roedores como as hantavirose, arenavirose, leptospirose, peste, entre outras.

Com uma linguagem acessível e focada na prevenção das doenças citadas anteriormente, o conteúdo da cartilha traz informações sobre os cuidados que se deve ter com o armazenamento de alimento e ração, além de plantações, principalmente de grãos, como o milho e soja.

Na seleção dos personagens que compõem a cartilha, os autores buscaram levar em conta a importância da interface casa/escola como estratégia para incentivar a inclusão de informações básicas sobre doenças associadas com atividades agropecuárias no currículo das escolas locais.



NA MANHÃ SEGUINTE...



OH, MEU FILHO... ESTÁ
CANSADO? NÃO DORMIU
BEM?



NÃO DORMI NADA E A
SENHORA, MÃE?
CONSEGUI DORMIR?
EU OUVI UNS
BARULHOS A NOITE
INTEIRA. TINHA ALGUM
BICHO NA CASA.

DEVE TER SIDO UM
SONHO, ORLANDINHO.
NÃO OUVI BICHO
NENHUM.



AGORA
TOMA SEU
CAFÉ E VAI
AJUDAR
SEU PAI NA
LIDA QUE
HOJE É
SÁBADO.

ESSE
MENINO...



FOI VOCÊ, SEU DANADO?
VOCÊ COMEU A MINHA MEIA
NOVA QUE EU DEIXEI AQUI
ONTEM DE NOITE?



ESSE FURO É MUITO PEQUENO PRA
SER OBRA DO REX. VOCÊ DEVE TER
PRENDIDO NUM PREGO. DEIXA QUE
DOU UM JEITO NISSO MAIS TARDE.



DESCULPA, QUERIDA, MAS
HOJE TENHO MUITO
TRABALHO. MELHOR
COMEÇAR LOGO.



ORLANDINHO! VAMOS!

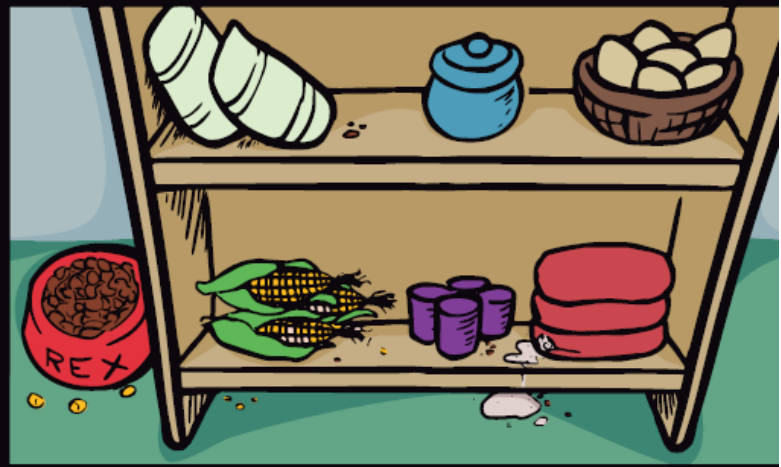
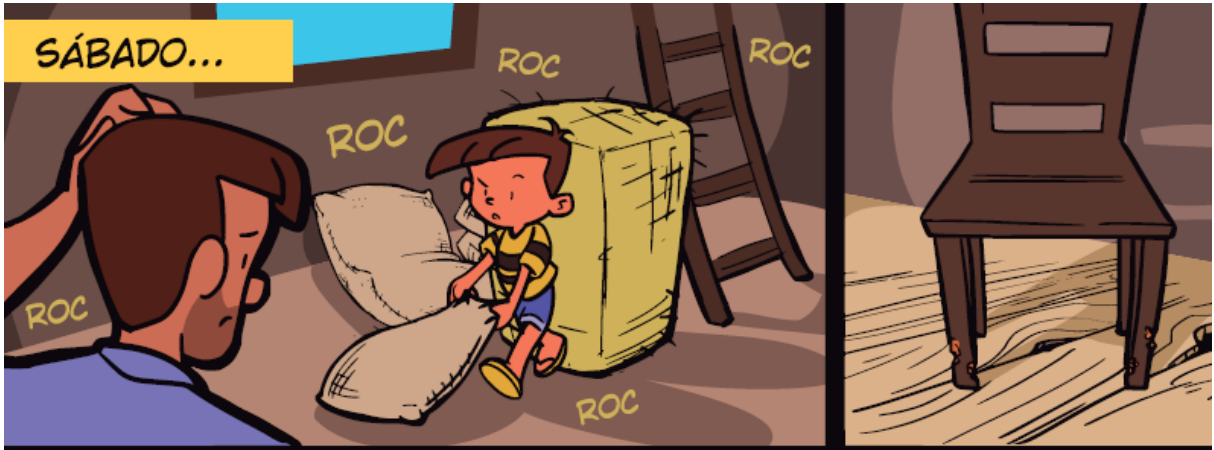
ORLANDINHO!!!



TCHAU, FILHO!

ATÉ MAIS TARDE!







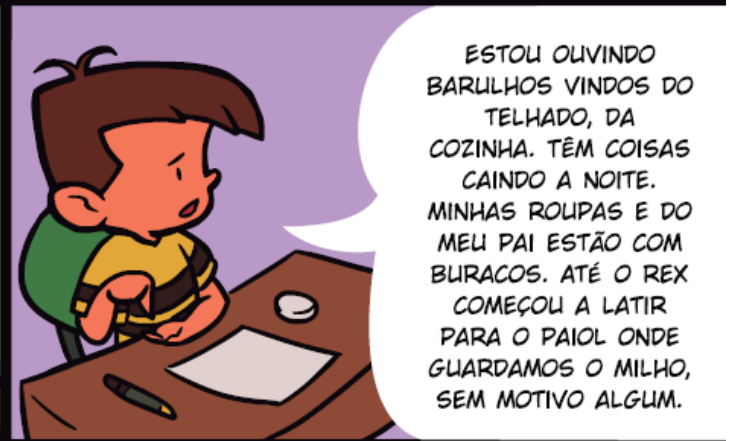
NO DIA SEGUINTE...



HEY, JERÔNIMO... ACHO QUE TEM ASSOMBRAÇÃO LÁ NA MINHA CASA.



POR QUE VOCÊ ACHA ISSO, ORLANDINHO?



ESTOU OLVINDO BARULHOS VINDOS DO TELHADO, DA COZINHA. TÊM COISAS CAINDO A NOITE. MINHAS ROUPAS E DO MEU PAI ESTÃO COM BURACOS. ATÉ O REX COMEÇOU A LATIR PARA O PAIOL ONDE GUARDAMOS O MILHO, SEM MOTIVO ALGUM.



TEM ALGUMA COISA MUITO ESTRANHA. ATÉ MEU TRABALHO DE BIOLOGIA APARECEU RASGADO. ATÉ PARECE CASA MAL ASSOMBRAADA...

ESTRANHO MESMO... SERÁ QUE NÃO FOI O REX?



TAMBÉM NÃO ACHO QUE SEJA O REX, MENINOS.



MAS O QUE A SENHORA ACHA QUE É, ENTÃO?

DEIXA EU VER O SEU DEVER DE CASA...



NÃO TENHO CERTEZA, MAS ACHO QUE SEI QUEM É O RESPONSÁVEL POR ISSO. NA VERDADE, DEVE SER MAIS DE UM... CONVERSAMOS DEPOIS DA AULA.

DEPOIS DA AULA...





MAS PROFESSORA! NÓS SOMOS LIMPINHOS. EU TRABALHO MUITO PARA MANTER TUDO ARRUMADO E LIMPO.



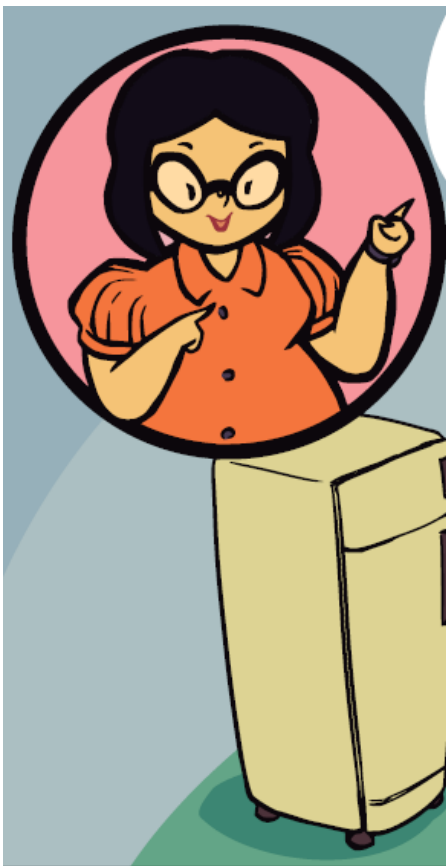
MAS ROEDORES PODEM APARECER EM QUALQUER LUGAR ONDE ENCONTREM ALIMENTOS, ÁGUA E ABRIGO. PODEM FAZER NINHOS DENTRO E AO REDOR DAS CASAS, LOCAIS DE ARMAZENAMENTO DE ALIMENTO E RAÇÃO E TAMBÉM NAS PLANTAÇÕES. PRINCIPALMENTE DE GRÃOS, COMO MILHO, SOJA, ARROZ E CANAVIAIS.



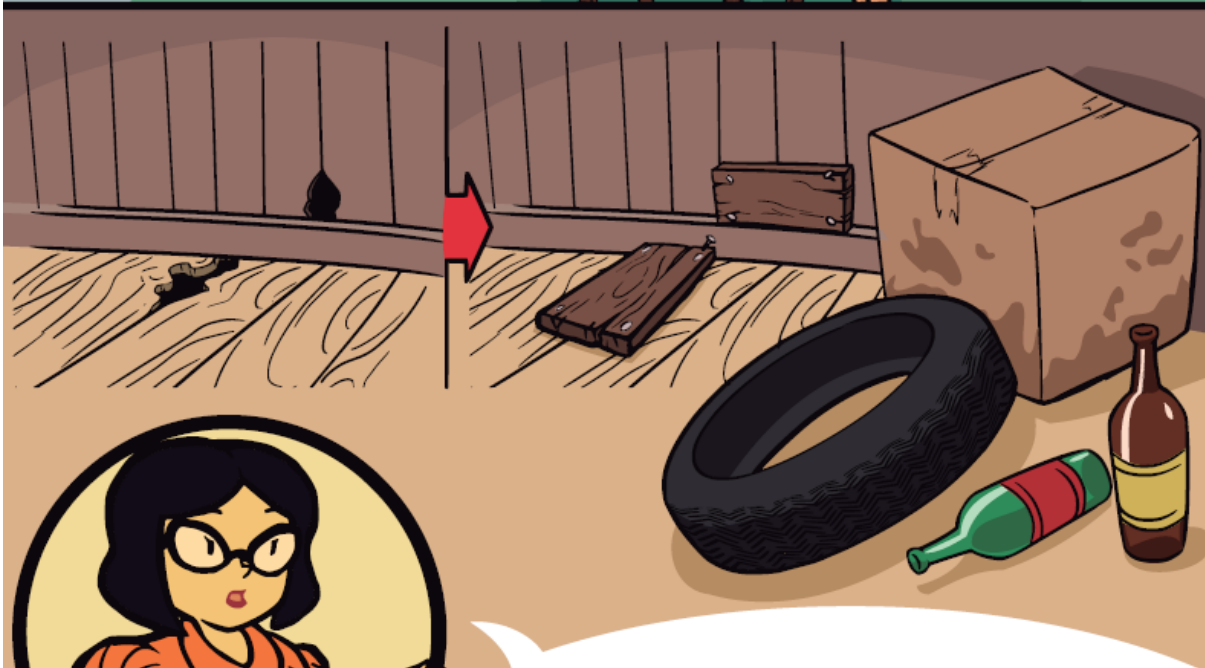
E COMO A GENTE FAZ PRA SE LIVRAR DELES, PROFESSORA?



RECENTEMENTE ESSE INFORMATIVO FOI ENTREGUE NA ESCOLA E ELE DIZ JUSTAMENTE O QUE PODEMOS E DEVEMOS FAZER PARA EVITAR A PRESENÇA DE ROEDORES EM NOSSAS CASAS, ASSIM COMO FORMAS PARA EVITAR CONTRAIR DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ELAS. TROUXE UMA CÓPIA PRA VOCÊS. VAMOS LER JUNTOS?



DENTRO DE CASA, É PRECISO COLOCAR TODA A COMIDA EM SACOS OU POTES BEM FECHADOS E NUMA ALTURA DE PELO MENOS 40 CENTÍMETROS DO CHÃO. LIMPAR OS PRATOS E UTENSÍLIOS ASSIM QUE USÁ-LOS TAMBÉM É ESSENCIAL E NUNCA DEIXAR RESTOS DE ALIMENTOS NO CHÃO.



LEMBREM-SE DE TAPAR TODOS OS BURACOS EM PAREDES, RODAPÉS E TELHAS NA CASA. POR FALAR EM CASA, MANTENHA A ÁREA EM VOLTA DELA, GALPÕES OU ALOJAMENTOS SEMPRE LIMPA, SEM MATO, PNEUS VELHOS OU ENTULHOS.

VALE LEMBRAR TAMBÉM QUE NUNCA DEVEMOS DESCANSAR EM LOCAIS FECHADOS COM RESTOS DE ALIMENTOS E GRÃOS, E AO VENTILAR E LIMPAR ESSES LOCAIS, PRECISAMOS DE MÁSCARAS RESPIRATÓRIAS COM FILTRO P3...



ASSIM COMO PRECISAMOS MANTER O LOCAL ONDE OS ANIMAIS VIVEM SEMPRE LIMPO, RECOLHENDO TODA A SOBRA DE COMIDA. É IMPORTANTE TAMBÉM ENTERRAR O NOSSO LIXO CASO NÃO HAJA RECOLHIMENTO E MANTER O PLANTIO DE CAPIM E OUTROS GRÃOS AFASTADOS DAS CASAS.

ESSES BICHOS SÃO PERIGOSOS, NÉ NÃO PROFESSORA? TRAZEM DOENÇAS COM ELES. LEMBRO QUE MEU AVÔ FICOU MUITO DOENTE UMA VEZ E MINHA MÃE DISSE QUE ELE PEGOU A DOENÇA DO RATO... A TAL DA LECTO... LEPTO...



LEPTOSPIROSE, E É VERDADE, JERÔNIMO. RATOS PODEM TRANSMITIR MUITAS DOENÇAS, COMO A HANTAVIROSE, A LEPTOSPIROSE, A ARENAVIROSE E MUITAS OUTRAS. TEMOS QUE TOMAR CUIDADO TAMBÉM COM SUAS PULGAS E CARRAPATOS...



MAS TEMOS QUE ENTENDER QUE OS RATOS TAMBÉM FAZEM PARTE DO NOSSO ECOSSISTEMA E NÓS AQUI DO INTERIOR QUE ESTAMOS INVADINDO O AMBIENTE DELES, QUANDO ABRIMOS NOSSO ROÇADO PARA PLANTAR E SERVIR DE PASTO PARA OS ANIMAIS.

ENTÃO TEMOS QUE APRENDER A CONVIVER COM ELES, EVITANDO QUE ENTREM EM NOSSAS CASAS, GALINHEIROS, PAIOIS... ASSIM A GENTE NÃO FICA DOENTE.



SIM! MAS É IMPORTANTE TAMBÉM TER ALGUNS CUIDADOS COMO NÃO DESCANSAR EM LOCAIS FECHADOS QUE TENHAM RESTOS DE ALIMENTOS OU ESTOQUE DE GRÃOS OU RAÇÕES.



ESSES SÃO LUGARES ONDE OS ROEDORES FICAM. TAMBÉM É PRECISO MANTER LIMPO O TERRENO AO REDOR DESTES LOCAIS.



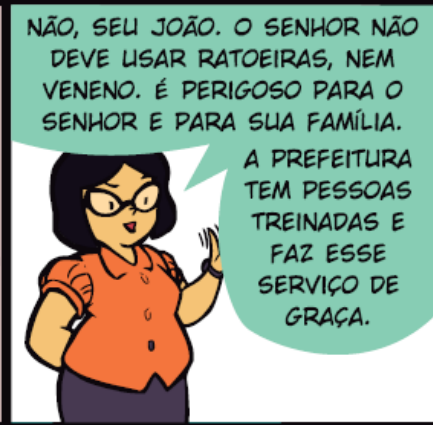
ENTÃO VOU LOGO LIMPAR O PAIOL!

PAI! VOCÊ CHEGOU!



ANTES DE ENTRAR NUM LOCAL FECHADO A DIAS, ABRA PORTAS E JANELAS, E SÓ REALIZE A LIMPEZA APÓS NO MÍNIMO UMA HORA. NÃO VARRA A POEIRA! PASSE PANO MOLHADO COM ÁGUA SANITÁRIA, SABÃO E ÁGUA.







Projeto / Coordenação

Jorlan Fernandes
Bernardo Teixeira
Elba R. S. de Lemos

Equipe técnica

Jorlan Fernandes
Bernardo Teixeira
Renata Carvalho de Oliveira
Paulo S. D'Andrea
Elba R. S. de Lemos

Colaboradores

Ana Riviere-Cinnamond
Jairo Mendez-Rico

Coordenação editorial

Joy Machs L. Q. Junior

Ilustrações

Weliton Matos



5. DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a dinâmica de infecções dos arenavírus em roedores e humanos no Brasil ainda é restrita. Ao iniciarmos o presente trabalho apenas quatro arenavírus eram reconhecidos em nosso território, a maioria descrita em trabalhos nas décadas de 1960 e 1970 (Pinheiro et al. 1966, 1977). Mesmo após relato do primeiro e único caso natural de febre hemorrágica brasileira (FHBr), descrita em 1990, pouco progresso ocorreu não somente no campo da virologia, mas também da identificação de potenciais reservatórios e da investigação de infecção em populações potencialmente sob risco de infecção (Machado et al. 2010). Assim, esse trabalho preenche uma lacuna importante no conhecimento das febres hemorrágicas virais no Brasil.

Neste contexto, com os resultados obtidos a partir do desenvolvimento desta pesquisa percebe-se uma mudança drástica do cenário brasileiro das arenaviroses. O número de vírus detectados passou de quatro para 10, o número de roedores reservatórios distribuídos em sete estados da federação, chegou a 12, com evidências de infecções humanas em cinco deles. Estes resultados serão discutidos seguindo os três eixos descritos previamente na seção anterior.

5.1. Detecção e caracterização de mammarenavírus em animais silvestres

Um foco importante foi dado à família *Arenaviridae* após a descrição desses vírus em serpentes com características genéticas diferentes dos demais membros do grupo (Stenglein et al. 2012, Hetzel et al. 2013). Como resultado disso, nos últimos anos um crescente número de arenavírus têm sido identificados, principalmente nos continentes africano e asiático, são mais de 10 espécies reconhecidas num período de cinco anos (Cajimat et al., 2012; 2013; Bisordi, 2015; Radoshitzky et al. 2015; Li et al., 2015; Lavergne et al., 2015; Gryssels et al., 2015; Witkowski et al., 2015). Apesar do enorme entusiasmo observado na última década nas pesquisas envolvendo arenavírus, novas descobertas sobre arenavírus nas Américas ficaram restritas à América do Norte, com poucos relatos provenientes dos países da América latina.

O silêncio epidemiológico das arenaviroses no Brasil é desproporcional à sua biodiversidade especialmente no que se refere aos roedores, principais reservatórios dos arenavírus. No Brasil, novas espécies da ordem Rodentia foram reconhecidas, descritas e até reclassificadas. Cerca de 71 gêneros e 235 espécies de roedores foram encontrados no Brasil (Oliveira et al. 2014). A família Cricetidae é a mais diversificada, com 117 espécies e 36 gêneros agrupados na subfamília Sigmodontinae, que inclui todos os hospedeiros arenavírus

identificados no América do Sul (Oliveira & Bonvicino, 2006, Reis et al. 2006). Esta ampla diversidade de Sigmodontinae é encontrada em todos os ecossistemas brasileiros: Amazônia, Cerrado, da Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal. Nestas diferentes regiões, é possível encontrar, em relação ao uso do habitat, espécies de roedores generalistas e restritas (Carvalho de Oliveira et al. 2014, Yahnke 2006).

Na maioria do território brasileiro, todos os biomas acima mencionados sofreram uma fragmentação rápida, evento que pode afetar a capacidade das espécies de roedores de se espalharem pela paisagem e levar ao deslocamento de algumas espécies com substituição por outras (Myers et al. 2000, Ribeiro et al. 2009). Esta situação ameaça a grande diversidade e muitos endemismos desses biomas, afetando assim a dinâmica de transmissão de arenavírus.

Tendo em vista a diversidade descrita acima e a defasagem do conhecimento sobre os reservatórios de arenavírus no Brasil, realizamos a pesquisa de fragmentos do genoma dos mammarenavírus em roedores silvestres de estudos que envolveram coletas nos estados do Acre, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Tocantins. Foram analisados 488 roedores, incluídos nos trabalhos apresentados na seção 4. Foi constatada a amplificação do material genético de mammarenavírus em 49 roedores de oito espécies diferentes, provenientes de cinco estados, Acre, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Todos os estados mencionados não possuíam evidências prévias da circulação de arenavírus em roedores, uma vez que as descrições desses vírus se restringiam ao norte do país e ao estado de São Paulo (Pinheiro et al., 1966, 1977, Bisordi et al. 2015, Sabino-Santos et al. 2016).

Neste contexto apresentado acima, é preciso considerar um aspecto importante; os roedores inseridos no estudo foram capturados os anos de 2003 a 2015 e assim não foi possível correlacionar ou mesmo estabelecer temporalidade entre os anos e as diferentes prevalências observadas nas áreas avaliadas. No entanto, apesar dos limites do presente desenho, os resultados obtidos apontam para a necessidade de mais pesquisas para um melhor entendimento da dinâmica de infecção nos ciclos enzoóticos dos mammarenavírus em diferentes populações de roedores no Brasil. Assim, é possível inferir que estudos longitudinais se fazem necessários, especialmente nos municípios de Aporé, Corumbá e Sidrolândia, onde encontramos maiores prevalências e co-circulação de diferentes espécies de mammarenavírus.

Quanto à ausência de animais infectados nos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina e Tocantins, pode ser justificada pelo pequeno número de animais incluídos no estudo – 02, 02 e 17 -, respectivamente -, incluindo apenas espécies específicas de roedores. É pertinente ressaltar que existem relatos de um surto de febre hemorrágica que poderia estar associado

aos arenavírus no estado do Rio de Janeiro, mas sem comprovação laboratorial (Tuboi et al. 2001). É importante e necessário registrar que todos os vírus descritos no presente estudo são ou (i) espécies sem relato de descrição prévia no Brasil ou (ii) novas espécies virais.

O primeiro grupo dos mammarenavirus faz referência aos membros da Clade C do Novo Mundo, os vírus Latino (LATV) e Oliveros (OLVV), ambos descritos pela primeira vez em nosso território como descrito nos **Artigos 1 e 2**. O LATV foi detectado em duas espécies de roedores do gênero *Calomys*, em diferentes prevalências 67,8% em *C. callosus* do Mato Grosso do Sul e 9,5% em *C. callidus* no Mato Grosso. A diferença encontrada por esses estudos pode ser justificada por diferentes aspectos biológicos, virológicos e ambientais, ou mais provavelmente pelo conjunto dos mesmos. Condições ambientais como baixa oferta de alimentos, alta densidade populacional podem estar influenciando um maior número de encontros agonísticos entre *C. callosus*, assim como a infecção nessa espécie em particular pode estar ocorrendo de forma vertical (Peters et al. 1973). É preciso ressaltar que duas das três fêmeas grávidas capturadas no local, apresentavam infecção pelo LATV, fator que corrobora a alta prevalência encontrada. Estudos longitudinais são necessários para avaliar os padrões de infecções e os fatores envolvidos na dinâmica de infecção das diferentes espécies de *Calomys* nas diferentes localidades.

A detecção do OLVV em *N. lasiurus* aponta para uma maior dispersão territorial desse vírus nas Américas, considerando a ampla distribuição do roedor, fato corroborado pela detecção do vírus em *N. lasiurus* em Cassilândia (MS), dado este obtido no presente estudo (**Artigo 5**) e da evidência sorológica de roedores da mesma espécie infectados por mammarenavírus em São Paulo (Sabino-Santos et al. 2016). Futuras investigações em *N. lasiurus* podem levar à detecção de arenavírus em novas áreas. Uma característica da linhagem do vírus OLVV encontrada no Brasil é sua divergência na nucleoproteína (NP) com o protótipo do OLVV (11.2%), muito próxima ao ponto de corte recomendado pelo Comitê internacional de Taxonomia Viral de 12% de (ICTV). Para nos certificarmos da inclusão do vírus detectado em MS como linhagem do vírus OLVV realizamos uma análise com o segmento S completo, utilizando o PASC, o que resultou em 76,67 - 70,62% de similaridade com os vírus OLV [GenBank NC01248] e LAT [GenBank AF485259], corroborando seu status taxonômico descrito no **Artigo 1** do presente estudo.

Surpreendentemente, três novos mammarenavírus foram identificados neste estudo. O primeiro deles, o vírus Xapuri (XAPV) no roedor *Neacomys musseri* do estado do Acre, que representa o primeiro rearranjo de arenavírus detectado em condições naturais (**Artigo 3**). Sua posição filogenética entre as Clades B e C do Novo mundo é intrigante e aponta novamente para a necessidade de pesquisas de arenavírus em animais silvestres. Assim como a

recombinação detectada nos mammarenavírus da América do Norte, o XAPV provavelmente não é o único vírus a ser fruto deste processo e, desta forma, estudos futuros poderão descobrir um número maior de vírus relacionados (Archer & Rico-Hesse 2002, Charrel et al. 2003, Vezza et al. 1980). Provavelmente os eventos mencionados foram ocasionados por processo de infecção de um mesmo hospedeiro por múltiplos arenavírus conforme descrito por Irwin e colaboradores 2012. Mais uma vez os mammarenavírus do NV se apresentam como o grupo mais diverso dentro do gênero *Mammarenavirus*. Não obstante, outro resultado que também chama atenção é a composição de segmentos e proteínas do vírus XAPV, que curiosamente é uma combinação entre as Clades B e C do Novo mundo, reforçando a necessidade do sequenciamento completo dos arenavírus para uma melhor caracterização. Apesar de não estarem relacionados a casos de infecção humana, sabe-se que os vírus da Clade B utilizam os mesmos receptores celulares que os vírus do VM (vírus Lassa e LCM), o que pode ser indicativo da capacidade de infectar humanos (Borrow & Oldstone 1994). Diante do exposto, é preciso considerar que a adição de proteínas relacionadas a um vírus da Clade B, grupo que abriga os agentes etiológicos das febres hemorrágicas americanas (FHA), pode representar uma potencial ameaça, uma vez que diversos estudos vêm relacionando os fatores de virulência a proteínas como a RNA polimerase RNA dependente (RpRd) e a Matriz de Zinco (Z) (Shao et al. 2015).

Um segundo vírus caracterizado neste estudo foi o arenavírus Rio Preto, encontrado em *Oecomys* a partir da detecção de fragmentos de RNA genômico dos mammarenavírus em amostras de fígado conservadas em etanol 95-100%, de material testemunho que estava depositado por cerca de oito anos na coleção de mamíferos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Embora o dado seja muito interessante, não foi possível discutir com mais profundidade nos **Artigos 4 e 5** que se encontram na seção 4, devido à taxonomia complexa do gênero *Oecomys*.

Em um pequeno ensaio piloto constituído por 10 amostras sabidamente positivas para arenavírus, amplificadas pela RT-PCR e posteriormente sequenciadas, foi realizada a detecção dos arenavírus, de acordo com protocolo descrito por García e colaboradores (2000). A recuperação do RNA viral foi possível em 60% (6/10) dos fígados fixados em etanol, com a recuperação de fragmentos com tamanho aproximadamente de 1.000 pb. Em relação às quatro amostras, o insucesso na recuperação do RNA provavelmente foi decorrente do fato do etanol não ser capaz de inativar completamente as RNases, evento que pode ter prejudicado a análise de grandes fragmentos de RNA ou mesmo de moléculas completas (Esser et al. 1995, Su et al. 2004, Hu et al. 2005). Esses resultados devem ser investigados mais profundamente para que

os valores preditivos de detecção sejam obtidos em uma escala temporal e quantitativa, com a utilização de um grupo amostral maior.

Coleções de mamíferos em geral compreendem séries taxidermizadas, peles e esqueletos, espécimes fixados em meio líquido, tecidos destinados à extração de DNA (tecidos fixados em etanol, armazenados em freezers, -20° C), bem como outras preparações relacionadas (Lemos & D'Andréa, 2014). Apesar de pouco usual e de potencial subestimado, a utilização de tecido fixado em etanol já foi descrita na caracterização de vírus de RNA (Submicay et al. 2012, Gu et al. 2013, 2014). Na verdade o primeiro relato de hantavírus infectando morcegos foi realizado a partir de estudos envolvendo tecido (fígado) fixado em etanol de coleções de mamíferos africanos (Submicay et al. 2012).

Embora os resultados obtidos em material fixado em etanol devam ser avaliados com cuidado, principalmente no que se refere a análises de prevalência e de incidência de infecção, é preciso reforçar que a utilização desse material como meio de detecção da circulação de patógenos precisa ser considerada, como foi possível demonstrar nos **Artigos 4 e 5**. Neste contexto, não só foi possível recuperar dois arenavírus em material de coleção de *O. mattogrossae* e *O. franciscorum*, que foram coletados no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, mas também registrar os primeiros relatos da presença desses vírus no bioma Pantanal, reforçando a necessidade de mais estudos nessa região. Assim, além da identificação de dois novos arenavírus, com o presente estudo foi possível confirmar que a análise de material de arquivo pode e deve ser realizada como piloto com o objetivo, entre outros, de indicar áreas ou animais para os quais esforços de pesquisa devem ser direcionados.

Com a pretensão de chamar a atenção para sua importância, as coleções de animais constituem não só o testemunho da identidade das espécies, mas encerram também materiais inéditos que podem auxiliar nas diversas abordagens epidemiológicas e em estudos evolutivos de diferentes espécies de mamíferos ou mesmo, como no caso deste estudo, ser fonte para novos trabalhos, distintos das que os originaram. Por fim, é pertinente ratificar que estes pontos discutidos se tornam ainda mais relevantes e estratégicos quando se considera o custo relativamente baixo da preparação e manutenção do material já coletado frente ao alto custo para realização de trabalhos de campo.

O terceiro e último vírus detectado neste trabalho, descrito no **Artigo 5**, foi o vírus Aporé (APRV) em *O. mattogrossae*, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul. Este vírus altamente relacionado aos vírus Sabiá (SABV) e Chapare (CHPV), ambos agentes etiológicos de febres hemorrágicas, mas ainda sem descrição do animal reservatório (Lisieux et al. 1994, Delagado et al. 2008). APRV representa a evidência de que provavelmente esses vírus utilizam roedores como seus animais reservatórios. Devido às semelhanças entre APRV,

SABV e CHPV é possível que, caso a patogenicidade do novo vírus não seja comprovada, que o APRV possa servir como modelo de estudos ecológicos e virológicos para aumentar o conhecimento sobre arenavírus como o SABV e CHPV. Neste trabalho foi possível observar que o segmento S do APRV parece ser fruto da recombinação entre os vírus já citados nesse parágrafo. Diferentemente, dos demais membros do gênero *Mammarenavirus* para os quais os relatos de recombinação resultam em trocas completas de genes (geralmente o gen GPC) do segmento S, o APRV não possui um ponto único de recombinação (Archer & Rico-Hessen 2002). Assim, apesar do número considerável de sequências geradas para outros membros da Clade B (Junín, Machupo, Guanarito) não existe a descrição da ocorrência de eventos desse tipo nesse grupo de vírus e parece então não estar associado a um maior risco de emergência ou salto de hospedeiros (*spillover*) (Cajimat et al. 2009, Emonet et al 2009). Essa evidência parece reforçar o fato do roedor *O. mattograssae* também poder agir como hospedeiro para os vírus CHP e SAB, uma vez que para que eventos de recombinação aconteçam esses vírus precisariam infectar simultaneamente o mesmo animal.

É importante ressaltar que o estudo realizado no município de Cassilândia se deu a partir de um estudo de levantamento de fauna, em decorrência da implantação de uma hidroelétrica, a segunda no município. Assim há que se considerar que os impactos ambientais causados por esse tipo de empreendimento poderão levar a uma maior aproximação entre roedores e humanos, aumentando o risco e exposição ao APRV e a outros patógenos que possam estar circulando na região afetada (Carvalho de Oliveira et al. 2014, Mills et al. 1994, Mills & Childs 1998). Esse tipo de impacto ambiental também pode aumentar a taxa de contato entre os diversos grupos de animais, facilitando a transmissão de agentes infecciosos (Guterres & Lemos 2017). Deste modo, co-infecções de diferentes vírus em um mesmo roedor podem se tornar mais frequentes. É difícil avaliar o real impacto deste empreendimento nos ciclos de transmissão de patógenos, mas sua importância não deve e não pode ser desconsiderada. Mesmo assim, em nosso estudo essa foi a única região onde uma co-infecção entre arenavírus e hantavírus foi identificada (Guterres et al. 2014). É preciso observar que todas as demais amostras do presente estudo foram previamente avaliadas quanto à presença de hantavírus e que em nenhuma outra amostra a presença de infecção por esses dois vírus foi relatada. Fruto do impacto antrópico ou não, esta co-infecção representa um evento de grande importância, considerando a capacidade da geração de novos agentes virais de origem quimérica e seu consequente impacto totalmente desconhecido para saúde humana e animal.

Acredita-se que infecções simultâneas como a descrita acima podem ter sido o evento chave para o surgimento dos arenavírus de serpentes (Zapata & Salvato 2013). Assim, com

todos os questionamentos resultantes desta tese e, em consonância com outras pesquisas em execução no laboratório de Hantavirose e Rickettsioses (LHR), o **Artigo 6** foi concebido. Na tentativa de melhor entender a já reconhecida, mas pouco explorada relação entre os arenavírus e os bunyavírus (Kuhn et al. 2016). Além de reforçar as relações entre os arenavírus e os bunyavírus, especialmente os nairovírus, essa publicação também fomentou discussões junto ao ICTV, resultando na elaboração de uma proposta elaborada pelos grupos de discussão da família *Arenaviridae* e outros grupos correlatos, sugerindo a inclusão dos arenavírus na recém formada ordem Bunyvirales. Até a finalização desta tese a proposta se encontrava em avaliação.

Com os resultados apresentados o Brasil passa a ter destaque no cenário mundial, como o país com o maior número de mammarenavírus identificados em seu território e como o único país com circulação documentada das Clades A, B e C do Novo Mundo.

5.2 Estudos soroepidemiológicos em populações rurais

A saúde da população rural é condicionada a fatores sociais, raciais e de gênero, econômicos, tecnológicos e organizacionais relacionados ao perfil de produção e consumo, além de fatores de risco de natureza física, química, biológica, mecânica e ergonômica presentes nos diversos e específicos processos de trabalho (Kassouf 2005). É neste contexto que atua o programa Brasil sem miséria (PBSM). O número de indivíduos atendidos pelo PBSM nas regiões que fazem parte deste estudo variou de 10,5% da população do município de Jataí, GO até 50,5% em Acrelândia no Acre. O acesso a melhores condições de vida, saúde e segurança alimentar são questões primárias que precisam e devem ser sanadas. A desnutrição e/ou a falta de ferro podem agravar os casos de FHA, pelo aumento da expressão de receptores de transferrina humana (hTfR1), na tentativa de absorver uma maior quantidade de ferro, o que no caso de infecção por arenavírus facilita a entrada viral nas células (Shao et al. 2015). Assim, os resultados gerados pelo presente estudo, em todas as suas dimensões, ressaltam a importância de se vincular esses programas a atividades de vigilância em saúde, para o fortalecimento e manutenção do mesmo. Destaca-se, assim, a importância de informações específicas sobre a saúde das populações do campo e da floresta, possibilitando a identificação dos agravos relativos a essas populações.

Esta etapa do presente estudo vai de encontro a essa afirmativa, com a caracterização de um agravo de circulação silenciosa em populações rurais de diferentes regiões do Brasil. Um total de 1.099 amostras foi testado, resultando numa prevalência de 1,63% (18/1.099) para arenavírus. As localidades incluídas no estudo possuíam indivíduos reativos com

prevalências que variaram de 0,64% (3/466) em Goiás até 2,91% (6/206) no Acre. Apesar de todos estados terem sido selecionados com base na presença da circulação de arenavírus em roedores e que uma correlação geográfica e temporal não pode ser realizada, é importante salientar que todas as localidades apresentaram evidências sorológicas para infecção por arenavírus.

Em destaque se encontra o município de Acrelândia no Acre com a maior prevalência entre as quatro áreas estudadas. Há que se registrar que no Acre foram observadas as piores condições de moradia e, em especial no que se refere ao saneamento básico, justificando, desta forma, o alto nível de cobertura do PBSM no município. Uma menor prevalência para arenavírus foi encontrada coincidentemente no município de menor cobertura do PBSM. Os dados de cobertura do PBSM geralmente apontam para locais de maior vulnerabilidade social e biofísica. Assim, estes dados podem auxiliar na identificação de locais onde as atividades de vigilância e prevenção de doenças associadas a roedores precisam ser intensificadas, com ações sustentáveis de incentivo à agricultura familiar em específicas regiões rurais.

Embora as arenaviroses façam parte da lista de doenças de notificação compulsória imediata desde 2016, não existem normativas ou manuais com indicações sobre como realizar o manejo clínico do paciente e sobre o diagnóstico laboratorial. É preciso também registrar que não existem kits comerciais disponíveis para o diagnóstico sorológico das arenaviroses do NM e que as técnicas moleculares são específicas, detectando, na maioria das vezes, espécies específicas de arenavírus, não sendo, portanto, adequadas ao cenário brasileiro onde ocorre a circulação de múltiplas espécies de patogenicidade desconhecida.

Em relação à sensibilidade e à especificidade dos testes sorológicos de ELISA, estudos realizados na Argentina para avaliar o seu desempenho em comparação com o teste de neutralização por redução em placa (PRNT) demonstraram que os testes apresentam altos valores de especificidade (98.8 a 100%) e sensibilidade (95.6%), sendo muitas vezes, o teste sorológico de escolha pela “facilidade” de execução e bons resultados principalmente quando utilizado em diluições maiores ou iguais a 1:800 (García Franco et al. 1988, Riera et al. 1997). Mas, como já foi discutido anteriormente, a especificidade antigênica relacionada a algumas espécies virais dificulta a implantação de um teste sorológico com um antígeno único capaz de ser utilizado como instrumento para realização de inquéritos. Em nosso estudo utilizamos o vírus Junín, um arenavírus da América do Sul, em amostras de soro com baixa diluição, considerando que a nossa intenção era aumentar a sensibilidade, uma vez que devido à especificidade antigênica deste vírus, poderia se perder resultados positivos para outras espécies de arenavírus. Apesar de não ser o ideal, estudos envolvendo as espécies detectadas no Brasil e suas propriedades antigênicas precisam ser analisadas para a padronização de um

teste mais específico para o nosso território ou mesmo de testes específicos para determinadas regiões do país, considerando a diversidade de arenavírus presentes no território.

Um padrão epidemiológico diferente dos observados na literatura foi descrito no presente estudo, no qual não se encontrou associação entre idade, sexo, atividades agrícolas e a detecção de anticorpos para arenavírus (Enria et. al 1998, Machado et al. 2010). Os resultados obtidos apontam não apenas para as atividades de trabalho rurais, mas também para o ambiente rural/agrícola como importante fator nas infecções por arenavírus, tendo em vista que não houve associação exclusiva entre o desenvolvimento de uma determinada atividade no campo e sorreatividade. Foi observado que uma parte dos indivíduos reativos relatava exercer atividades em ambientes fechados no interior das habitações. Relacionamos a esses dados, as condições de moradia, armazenamento de alimentos e a criação de animais domésticos que podem ter influenciado a presença de roedores nos domicílios e anexos, como paióis, celeiros e galinheiros, resultando assim, em um maior contato entre esses indivíduos e esse grupo de animais. É importante também relatar que durante períodos de colheita ou em períodos nos quais existe sobrecarga de trabalho é comum que outros membros da família auxiliem no trabalho do campo, mesmo que essas atividades não estejam relacionadas à sua rotina diária.

Como é possível observar na descrição das populações estudadas, além do acesso ao saneamento básico e a coleta seletiva de lixo se apresentarem precários ou inexistentes, muitos indivíduos residiam ou já residiram em habitações precárias feitas de madeira ou mesmo em habitações improvisadas de lona e madeira (acampamentos). Comprovadamente, essas condições são favoráveis para instalação e proliferação de roedores, especialmente em áreas impactadas não apenas pela agricultura familiar, mas pelos grandes empreendimentos agrícolas, madeireiras e garimpos adjacentes (Bonwitt et al. 2017). Toma-se como exemplo a região Centro-Oeste, onde se verifica uma expansão agrícola caracterizada por um aumento muito rápido, de 22,8%, da área plantada com grãos. Esta expansão recente de área ocorreu sobretudo na plantação da soja, nada menos que 66,1% na região Centro-Oeste (Domingues & Bermann 2012).

Esses resultados são corroborados também pelos resultados dos estudos de prevalência de hantavírus conduzidos nas populações de Goiás e Mato Grosso do Sul, demonstrando o que pode ser entendido como uma transição do perfil epidemiológico dessas doenças, nas quais não só a atividade agrícola é importante, mas também o ambiente rural como um todo (**Artigo 9 e 10**).

As condições de saúde dessas populações, segundo os resultados de diversos estudos, evidenciam uma situação mais precária se comparada com a da população urbana (Kassouf

2015). No campo e na floresta, ainda existem limitações de acesso e qualidade nos serviços de saúde. De acordo com o Plano Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta (PNSIPCF) no campo brasileiro são encontrados os maiores índices de mortalidade infantil, de incidência de endemias, de insalubridade e de analfabetismo, caracterizando uma situação de enorme pobreza decorrente das restrições ao acesso aos bens e serviços indispensáveis à vida (BRASIL, 2013). Sendo assim, não é difícil deduzir que frente a esse cenário, doenças consideradas de baixa incidência e negligenciadas pelos sistemas de saúde, como as arenavirose, possam não estar sendo diagnósticas já que são frequentemente desconsideradas como possibilidade diagnóstica.

Vale ressaltar também que algumas doenças com alto impacto quantitativo estão intimamente ligadas à condição do campo e da floresta e, portanto, são relevantes para as populações do campo. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS) e o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (Sivep – Malária/MS), destacam-se dentre as doenças endêmicas: a malária, a febre amarela, a doença de Chagas e a leishmaniose (BRASIL, 2013). É preciso considerar que muitos casos suspeitos dessas doenças são descartados por testes laboratoriais ou que alguns casos são confirmados com base nos dados clínicos e epidemiológicos, sem confirmação laboratorial, evento frequente durante períodos de surtos. O recente surto de febre amarela que aflige o Brasil é um exemplo, no qual dos 470 casos suspeitos no estado de São Paulo, apenas 35 foram confirmados e 290 descartados, considerando que São Paulo é o único estado com relato de FHA no país (Liseux et al. 1994, Ministério da saúde 2018). A mesma premissa pode ser utilizada para doenças como dengue e malária, pois apresentam um grande número de casos notificados e uma grande proporção de casos permanece sem confirmação do agente etiológico.

A ocorrência silenciosa das arenavirose é um problema que vem sendo colocado em pauta por muitos trabalhos. Blasdell e colaboradores (2016) realizaram uma investigação eco-epidemiológica no Reino Unido que resultou na identificação de um novo arenavírus, Loei River virus em roedores das espécies *Bandicota indica*, *B. savilei* e *Niviventer fulvescens*. Investigações retrospectivas em casos não confirmados de dengue e influenza revelaram a presença deste novo arenavírus, demonstrando a ocorrência de casos humanos desde 2008. Os resultados apresentados no presente estudo, em consonância com a publicação de Blasdell et al. 2016, apontam para a necessidade de uma vigilância epidemiológica integrada nos estudos das arenavirose. A detecção do vírus em roedores não necessariamente significa risco para saúde humana, mas serve de ferramenta para criação de capacidade diagnóstica e como alerta para as unidades de saúde, construindo, assim, uma vigilância preventiva.

Neste contexto e com este mesmo olhar, é preciso, por fim, reafirmar a necessidade e a importância da capacidade diagnóstica ser construída com base não somente dos agentes infecciosos frequentemente diagnosticados na rotina, mas também com a inclusão de agentes infecciosos ditos zoonóticos, pouco visíveis ou mesmo invisíveis, que embora não estejam associados a grandes epidemias de elevado impacto quantitativo, são responsáveis por infecções de elevada letalidade. O Brasil faz fronteira com os três outros países onde FHA continuamente tem sido reportada e, desta forma, é preciso também levar em conta a possibilidade da “entrada” de um arnavírus exótico, considerando, especialmente no momento atual, o aumento de refugiados no território latino americano, tal como observado na África, onde novas áreas de ocorrência da febre do Lassa foram relacionadas à migração de refugiados de diferentes regiões, consequente ao deslocamento do roedor reservatório (Shaffer et al. 2014).

5.3. Restituição de resultados e estratégias de educação em saúde

A sobreposição de doenças endêmicas nas áreas estudadas se coloca como um obstáculo na detecção de possíveis casos de infecção por arnavírus já que possuem um aspecto clínico amplo e inespecífico (Enria et al. 1998, Salas et al. 1991). Para isso é importante a divulgação sobre a doença para população e para os profissionais de saúde. As doenças transmitidas por roedores apresentam um grave problema de saúde pública especialmente em áreas rurais, onde o contato entre humanos e estes animais costuma ser frequente.

No campo da ética em pesquisa, o tema da restituição dos resultados é uma questão emergente. Cada vez mais, as instituições, sejam universidades ou institutos de pesquisa, agências de fomento e a sociedade exigem que os pesquisadores expliquem como e quando planejam devolver os resultados da pesquisa aos indivíduos ou às comunidades envolvidas na fase de coleta de material e/ou dados (Litre et al 2017). A criação de um instrumento de comunicação direcionado ao público alvo da pesquisa não se traduz apenas como um produto do estudo desenvolvido, mas, de todo modo mais significativo, apresenta-se como um compromisso ético dos pesquisadores em restituir os resultados da pesquisa aos seus interlocutores de maneira direta ou indireta (Pessanha et al. 2013).

A comunicação pública, em seu sentido mais amplo, envolve empresas, instituições públicas e privadas, o terceiro setor e a sociedade como um todo (Oliveira, 2004). Para além do compromisso ético da restituição de resultados aos atores envolvidos, é importante refletir sobre o papel do pesquisador como agente da divulgação de suas pesquisas, promovendo a

inclusão social e a melhoria da qualidade de vida. A forma como se dá essa divulgação é fundamental para garantir a recepção e o acesso do público de interesse e a retroalimentação do processo de coprodução do conhecimento (Nasuti et al. 2016).

Com base nesses princípios, foram construídos os produtos apresentados na seção 4. As notas informativas são a forma de se aproximar dos profissionais de saúde que estão na ponta de todo o processo de vigilância em saúde. A inexistência de informação e a falta de conhecimento desses profissionais muitas vezes impossibilitam o diagnóstico de doenças como as arnaviroses. É importante que estes profissionais sejam alertados sobre a possibilidade de casos a partir das evidências clínicas e epidemiológicas que possam ser identificadas em suas regiões de atuação. A participação e colaboração dos sistemas de saúde nas mais diferentes esferas é essencial para execução, aderência e implantação de novos modelos de vigilância.

Um apoio importante nesse trabalho surge da parceria realizada com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), culminando na produção de uma cartilha e da construção de um Alerta Epidemiológico. A geração de um alerta sobre as infecções por arnavírus nas Américas, desencadeada pelos resultados deste trabalho e pelo aumento dos relatos de detecção desses vírus em humanos e animais em todo o continente americano, confirma a preocupação do presente estudo com as políticas internacionais de saúde.

Quanto à cartilha, cuja elaboração contou com o apoio da OPAS, optou-se pelo seu uso por se tratar de um material no qual a informação pode ser transmitida de maneira simples, objetiva e ilustrativa, considerando que os agricultores familiares foram o público alvo para restituição de dados. A cartilha, dirigida para um público infanto-juvenil, foi dividida em duas partes ambas retratadas como história em quadrinhos. A primeira parte apresenta situações problemas frente à presença de roedores no interior de uma residência familiar e também nos anexos. A segunda parte é caracterizada pela resolução do problema central da história, infestação por roedores no domicílio, e a apresentação das medidas de prevenção. Na terceira etapa, é introduzido um personagem ligado ao sistema de vigilância em saúde, na tentativa de diminuir as distâncias entre população e profissionais da saúde. Sempre procurando estabelecer uma relação agradável com o público alvo, a partir das ilustrações que, além de informativas, também são a porta de entrada para o texto escrito. A ideia foi eliminar eventuais barreiras intimidadoras que tornassem difícil ou impossível a leitura da cartilha. Vale ainda ressaltar a escassez de material educacional de qualidade a respeito do tema.

Acredita-se que a utilização de linguagem verbal e não verbal na elaboração de um instrumento de comunicação, como a cartilha educacional, possa facilitar a disseminação de

conteúdos científicos e promover a aproximação do público com o assunto tratado. Por outro lado, no entanto, não se pode desconsiderar a limitação e os desafios do instrumento associados com a dificuldade intrínseca do produto, já que se trata de um material impresso de leitura. Assim, mesmo que a cartilha seja baseada em ilustrações, ela apresenta textos escritos, o que pode prejudicar o aproveitamento por parte do público analfabeto.

Tendo em vista a complexidade assim como a escassez de estudos sobre arenavirose, espera-se que as ações desencadeadas pelos resultados da presente pesquisa possam não somente preencher um grande hiato do conhecimento da FHB, mas também e fundamentalmente culminar em ações concretas na prevenção das arenavirose e de outras doenças associadas a roedores, como a hantavirose e a leptospirose, fortalecendo a rede de vigilância em saúde e fornecendo subsídios para programas de desenvolvimento sociais não somente no Brasil mas também na América latina.

6. CONCLUSÕES

- A presença de infecção por mammarenavírus foi detectada em cinco espécies de roedores *Calomys callosus*, *C. callidus*, *Necromys lasiurus*, *Neacomys musseri* e *Oecomys* sp. *O. cleberi*, *O. franciscorum* e *Oligoryzomys mattogrossae*, nos estados do Acre, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, demonstrando a diversidade de espécies de roedores envolvidos no ciclos dos arenavírus.

- Duas linhagens do vírus Latino foram detectadas, a linhagem MARU em roedores da espécie *C. callidus* do estado do Mato Grosso, e altas prevalências da linhagem Capão seco em *C. callosus* do Mato Grosso do Sul, confirmando a grande variabilidade viral.

- Vírus Oliveros foi caracterizado pela primeira vez no Brasil em roedores *N. lasiurus* capturados no Mato Grosso do Sul, nos municípios de Sidrolândia e Cassilândia. Nas duas situações OLVV foi encontrado co-circulando com outros arenavírus.

- O vírus Xapuri, detectado em *N. musseri* no estado do Acre, além de ser o primeiro mammarenavírus produto de um rearranjo natural, foi caracterizado como o primeiro membro de uma possível quinta clade dos mamarenavirus do Novo Mundo, reforçando a necessidade do sequenciamento genômico completo dos arenavírus para uma caracterização adequada.

- Um novo mammarenavírus da Clade A do Novo Mundo, o vírus Rio Preto, foi detectado, sendo este o primeiro relato da infecção de roedores do gênero *Oecomys* por arenavírus no Brasil.

-Um novo mammarenavírus membro da Clade B do Novo Mundo, denominado vírus Aporé, foi caracterizado por sequenciamento completo, o que possibilitou comprovar a sua estreita relação com os mammarenavírus patogênicos, Sabiá e Chapare, que até a presente data não possuem seu reservatório natural identificado.

- O vírus Aporé foi detectado em roedores da espécie *O. mattogrossae*, o hospedeiro natural do vírus Aporé no cerrado brasileiro, mas que pode também ser reservatório do vírus Latino no bioma Pantanal.

- Pela primeira vez na literatura foi descrita a co-infecção simultânea por mammarenavírus e hantavírus em único roedor, *O. mattogrossae*, sem evidências de implicações atuais na geração de novas variantes virais quiméricas.

- Materiais testemunhos de coleções de mamíferos como fígado conservado em etanol demonstrou elevado potencial para utilização alternativa em estudos de identificação de

infecções por mamarenavírus por meio da amplificação de fragmentos genômicas pela técnica de RT-PCR qualitativo.

- Os membros da família *Arenaviridae* foram relacionados aos vírus da ordem Bunyavirales, em especial à família *Nairoviridae*, fazendo-se necessária a inclusão desses vírus na ordem.

- Anticorpos da classe IgG anti-mamnavírus foram detectados em 1,63 % da população de assentados da reforma agrária e quilombolas, nos estados do Acre, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Considerando os limites do desenho de estudo realizado com a população humana e diante da falta de associação entre atividades rurais e a infecção por arenavírus novos estudos de prevalência precisam ser desenvolvidos principalmente em populações rurais potencialmente expostas.

- Condições de moradia precárias e falta de acesso ao saneamento básico foram encontradas nas quatro localidades estudadas, fato que pode ter contribuído para o maior contato entre humanos e roedores, resultando em infecções por arenavírus que variaram de 0,64% a 2,91 %.

- O assentamento Ramal do Granada no Acre que apresentou a maior prevalência do estudo 2,91% foi também o local com as piores condições sanitárias e maiores números de cobertura de assistência do programa Brasil sem Miséria (PBSM).

- Os resultados obtidos apontam para a necessidade de conscientização e vigilância das doenças transmitidas por roedores em áreas rurais com alta cobertura do PBSM nas quais ocorrem ações de incentivo à agricultura familiar e às atividades de conservação florestal.

- Diante da invisibilidade das arenavirose e dos resultados obtidos conclui-se sobre a necessidade da geração de notas técnicas para os serviços de saúde no Brasil e para Organização Pan-americana de saúde, visando alertar sobre o diagnóstico das febres hemorrágicas causadas por mamarenavírus.

- Por fim, considerando o desconhecimento da doença pela população de estudo continuamente exposta a roedores, foi necessário finalizar com a elaboração de materiais educacionais voltados para diferentes públicos, como um folder informativo para profissionais da saúde locais e uma cartilha bilíngue ilustrada voltada para o público infantil, ambas com enfoque na prevenção de doenças transmitidas por roedores.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar a caracterização genética completa dos demais mammarenavírus identificados no presente estudo, em parceria com a Public Health England;
- Padronizar os testes de qPCR específicos para detecção das espécies de mammarenavírus identificados neste trabalho para quantificação do RNA viral em cultura de células visando à realização de ensaios de cinética de infecção em diferentes tipos celulares em parceria com Public Health England;
- Desenvolver ensaios de genética reversa do vírus Xapuri, com o objetivo de construir a partícula viral a partir do RNA viral, uma vez que não foi possível isolar o vírus do material em *RNA Later*TM;
- Pesquisar a presença de mammarenavírus utilizando a RT-PCR nas amostras de roedores de outras regiões do Brasil;
- Pesquisar a presença de mammarenavírus a partir da RT-PCR nas amostras de serpentes e morcegos de diferentes regiões do Brasil.
- Realizar vigilância febril sindrômica dos casos humanos nos estado onde a circulação de mammarenavírus foi comprovada.
- Realizar inquéritos sorológicos em populações rurais humanas utilizando antígeno específico baseado na nucleoproteína do vírus Aporé.
- Elaborar um manuscrito referente à história e epidemiologia das febres hemorrágicas por arenavírus nas Américas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar P V, Camargo W, Vargas J, Guevara C, Roca Y, Felices V, Laguna-Torres V, Tesh R, Ksiazek T, Kochel T 2009. Reemergence of Bolivian hemorrhagic fever, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1526–1528.
- Ajayi NA, Nwigwe CG, Azuogu BN, Onyire BN, Nwonwu EU, Ogbonnaya LU, Onwe FI, Ekaete T, Günther S, Ukwaja KN 2013. Containing a Lassa fever epidemic in a resource-limited setting: outbreak description and lessons learned from Abakaliki, Nigeria (January-March 2012). *Int. J. Infect. Dis.*: 1–6.
- Albariño CG, Bird BH, Chakrabarti AK, Dodd KA, Flint M, Bergeron E, White DM, Nichol ST 2011. The major determinant of attenuation in mice of the candid1 vaccine for argentine hemorrhagic Fever is located in the G2 glycoprotein transmembrane domain. *J. Virol.* 85: 10404–10408.
- Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Romanowski V 1998. Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes* 16: 39–46.
- Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A 2011. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum. Vaccin.* 7: 694–700.
- Ambrosio AM, Enria DA, Maiztegui JI 1986. Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology* 25: 97–102.
- Ambrosio AM, Riera LM, Saavedra MDC, Sabbatini MS 2006. Immune response to vaccination against Argentine hemorrhagic Fever in an area where different arenaviruses coexist *Intervirology* 25: 97–102.
- Ambrosio M, Vallejos A, Saavedra C, Maiztegui JI 1990. Junin virus replication in peripheral blood mononuclear cells of patients with Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol.* 34: 58–63.
- Amman BR, Pavlin BI, Albariño CG, Comer JA, Erickson BR, Oliver JB, Sealy TK, Vincent MJ, Nichol ST, Paddock CD, Tumpey AJ, Wagoner KD, Glauer RD, Smith KA, Winpisinger KA, Parsely MS, Wyrick P, Hannafin CH, Bandy U, Zaki S, Rollin PE, Ksiazek TG 2007. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 719–725.

- Andrews BS, Theofilopoulos AN, Peters CJ, Loskutoff DJ, Brandt WE, Dixon FJ 1978. Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. *Infect. Immun.* 20: 776–781.
- Archer AM, Rico-Hesse R 2002. High genetic divergence and recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology* 304: 274–281.
- Armstrong C, Lillie RD 1934. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Rep.* 49: 1019–1027.
- Arribalzaga R 1955. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantémica. *Dia Médico* 27: 1204–1210.
- Bao Y, Chetvernin V, Tatusova T 2014. Improvements to pairwise sequence comparison (PASC), a genome-based web tool for virus classification. *Arch Virol.* 159:3293–3304.
- Bao Y, Kapustin Y, Tatusova T 2008. Virus classification by Pairwise Sequence Comparison (PASC). In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of virology*, 3rd edn. Academic Press, Oxford, pp 342–348.
- Barrera Oro JG, McKee KT 1991. Toward a vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 25: 118–126.
- Barretto, L. (2014) O empreendedorismo como promotor da inclusão produtiva. *O Brasil Sem Miséria Brasília: MDS.*
- Barry M, Russi M, Armstrong L, Geller D, Tesh R, Dembry L, Gonzalez JP, Khan AS, Peters CJ 1995. Brief report: treatment of a laboratory-acquired sabía virus infection. *N. Engl. J. Med.:* 294–296.
- Belik, W. (2015) 'A Heterogeneidade e suas Implicações para as Políticas Públicas no Rural Brasileiro', *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 53(1), pp. 9-30.
- Beyer WR, Pöplau D, Garten W, Laer D von, Lenz O 2003. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J. Virol.* 77: 2866–2872.

- Blasdell KR, Becker SD, Hurst J, Begon M, Bennett M 2008. Host range and genetic diversity of arenaviruses in rodents, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1455–1458.
- Blasdell KR, Duong V, Eloit M, Chretien F, Ly S, Hul V, Deubel V, Morand S, Buchy P 2016. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife.* 9;5. pii: e13135.
- Bodewes R, Kik MJL, Raj VS, Schapendonk CME, Haagmans BL, Smits SL, Osterhaus a DME 2013. Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *J. Gen. Virol.* 94: 1206–1210.
- Bonvicino CR, D’Andrea PS, Cerqueira R, Seuánez HN 1996. The chromosomes of *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae) with $2n = 52$, $2n = 56$, and interspecific hybrids ($2n = 54$). *Cytogenet. Cell Genet.* 73: 190–193.
- Bonvicino CR, Oliveira JA De, D’Andrea PS 2008. Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Adtosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro.
- Bonwitt J, Sáez AM, Lamin J, Ansumana R, Dawson M, Brown H 2017. At Home with *Mastomys* and *Rattus*: Human-Rodent Interactions and Potential for Primary Transmission of Lassa Virus in Domestic Spaces. *American J Trop Medi Hyg.* 96: 935–943.
- Borrow P, Oldstone MB 1994. Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198: 1–9.
- Bowen MD, Peters CJ, Mills JN, Nichol ST 1996a. Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217: 362–366.
- Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST 1996b. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219: 285–290.
- Bowen MD, Rollin PE, Ksiazek TG, Hustad HL, Bausch DG, Demby AH, Bajani MD, Peters CJ, Nichol ST 2000. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* 74: 6992–7004.

- Bracco MM de, Rimoldi MT, Cossio PM, Rabinovich A, Maiztegui JI, Carballal G, Arana RM 1978. Argentine hemorrhagic fever. Alterations of the complement system and anti-Junin-virus humoral response. *N. Engl. J. Med.* 299: 216–221.
- Brandling-Bennett D, Pinheiro F 1996. Infectious Diseases in Latin America and the Caribbean: Are They Really Emerging and Increasing? *Emerg. Infect. Dis.* 2: 59–61.
- Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, Palacios G, Khristova ML, Weyer J, Swanepoel R, Egholm M, Nichol ST, Lipkin WI 2009. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* 5: e1000455.
- Briggiler A, Enría D, Feuillade MR 1987. Contagio interhumano e infección inaparente por virus Junin on matrimonios del área endémica de fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (B. Aires).* 47: 565–565.
- Briggiler A, Lewis S, Enria D 1990. Argentine hemorrhagic fever in pregnant women. *Medicina (B. Aires).* 50: 443–444.
- Briggiler A, Sinchi A, Coronel F, Sánchez Z, Levis S, Taylor J, 2015. Los nuevos escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica argentina desde la introducción de la vacuna a virus Junín vivo atenuado (candid#1): una experiencia en trabajadores golondrinas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 32 :165-71.
- Brummer-Korvenkontio M, Henttonen H, Vaheri A 1982. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Finland: ecology and virology of nephropathia epidemica. *Scand. J. Infect. Dis.* 36: 88–91.
- Buchmeier M, Adam E, Rawls WE 1974. Serological evidence of infection by Pichinde virus among laboratory workers. *Infect. Immun.* 9: 821–823.
- Buchmeier MJ, la Torre JC de, Peters CJ 2007. Arenaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia., pp. 1791–1828.
- Cabral, P. G. F., Oncala, A. A., Gaivizzo, L. H. B. and Apoloni, R. C. (2014) Programa Bolsa Verde: erradicação da extrema pobreza e conservação ambiental. O Brasil sem miséria Brasília: MDS.

- Cajimat MNB, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF 2012. Ocozocoautla de Espinosa Virus and Hemorrhagic Fever, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 401–405.
- Cajimat MNB, Milazzo ML, Rollin PE, Nichol ST, Bowen MD, Ksiazek TG, Fulhorst CF 2009. Genetic diversity among Bolivian arenaviruses. *Virus Res.* 140: 24–31.
- Campello T, Mello J, 2014. O processo de formulação e os desafios do Plano Brasil Sem Miséria: por um país rico e com oportunidades para todos. *O Brasil Sem Miséria* Brasília: MDS.
- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov E V, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282: 2079–2081.
- Cassens I, Tiedemann R, Hartl GB, Suchentrunk F 2000. Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. *J. Hered.* 91: 31–35.
- Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB 1994. The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch. Virol.* 136: 363–374.
- Charrel RN, Feldmann H, Fulhorst CF, Khelifa R, Chesse R de, Lamballerie X de 2002. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1118–1124.
- Charrel RN, Feldmann H, Fulhorst CF, Khelifa R, de Chesse R, de Lamballerie X 2002. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1118–1124.
- Charrel RN, Lamballerie X de 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 140: 213–220.
- Charrel RN, Lamballerie X de, Emonet S 2008. Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 362–368.

- Charrel RN, Lemasson JJ, Garbutt M, Khelifa R, De Micco P, Feldmann H, de Lamballerie X 2003. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* 317:191–196.
- Childs JE & Peters CJ 1993. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In *The Arenaviruses*. Edited by Salvato MS. New York, Plenum Press: 331-384.
- Cleaveland, S., Laurenson, M. K. and Taylor, L. H. (2001) 'Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1411), pp. 991-9.
- Coimbra TLM, Santos RN, Ferreira IB, Fialho DM, Mello ES, Ferreira LMHL, Chamelet ELB 2001. Arenavirus: a fatal outcome. *Virus Rev. Res.* 1: 14–16.
- Cossio P, Laguens R, Arana R, Segal A, Maiztegui J 1975. Ultrastructural and immunohistochemical study of the human kidney in Argentine haemorrhagic fever. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 368: 1–9.
- Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP 1990. Acute sensorineural deafness in lassa fever. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 264: 2093–2096.
- de Bellocq JG, Borremans B, Katakweba A, Makundi R, Baird SJ, Becker-Ziaja B, Günther S, Leirs H 2010. Sympatric occurrence of 3 arenaviruses, Tanzania *Emerg Infect Dis.* 16: 692-695.
- de Campos, A., Müller, L., dos Santos R., L., Schroder, M., Del Porto, E. B. and Kroeff, D. R. (2014) *Inclusão produtiva rural no Plano Brasil sem Miséria: síntese da experiência recente em políticas públicas para o atendimento dos mais pobres no rural brasileiro. O Brasil sem miséria Brasília: MDS.*
- de Guedes, C. M. G., Sturm, C. E., Petrarca, L. and Guerresi, S. (2014) *Brasil Sem Miséria na Reforma Agrária: avanços na inclusão social e produtiva. O Brasil sem miséria Brasília: MDS.*
- Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albariño CG, Vargas J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Olson JG, Nichol ST 2008. Chapare virus, a newly discovered

- arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* 4: e1000047.
- Demogines A, Abraham J, Choe H, Farzan M, Sawyer SL 2013. Dual host-virus arms races shape an essential housekeeping protein. *PLoS Biol.* 11: e1001571.
- Drake JW, Holland JJ 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13910–13913.
- Eddy GA, Wagner FS, Scott SK, Mahlandt BJ 1975. Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian haemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bull. World Health Organ.* 52: 723–727.
- Edgar RC 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk H-D, Garten W 2004. Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J. Biol. Chem.* 279: 12293–12299.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Garten W 2003. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett.* 538: 203–206.
- Ellis A, Mills JN, Childs JE, Muzzini MC, Mckee KT, Enria D a., Glass GE 1997. Structure and floristics of habitats associated with five rodent species in an agroecosystem in Central Argentina. *J. Zool.* 243: 437–460.
- Emonet SF, la Torre JC de, Domingo E, Sevilla N 2009. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect. Genet. Evol.* 9: 417–429.
- Enria D, Damilano AJ de, Briggiler AM 1985. Síndrome neurológico tardío en enfermos de fiebre hemorrágica Argentina tratados con plasma inmune. *Medicina (B. Aires).* 45: 615–620.
- Enria D, GarciaFranco S, Ambrosio A, Vallejos D, Levis S, Maiztegui J 1986. Current status of the treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Med Microbiol Immunol* 175: 173–176.

- Enria DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, Feuillade MR, Crivell E 2010. Vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina CANDID#1 producida en la argentina: inmunogenicidad y seguridad. *Medicina (B. Aires)*. 70: 215–222.
- Enria DA, Briggiler AM, Fernandez NJ, Levis SC, Maiztegui JI 1984. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet* 2: 255–256.
- Enria DA, Briggiler AM, Feuillade MR 1998. An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentine haemorrhagic fever (Junin virus). *Bull. Inst. Pasteur* 96: 103–114.
- Enria DA, Briggiler AM, Levis S, Vallejos D, Maiztegui JI, Canonico PG 1987. Tolerance and antiviral effect of ribavirin in patients with Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 7: 353–359.
- Enria DA, Maiztegui JI 1994. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 23: 23–31.
- Eschli B, Quirin K, Wepf A, Weber J, Zinkernagel R, Hengartner H 2006. Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J. Virol.* 80: 5897–5907.
- Esser, C., Göttlinger, C., Kremer, J., Hundeiker, C. and Radbruch, A. (1995) 'Isolation of full-size mRNA from ethanol-fixed cells after cellular immunofluorescence staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS)', *Cytometry*, 21(4), pp. 382-6.
- Falcão, T. and da Costa, P. V. (2014) A linha de extrema pobreza e o público alvo do Plano Brasil Sem Miséria. *O Brasil sem miséria Brasília: MDS.*
- Ferreira MS 2003. Hantaviruses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 81–96.
- Figueiredo LTM 2006. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39: 203–210.
- Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, Comer JA, Guarner J, Paddock CD, DeMeo DL, Shieh W-J, Erickson BR, Bandy U, DeMaria A, Davis JP, Delmonico FL, Pavlin B, Likos A, Vincent MJ, Sealy TK, Goldsmith CS,

- Jernigan DB, Rollin PE, Packard MM, Patel M, Rowland C, Helfand RF, Nichol ST, Fishman JA, Ksiazek T, Zaki SR 2006. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235–2249.
- França, C. G. d., Del Grossi, M. E. and Marques, V. P. M. d. A. (2009) O censo agropecuário 2006 e a agricultura familiar no Brasil. MDA Brasília: MDA.
- Fraser D, Campbell C, Monath T, Goff P, Gregg M 1974. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. I. Epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 1131–1139.
- Fritz CL, Fulhorst CF, Enge B, Winthrop KL, Glaser CA, Vugia DJ 2002. Exposure to rodents and rodent-borne viruses among persons with elevated occupational risk. *J. Occup. Environ. Med.* 44: 962–967.
- Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S 2012. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses.* 12; 4:2097-114.
- Fulhorst CE, Bowen MD, Salas RA, Manzione NM de, Duno G, Utrera A, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST, Miller E De, Tovar D, Ramos B, Vasquez C, Tesh RB 1997. Isolation and characterization of pirital virus, a newly discovered South American arenavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 548–553.
- Fulhorst CF, Bowen MD, Ksiazek TG, Rollin PE, Nichol ST, Kosoy MY, Peters CJ 1996. Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus. *Virology* 224: 114–120.
- Fulhorst CF, Cajimat MNB, Milazzo ML, Paredes H, Manzione NMC de, Salas RA, Rollin PE, Ksiazek TG 2008. Genetic diversity between and within the arenavirus species indigenous to western Venezuela. *Virology* 378: 205–213.
- Fulhorst CF, Charrel RN, Weaver SC, Ksiazek TG, Bradley RD, Milazzo ML, Tesh RB, Bowen MD 2001. Geographic distribution and genetic diversity of Whitewater Arroyo virus in the southwestern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 403–407.

- Fulhorst CF, Ksiazek TG, Peters CJ, Tesh RB 1999. Experimental infection of the cane mouse *Zygodontomys brevicauda* (family Muridae) with guaranito virus (Arenaviridae), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 180: 966–969.
- Fulhorst CF, Milazzo ML, Armstrong LR, Childs JE, Rollin PE, Khabbaz R, Peters CJ, Ksiazek TG 2007. Hantavirus and Arenavirus. Antibodies in Persons with Occupational Rodent Exposure North America. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 532–538.
- Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ 2001. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol.* 1: 1-100.
- García Franco S, Ambrosio AM, Feuillade MR, Maiztegui JI 1988. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to Junin virus in human sera. *J Virol Methods* 19: 299–305.
- Garcia J, Calderón G, Sabattini MS 1996. Infeccion por virus Junin de *Calomys musculinus* en areas con diferente situacion epidemiologica para la fiebre hemorragica Argentina. *Medicina (B. Aires).* 56: 624–625.
- García JB, Morzunov SP, Levis S, Rowe J, Calderón G, Enría D, Sabattini M, Buchmeier MJ, Bowen MD, St Jeor SC 2000. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology* 272: 127–136.
- Geoghegan, J. L. and Holmes, E. C. (2017) 'Predicting virus emergence amid evolutionary noise', *Open Biol*, 7(10).
- Goldberg, T. L., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., Estoff, E. L. and Chapman, C. A. (2008) 'Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda', *Emerg Infect Dis*, 14(9), pp. 1375-82.
- Gomez R, Giusti CJ, Sanchez MM, Vallduvi JF, Ferrer MF, Schattner M 2011. Junín virus. A XXI Century Update. *Microbes Infect.* 13: 303–311.
- Gomez RM, Pozner RG, Lazzari MA, D'Atri LP, Negrotto S, Chudzinski-Tavassi AM, Berría MI, Schattner M 2003. Endothelial cell function alteration after Junin virus infection. *Thromb. Haemost.* 90: 326–333.

- Gonzalez JP, Bowen MD, Nichol ST, Rico-Hesse R 1996. Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology* 221: 318–324.
- González PH, Cossio PM, Arana R, Maiztegui JI, Laguens RP 1980. Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Pathologic features. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 104: 250–254.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27: 221–224.
- Grande-Pérez A, Martín V, Moreno H, de la Torre JC 2016. Arenavirus Quasispecies and Their Biological Implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 392:231-76.
- Grande-Pérez A, Sierra S, Castro MG, Domingo E, Lowenstein PR 2002. Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1; 99:12938-43.
- Grant A, Seregin A, Huang C, Kolokoltsova O, Brasier A, Peters C, Paessler S 2012. Junín Virus Pathogenesis and Virus Replication. *Viruses* 4: 2317–2339.
- Green DE, Mahlandt BG, McKee KT 1987. Experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques: virus-specific variations in pathology. *J. Med. Virol.* 22: 113–133.
- Groseth A, Hoenen T, Weber M, Wolff S, Herwig A, Kaufmann A, Becker S 2011. Tacaribe virus but not junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1137.
- Gryseels S, Baird SJ, Borremans B, Makundi R, Leirs H, Göüy de Bellocq J 2017. When Viruses Don't Go Viral: The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses. *PLoS Pathog.* 11;13:e1006073.
- Gu, S. H., Lim, B. K., Kadjo, B., Arai, S., Kim, J. A., Nicolas, V., Lalis, A., Denys, C., Cook, J. A., Dominguez, S. R., Holmes, K. V., Urushadze, L., Sidamonidze, K., Putkaradze, D., Kuzmin, I. V., Kosoy, M. Y., Song, J. W. and Yanagihara, R. (2014) 'Molecular

- phylogeny of hantaviruses harbored by insectivorous bats in Côte d'Ivoire and Vietnam', *Viruses*, 6(5), pp. 1897-910.
- Gu, S. H., Nicolas, V., Lalis, A., Sathirapongsasuti, N. and Yanagihara, R. (2013) 'Complete genome sequence and molecular phylogeny of a newfound hantavirus harbored by the Doucet's musk shrew (*Crocidura douceti*) in Guinea', *Infect Genet Evol*, 20, pp. 118-23.
- Guanziroli, C. E., Buainain, A. M. and Di Sabbato, A. (2012) 'Dez anos de evolução da agricultura familiar no Brasil: (1996 e 2006)', *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 50(2), pp. 351-370.
- Gummow, B. (2010) 'Challenges posed by new and re-emerging infectious diseases in livestock production, wildlife and humans', *Livestock Science*, 130(1), pp. 41-46.
- Günther S, Emmerich P, Laue T, Kühle O, Asper M, Jung A, Grewing T, Meulen J ter, Schmitz H 2000. Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 466–476.
- Harnish DG, Polyak SJ, Rawls WE 1993. Arenavirus replication: molecular dissection of the role of protein and RNA. In: Salvato MS (ed) *The Arenaviridae*. Plenum Press, New York, pp 157–174.
- Harper, K. and Armelagos, G. (2010) 'The changing disease-scape in the third epidemiological transition', *Int J Environ Res Public Health*, 7(2), pp. 675-97.
- Harrison LH, Halsey NA, McKee KT, Peters CJ, Barrera Oro JG, Briggiler AM, Feuillade MR, Maiztegui JI 1999. Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1091–1094.
- Heller M V, Marta RF, Sturk A, Maiztegui JI, Hack CE, Cate JW, Molinas FC 1995. Early markers of blood coagulation and fibrinolysis activation in Argentine hemorrhagic fever. *Thrombosis Haemost.* 73: 368–373.
- Heller M V, Saavedra MC, Falcoff R, Maiztegui JI, Molinas FC 1992. Increased Tumor Necrosis Factor- α Levels in Argentine Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.* 166: 1203–1204.

- Hepojoki J, Kipar A, Korzyukov Y, Bell-Sakya L, Vapalahti O, Hetzel U 2015. Replication of Boid Inclusion Body Disease-Associated Arenaviruses Is Temperature Sensitive in both Boid and Mammalian Cells. *J Virol.* 89: 1119–1128.
- Hetzel U, Sironen T, Laurinmäki P, Liljeroos L, Patjas A, Henttonen H, Vaheiri A, Artelt A, Kipar A, Butcher SJ, Vapalahti O, Hepojoki J 2013. Isolation, identification, and characterization of novel arenaviruses, the etiological agents of boid inclusion body disease. *J. Virol.* 87: 10918–10935.
- Holland JJ, La Torre JC De, Steinhauer DA 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 1–20.
- Howard C 1993. Antigenic Diversity among the Arenaviruses. In: Salvato M (Ed.), *The Arenaviridae*, Plenum Press, New York, USA., pp. 37–49.
- Hu, S. P., Yang, J. S., Wu, M. Y., Shen, Z. Y., Zhang, K. H., Liu, J. W. and Guan, B. (2005) 'Effect of one-step 100% ethanol fixation and modified manual microdissection on high-quality RNA recovery from esophageal carcinoma specimen', *Dis Esophagus*, 18(3), pp. 190-8.
- Ippolito G, Feldmann H, Lanini S, Vairo F, Caro A Di, Capobianchi M, Nicastri E 2012. Viral hemorrhagic fevers: advancing the level of treatment. *BMC Med.* 10: 31.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128–144.
- Iwasaki M, Ngo N, Cubitt B, de la Torre JC 2015. Efficient Interaction between Arenavirus Nucleoprotein (NP) and RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated by the Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template. Dermody TS, ed. *Journal of Virology.* 89:5734-5738.
- J Casals 1975. Arenaviruses. *Yale J Biol Med* 48: 15–40.
- Jahrling PB, Marty FM, Geisbert TW 2004. VIRAL HEMORRHAGIC FEVERS. In: P B (Ed.), *Guidel. Clin. Manag. Haemorrh. fevers bioterrorism-related Haemorrh. fever viruses.*, pp. 271–310.

- Johnson KM, Kuns ML, Mackenzie RB, Webb PA, Yunker CE 1966. Isolation of Machupo virus from wild rodent *Calomys callosus*. *Am J Trop Med Hyg* 15: 103–106.
- Johnson KM, Wiebnaga NH, Mackenzie RB, Kuns ML, Tauraso N, Shelokov A, Webb PA, Justines G, Beye HK 1965. Virus isolation from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc Soc Exp Biol Med* 118: 113–118.
- Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J. and Pfeiffer, D. U. (2013) 'Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(21), pp. 8399-404.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L. and Daszak, P. (2008) 'Global trends in emerging infectious diseases', *Nature*, 451(7181), pp. 990-3.
- Justines G, Johnson KM 1969. Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. *Nature* 222: 1090–1091.
- Kastello MD, Eddy GA, Kuehne RW 1976. A Rhesus Monkey Model for the Study of Bolivian Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.* 133: 57–62.
- Kelly, T. R., Karesh, W. B., Johnson, C. K., Gilardi, K. V., Anthony, S. J., Goldstein, T., Olson, S. H., Machalaba, C., Mazet, J. A. and Consortium, P. (2017) 'One Health proof of concept: Bringing a transdisciplinary approach to surveillance for zoonotic viruses at the human-wild animal interface', *Prev Vet Med*, 137(Pt B), pp. 112-118.
- Kelt DA, Hafner MS 2010. Updated guidelines for protection of mammalogists and wildlife researchers from hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *J. Mammal.* 91: 1524–1527.
- Kiening M, Weber F, Frishman D 2017. Conserved RNA structures in the intergenic regions of ambisense viruses. *Sci Rep.* 30; 7:16625.
- Kilgore PE, Peters CJ, Mills JN, Rollin PE, Armstrong L, Khan AS, Ksiazek TG 1995. Prospects for the Control of Bolivian Hemorrhagic Fever. *Medicina (B. Aires).* 1: 1–10.

- King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E (eds) 2011. The international code of virus classification and nomenclature. In: *Virus taxonomy—Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier/Academic Press, London, pp 1273–1277.
- Knust B, Ströher U, Edison L, Albariño CG, Lovejoy J, Armeanu E, House J, Cory D, Horton C, Fowler KL, Austin J, Poe J, Humbaugh KE, Guerrero L, Campbell S, Gibbons A, Reed Z, Cannon D, Manning C, Petersen B, Metcalf D, Marsh B, Nichol ST, Rollin PE 201. Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Employees and Mice at Multipremises Feeder-Rodent Operation, United States, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014 20: 240–247.
- Koellhoffer JF, Dai Z, Malashkevich VN, Stenglein MD, Liu Y, Toro R 2013. Structural Characterization of the Glycoprotein GP2 Core Domain from the CAS Virus, a Novel Arenavirus-Like Species. *J Mol Biol.* 426:1452–1468.
- Kuns ML 1965. Epidemiology of Machupo virus infection. II. Ecological and control studies of hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 14: 813–816.
- Kunz S, Edelmann KH, la Torre J-C de, Gorney R, Oldstone MBA 2003. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314: 168–178.
- Lang J, Wood SC 1999. Development of orphan vaccines: an industry perspective. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 749–756.
- Lauber C, Gorbalenya AE 2012. Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. *J Virol* 86:3890–3904
- Levis S, Feuillade MR, Enria DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, McKee JI, Maiztegui J 1993. Persistencia de la inmunidad humoral específica en receptores de la vacuna Candid # 1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (B. Aires).* 53: 131–135.
- Levis SC, Saavedra MC, Ceccoli C, Feuillade MR, Enria DA, Maiztegui JI, Falcoff R 1985. Correlation between endogenous interferon and the clinical evolution of patients with Argentine hemorrhagic fever. *J. Interferon Res.* 5: 383–389.

- Lisieux T, Coimbra M, Nassar ES, Burattini MN, Souza LT de, Ferreira I, Rocco IM, Rosa AP da, Vasconcelos PF, Pinheiro FP 1994. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 343: 391–392.
- López N, Franze-Fernández MT 2007. A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res.* 124: 237–244.
- López N, Jácamo R, Franze-Fernández MT 2001. Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol.* 75:12241-51.
- López N, Scolaro L, Rossi C, Jácamo R, Candurra N, Pujol C, Damonte EB, Franze-Fernández MT 2000. Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. *J. Gen. Virol.* 81: 1273–1281.
- Lozano ME, Enría D, Maiztegui JI, Grau O, Romanowski V 1995. Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *J Me d Virol.* 27: 80–85.
- Lozano ME, Ghiringhelli PD, Romanowski V, Grau O 1993. A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junín virus in whole blood samples. *Virus Res.* 27: 37–53.
- Lukashevich IS 1992. Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology* 188: 600–605.
- Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AM, Figueiredo LTM 2010. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Tro* 43: 229–233.
- Macher AM, Wolfe MS 2006. Historical Lassa Fever Reports and 30-year Clinical Update. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 835–837.
- Mackenzie RB, Beye HK, Valverde L, Garron H 1964a. Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 620–625.

- Mackenzie RB, Beye HK, Valverde L, Garrón H 1964b. Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia. I. A preliminary report of the epidemiologic and clinical findings in a new epidemic area in South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 620–625.
- Mahmutovic S, Clark L, Levis SC, Briggiler AM, Enria DA, Harrison SC, Abraham J 2015. Molecular Basis for Antibody-Mediated Neutralization of New World Hemorrhagic Fever Mammarenaviruses. *Cell Host Microbe.* 9; 18:705-13.
- Maiztegui JI 1975. Clinical and epidemiological patterns of argentine hemorrhagic fever. *Bull World Heal. Organ* 52: 567–575.
- Maiztegui JI, Fernandez NJ, Damilano AJ de 1979. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome.
- Maiztegui JI, Feuillade MR, Briggiler AM 1986. Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine hemorrhagic fever. *Med Microbiol Immunol* 175.
- Maiztegui JI, McKee KT, Barrera Oro JG, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, Enria DA, Briggiler AM, Levis SC, Ambrosio AM, Halsey NA, Peters CJ 1998. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *AHF Study Group.*
- Maiztegui JI, Sabattini MS 1977. Extension progresiva del area endemica de Fiebre hemorraigica. *Medicina (B. Aires).* 37: 162–166.
- Manzione N de, Salas RA, Paredes H, Godoy O, Rojas L, Araoz F, Fulhorst CF, Ksiazek TG, Mills JN, Ellis BA, Peters CJ, Tesh RB 1998. Venezuelan hemorrhagic fever: clinical and epidemiological studies of 165 cases. *Clin. Infect. Dis.* 26: 308–313.
- Manzione N, Salas RA, Paredes H, Enria D, Briggiler AM 1995. *Manual para la Vigilancia Epidemiológica* Ministerio del Poder popular para la salud y protección Social.
- Marta RF, Montero VS, Hack CE, Sturk A, Maiztegui JI, Molinas FC 1999. Proinflammatory cytokines and elastase-alpha-1-antitrypsin in Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 85–89.

- Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA 2007. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J. Gen. Virol.* 88: 1776–1784.
- Mathews, F. (2009) 'Zoonoses in wildlife integrating ecology into management', *Adv Parasitol*, 68, pp. 185-209.
- McKee KT, Barrera Oro JG, Kuehne AI, Spisso J, Mahlandt BG 1993. Safety and immunogenicity of a live attenuated Junin (Argentine hemorrhagic fever) vaccine in Rhesus macaques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 403–411.
- McKee KT, Mahlandt BG, Maiztegui JI, Green DE, Peters CJ 1987. Virus-specific factors in experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques. *J. Med. Virol.* 22: 99–111.
- Mclay L, Ansari A, Liang Y, Ly H 2013. Targeting virulence mechanisms for the prevention and therapy of arenaviral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 97: 81–92.
- Mello, J., Andrade, B. T., Melchiori, C. E. and Oliveira, Y. R. (2014) A inclusão produtiva rural do Brasil sem Miséria: estratégias e primeiros resultados. *O Brasil sem miséria* Brasília: MDS, p. 447-465.
- Mercado RR 1975. Rodent control programmes in areas affected by Bolivian haemorrhagic fever. *Bull World Heal. Organ* 52: 1–10.
- Meyer BJ, la Torre JC de, Southern PJ 2002. Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 262: 139–157.
- Meyer BJ, Southern PJ 1994. Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs. *J. Virol.* 68: 7659–7664.
- Milazzo ML, Cajimat MNB, Duno G, Duno F, Utrera A, Fulhorst CF 2011. Transmission of Guanarito and Pirital Viruses among Wild Rodents, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 2209–2215.
- Mills JN, Alva H, Ellis BA, Wagoner KD, Childs JE, Calderón G, Enría DA, Jahrling PB 2007. Dynamics of oliveros virus infection in rodents in central Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 315–323.

- Mills JN, Barrera Oro JG, Bressler DS, Childs JE, Tesh RB, Smith JF, Enria DA, Geisbert TW, McKee KT, Bowen MD, Peters CJ, Jahrling PB 1996. Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (Arenaviridae: Arenavirus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 399–404.
- Mills JN, Childs JE 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 529–537.
- Mills JN, Ellis BA, Childs JE, McKee KT, Maiztegui JI, Peters CJ, Ksiazek TG, Jahrling PB 1994. Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 554–562.
- Mills JN, Ellis BA, McKee KT, Calderon GE, Maiztegui JI, Nelson GO, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE 1992. A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 749–763.
- Mills JN, Ellis BA, McKee KT, Ksiazek TG, Oro JG, Maiztegui JI, Calderon GE, Peters CJ, Childs JE 1991. Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 589–597.
- Molinas FC, Bracco MM, Maiztegui JI 1989. Hemostasis and the Complement System in Argentine Hemorrhagic Fever. *Rev. Infect. Dis.* 11.
- Monath T, Mertens P, Patton R, Moser C, Baum J, Pinneo L, Gary C, Kissling R 1973. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972. *Am J Trop Med Hyg* 22: 773–779.
- Morse, S. S. (1995) 'Factors in the emergence of infectious diseases', *Emerg Infect Dis*, 1(1), pp. 7-15.
- Muhire B, Martin DP, Brown JK, Navas-Castillo J, Moriones E, Zerbini FM, Rivera-Bustamante R, Malathi VG, Bridson RW, Varsani A 2013. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). *Arch Virol* 158:1411–1424.
- Murphy FA, Webb PA, Johnson KM, Whitfield SG, Chappell WA 1970. Arenoviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J Virol* 6:507–518.

- Nowak RM 1991. Walker's mammals of the world. Johns Hopkins University Press., Baltimore.
- Oliveira J, Bonvicino C 2006. Ordem Rodentia. In: Reis N, Peracchi A, Pedro W, Lima I (Eds.), Mamíferos do Bras., Suprema, Londrina, Paraná, pp. 347–400.
- Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, Conlan S, Quan P-L, Hui J, Marshall J, Simons JF, Egholm M, Paddock CD, Shieh W-J, Goldsmith CS, Zaki SR, Catton M, Lipkin WI 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N. Engl. J. Med.* 358: 991–998.
- Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero S, Frigerio M, la Barrera JM de, Mettier N, Garzon F, Boxaca M, Guerrero L de, Nota N 1958. Sobre la etiologia del brote epidemico. *Dia Médico* 30: 2300–2301.
- Patterson M, Grant A, Paessler S 2014. Epidemiology and pathogenesis of Bolivian hemorrhagic fever. *Curr Opin Virol.* 5: 82-90.
- Paweska JT, Sewlall NH, Ksiazek TG, Blumberg LH, Hale MJ, Lipkin WI, Weyer J, Nichol ST, Rollin PE, McMullan LK, Paddock CD, Briese T, Mnyaluza J, Dinh TH, Mukonka V, Ching P, Duse A, Richards G, de Jong G, Cohen C, Ikalafeng B, Mugero C, Asomugha C, Malotle MM, Nteo DM, Misiani E, Swanepoel R, Zaki SR 2009. Outbreak Control and Investigation Teams. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa. *Emerg Infect Dis.* 15:1598-602.
- Pedrosa PBS, Cardoso TAO 2011. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects. *Int. J. Infect. Dis.* 15: e366–e376.
- Perez M, la Torre JC de 2003. Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 77: 1184–1194.
- Perry, B. D., Grace, D. and Sones, K. (2013) 'Current drivers and future directions of global livestock disease dynamics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(52), pp. 20871-7.
- Peters C, Kuehne R, Mercado R, Bow R Le, Spertzel R, Webb P 1974. Hemorrhagic fever in Cochabamba, Bolivia, 1971. *Am J Epidemiol.* 99: 425–433.

- Peters CJ 2006. Emerging infections: lessons from the viral hemorrhagic fevers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 117: 1–10.
- Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT 1987. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 134: 55–68.
- Peters CJ, Kufhne RW, Mercado RR, Bow RH Le, Spertzei RO, Webb PA 1971. HEMORRHAGIC FEVER IN COCHABAMBA, BOLIVIA. *Am. J. Epidemiol.*: 1–10.
- Peters CJ, Webb PA, Johnson KM 1973. Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect fluorescent technique. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 526–531.
- Pfeffer, M. and Dobler, G. (2010) 'Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration', *Parasit Vectors*, 3(1), pp. 35.
- Pinheiro F, Shope RE, Andrade AP, Ba G 1966. Amapari, a New Virus of the Tacaribe Group from Rodents and Mites of Amapa Territory, Brazil. *Exp. Biol. Med.* 122: 531–535.
- Pinheiro F, Webber JP, Rosa Travassos APA Da 1977. Studies of arenaviruses in Brazil. *Medicina (B. Aires)*. 37: 175–181.
- Pinschewer DD, Perez M, la Torre JC de 2003a. Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J. Virol.* 77: 3882–3887.
- Pinschewer DD, Perez M, Sanchez AB, la Torre JC de 2003b. Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 7895–7900.
- Pirosky I, Zuccarini J, Molinelli EA, Pietro A Di, Barrera Oro JG, Martini P, Copello AR 1959. *Virosis Hemomigica del Noroeste Bonaerense*, Ministerio de Asistencia Social y Salud Publica, Buenos Aires. *Dia Médico* 1: 1–10.
- Ponzinibbio C, González PH, Maiztegui J, Laguens RP 1979. [Morphological study of human bone marrow in Argentinian hemorrhagic fever]. *Medicina (B. Aires)*. 39: 441–446.

- Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LM, Dong H, Wallat GD, Ly H, Liang Y, Dong C 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468: 779–783.
- Raaben M, Jae LT, Herbert AS, Kuehne AI, Stubbs SH, Chou YY, Blomen VA, Kirchhausen T, Dye JM, Brummelkamp TR, Whelan SP 2017. NRP2 and CD63 Are Host Factors for Lujo Virus Cell Entry. *Cell Host Microbe*. 8;22: 688-696.e5.
- Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H 2007. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446: 92–96.
- Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, DeRisi JL, Emonet S, Gonzalez JP, Kuhn JH, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V, Salvato MS, Stenglein MD, de la Torre JC 2015. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol* 160: 1851-1874.
- Radoshitzky SR, Kuhn JH, Kok-Mercado F de, Jahrling PB, Bavari S 2012. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Expert Opin. Drug Discov.* 7: 613–632.
- Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM 1997. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol.* 41: 305–310.
- Rivers TM, Scott TFM 1936. Meningitis in man caused by a filterable virus. II. Identification of the etiological agent. *J Exp Med* 63: 415–432.
- Rodas JD, Salvato MS 2006. Tales of mice and men: Natural History of Arenaviruses. *Rev Col Cienc Pec* 19: 1–10.
- Rojek JM, Sanchez AB, Nguyen NT, la Torre J-C de, Kunz S 2008. Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J. Virol.* 82: 7677–7687.
- Rowe WP, Murphy FA, Bergold GH, Casals J, Hotchin J, Johnson KM, Lehmann-Grube F, Mins CA, Traub E, Webb PA 1970. Arenoviruses: Proposed Name for a Newly Defined Virus Group. *J. Virol.* 5: 651–652.

- Ruo SL, Mitchell SW, Kiley MP, Roumillat LF, Fisher-Hoch SP, McCormick JB 1991. Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3): 549–555.
- Sabattini MS, Gonzalez de Rios LE, Dial G, Vega VR 1997. Infección natural y experimental de roedores con virus Junin. *Medicina (B. Aires).* 37: 149–159.
- Salas R, Manzione N de, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, Betancourt A, Godoy O, Bruzual R, Pacheco ME, Ramos B 1991. Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 338: 1033–1036.
- Salazar-Bravo J, Dragoo JW, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG, Yates TL 2002. Natural nidity in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1: 191–199.
- Salvato MS, Clegg JCS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Rico-Hesse R, Romanowski V 2005a. Classification and Nomenclature of Viruses. 8th ICTV Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses.
- Salvato MS, Clegg JCS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Rico-Hesse R, Romanowski V 2005b. Family Arenaviridae. In: : Van Regenmortel MH V, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), Taxon. Eighth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses., Academic Press.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Laboratory Press.
- Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP 1989. Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J. Gen. Virol.* 70: 1125–1132.
- Sayler KA, Barbet AF, Chamberlain C, Clapp WL, Alleman R, Loeb JC, Lednicky JA 2014. Isolation of Tacaribe virus, a Caribbean arenavirus, from host-seeking *Amblyomma americanum* ticks in Florida. *PLoS One.* 23;9:e115769.
- Schneider, S. and Cassol, A. (2014) 'Diversidade e heterogeneidade da agricultura familiar no Brasil e algumas implicações para políticas públicas', *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 31(2), pp. 227-263.

- Sevilla N, la Torre JC de 2006. Arenavirus diversity and evolution: quasispecies in vivo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299: 315–335.
- Shaffer JG, Grant DS, Schieffelin JS, Boisen ML, Goba A, Hartnett JN, Levy DC, Yenni RE, Moses LM, Fullah M, Momoh M, Fonnies M, Fonnies R, Kanneh L, Koroma VJ, Kargbo K, Ottomassathien D, Muncy IJ, Jones AB, Illick MM, Kulakosky PC, Haislip AM, Bishop CM, Elliot DH, Brown BL, Zhu H, Hastie KM, Andersen KG, Gire SK, Tabrizi S, Tariyal R, Stremlau M, Matschiner A, Sampey DB, Spence JS, Cross RW, Geisbert JB, Folarin OA, Happi CT, Pitts KR, Geske FJ, Geisbert TW, Sapphire EO, Robinson JE, Wilson RB, Sabeti PC, Henderson LA, Khan SH, Bausch DG, Branco LM, Garry RF 2014. Viral Hemorrhagic Fever Consortium. Lassa fever in post-conflict sierra leone. *PLoS Negl Trop Dis.* 20;8:e2748.
- Shimajima M, Kawaoka Y 2012. Cell Surface Molecules Involved in Infection Mediated by Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 1363–1366.
- Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y 2010. A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J. Virol.* 84: 5415–5422.
- Simone C Di, Buchmeier MJ 1995. Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* 209: 3–9.
- Simone C Di, Zandonatti MA, Buchmeier MJ 1994. Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198: 455–465.
- Singer, P., Silva, R. M. A. D. and Schiochet, V. (2014) *Economia solidária e os desafios da superação da pobreza extrema no Plano Brasil Sem Miséria. O Brasil sem miséria* Brasília: MDS, p. 425-446.
- Smith MF, Patton JL 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol. Biol. Evol.* 8: 85–103.

- Spiropoulou CF, Kunz S, Rollin PE, Campbell KP, Oldstone MBA 2002. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J. Virol.* 76: 5140–5146.
- Stenglein MD, Jacobson ER, Chang LW, Sanders C, Hawkins MG, Guzman DS, Drazenovich T, Dunker F, Kamaka EK, Fisher D, Reavill DR, Meola LF, Levens G, DeRisi JL 2015. Widespread recombination, reassortment, and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. *PLoS Pathog.* 20; 11:e1004900.
- Stenglein MD, Sanders C, Kistler AL, Ruby JG, Franco JY, Reavill DR, Dunker F, DeRisi JL 2012. Identification, Characterization, and In Vitro Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. *MBio* 3: e00180–12–e00180–12.
- Stephensen CB, Blount SR, Lanford RE, Holmes K V, Montali RJ, Fleenor ME, Shaw JF 1992. Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *J Med Virol* 38: 27–31.
- Strecker T, Eichler R, Meulen J ter, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O 2003. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J. Virol.* 77: 10700–10705.
- Su, J. M., Perlaky, L., Li, X. N., Leung, H. C., Antalffy, B., Armstrong, D. and Lau, C. C. (2004) 'Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues', *Brain Pathol*, 14(2), pp. 175-82.
- Sumibcay, L., Kadjo, B., Gu, S. H., Kang, H. J., Lim, B. K., Cook, J. A., Song, J. W. and Yanagihara, R. (2012) 'Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire', *Virol J*, 9, pp. 34.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.

- Taubenberger, J. K. and Kash, J. C. (2010) 'Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation', *Cell Host Microbe*, 7(6), pp. 440-51.
- Terrell TG, Stookey JL, Spertzei RO, Kuehne RW 1973. Comparative histopathology of two strains of Bolivian hemorrhagic fever virus infections in suckling hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 22: 814–818.
- Tesh RB 2002. Viral hemorrhagic fevers of South America. *Biomedica* 22: 287–295.
- Tesh RB, Jahrling PB, Salas R, Shope RE 1994. Description of Guanarito virus (Arenaviridae: Arenavirus), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 452–459.
- Tesh RB, Wilson ML, Salas R, Manzione NM De, Tovar D, Ksiazek TG, Peters CJ 1993. Field studies on the epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever: implication of the cotton rat *Sigmodon alstoni* as the probable rodent reservoir. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 227–235.
- Timothy J, Doyle M, Ralph TB, Peters CJ 1998. Emerging infectious diseases viral hemorrhagic fevers and hantavirus infections in the americas. In: Doyle TJ, T BR, Clarence P (Eds.), *Infect. Dis. Clin. North Am.* pp. 95–110.
- Torres-Perez F, Wilson L, Collinge SK, Harmon H, Ray C, Medina RA, Hjelle B 2010. Sin Nombre virus infection in field workers, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 308–310.
- Tortorici MA, Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera Pomar R, Romanowski V 2001. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res.* 73: 41–55.
- Traub E 1936. An epidemic in a mouse colony due to the virus of acute lymphocytic choriomeningitis. *J Exp Med* 63: 533–546.
- Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J 2006. Cellular factors required for Lassa virus budding. *J. Virol.* 80: 4191–4195.
- Urata S, Yasuda J 2012. Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. *Viruses* 4: 2049–2079.

- Utrera A, Duno G 2007. Preferencias de hábitat de *Sigmodon alstoni* y *Zygodontomys brevicauda* (Rodentia, Cricetidae) en agroecosistemas de los llanos de Venezuela. *Interciencia* 32: 471–476.
- Utrera A, Duno G, Ellis BA, Salas RA, Manzione NM de, Fulhorst CF, Tesh RB, Mills JN 2000. Small mammals in agricultural areas of the western llanos of Venezuela: community structure, habitat associations, and relative densities. *J. Mammal.* 81: 536–548.
- Vainrub B, Salas R 1994a. Latin American hemorrhagic fever. *Infect Dis Clin North Am.* 8: 47–59.
- Vainrub B, Salas RA 1994b. Latin American Hemorrhagic Fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 8: 47–59.
- van den Hurk, A. F., Ritchie, S. A. and Mackenzie, J. S. (2009) 'Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus', *Annu Rev Entomol*, 54, pp. 17-35.
- Vargas HP 2013. BOTICA, Revista Digital Venezolana con Informacion para el Medico. Fiebre Hemorragica Venez. Fiebre Guanarito.
- Vasconcelos PFC, Andrade AP, Travassos Da Rosa APA, Rodrigues SG, Tesh R, Travassos da Rosa JFS, Travassos Da Rosa ES 1993. Infecção humana adquirida em laboratório causada pelo vírus SP H114202 (Arenavírus: Família Arenaviridae): Aspectos Clínicos e Laboratoriais. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 35: 521–525.
- Villagra M, Suarez L, Arce R, Moreira MG 1994. Bolivian hemorrhagic fever—El Beni Department, Bolivia, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 43.
- Vitullo AD, Hodara VL, Merani MS 1987. Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculinus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 663–669.
- Vitullo AD, Merani MS 1988. Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in nature? *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 6): 1437–1440.
- Vitullo AD, Merani MS 1990. Vertical transmission of Junin virus in experimentally infected adult *Calomys musculinus*. *Intervirology* 31: 339–344.

- Vora, N. (2008) 'Impact of anthropogenic environmental alterations on vector-borne diseases', *Medscape J Med*, 10(10), pp. 238.
- Voss R 1991. An introduction to the Neotropical Muroid rodent Genus *Zygodontomys*. *Bull AM Mus Nat Hist*.
- Wanderley, M. d. N. B. (2014) 'O campesinato brasileiro: uma história de resistência', *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 52(1), pp. 25-44.
- Weaver SC, Salas RA, Manzione N de, Fulhorst CF, Duno G, Utrera A, Mills JN, Ksiazek TG, Tovar D, Tesh RB 2000. Guanarito virus (Arenaviridae) isolates from endemic and outlying localities in Venezuela: sequence comparisons among and within strains isolated from Venezuelan hemorrhagic fever patients and rodents. *Virology* 266: 189–195.
- Webb PA, Johnson KM, Mackenzie RB 1969. The measurement of specific antibodies in bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *P. Soc. Exp. Biol.* 130: 1013–1019.
- Webb PA, Johnson KM, Mackenzie RB, Kuns ML 1967. Some characteristics of Machupo virus, causative agent of Bolivian hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 16.
- Webb PA, Justines G, Johnson KM 1975a. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull. World Health Organ.* 52: 493–499.
- Webb PA, Justines G, Johnson KM 1975b. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull World Heal. Organ* 52: 493–499.
- Weissenbacher MC, Laquens RP, Coto CE 1987. Argentine hemorrhagic fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 134: 76–116.
- Wiebenga NH 1965. Immunologic studies of Tacaribe, Junín and Machupo viruses. *Am J Trop Med Hyg* 14: 802–808.
- Wolff S, Ebihara H, Groseth A 2013. Arenavirus Budding: A Common Pathway with Mechanistic Differences. *Viruses*: 528–549.

- Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S, 2005. 'Host range and emerging and reemerging pathogens', *Emerg Infect Dis*, 11(12), pp. 1842-7.
- Woolhouse MEJ, Ashworth, JL 2017. Can we identify viruses with pandemic potential?, *Biochemical Society*, 39(3), pp. 8-11.
- York J, Nunberg JH 2006. Role of the stable signal peptide of Junín arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* 80: 7775–7780.
- Zapata JC, Salvato MS 2013. Arenavirus Variations Due to Host-Specific Adaptation. *Viruses*: 241–278.

9.1. QUADRO SUPLEMENTAR 1.1

Quadro 1.1. Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

Arenavírus	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
<i>Mammarenavirus</i>				
Allpahuayo (ALLV)	Novo Mundo Clade A	<i>Oecomys bicolor</i> <i>Oecomys paricola</i>	Peru – Loreto	<i>Desconhecido</i>
Amaparí (AMPV)	Novo Mundo Clade B	<i>Neacomys guianae</i>	Brasil-Amapá	<i>Desconhecido</i>
Bear Canyon (BCNV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Peromyscus californicus</i> <i>Neotoma macrotis</i>	EUA-Califórnia	<i>Desconhecido</i>
Chapare (CHPV)	Novo Mundo Clade B	<i>Desconhecido</i>	Bolívia-Cochabamba	Pequeno surto de Febre hemorrágica
Vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV)	Velho Mundo	<i>Mus musculus</i>	Mundial	Doença febril; meningite asséptica
Cupixi (CPXV)	Novo Mundo Clade B	<i>Hylaeamys megacephalus</i>	Brasil-Amapá	<i>Desconhecido</i>
Flexal (FLEV)	Novo Mundo Clade A	<i>Roedor oryzyomi</i> não <i>identificado</i>	Brasil-Pará	Doença febril, adquirida em laboratório
Gairo (GAIV)	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Tanzania - Majawanga	<i>Desconhecido</i>
Guanarito (GTOV)	Novo Mundo Clade B	<i>Zigodontomys brevicauda</i>	Venezuela central	Febre hemorrágica Venezuelana
Ippy (IPPV)	Velho Mundo	<i>Arvicanthis</i> sp.	África central	<i>Desconhecido</i>
Junín (JUNV)	Novo Mundo Clade B	<i>Calomys musculinus</i>	Argentina central	Febre hemorrágica Argentina
Lassa (LASV)	Velho Mundo	<i>Mastomys</i> sp.	Oeste da África	Febre do Lassa
Latino (LATV)	Novo Mundo Clade C	<i>Calomys callosus</i>	Bolívia-Santa Cruz	<i>Desconhecido</i>

Quadro 1.1. cont. Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

Arenavírus	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
<i>Mammarenavirus</i>				
Loei River (LORV)	Velho Mundo	<i>Bandicota indica</i> , <i>B. savilei</i> e <i>Niviventer fulvescens</i>	Tailândia	Relacionado a doença febril aguda
Lujo (LUJV)	Velho Mundo	<i>Desconhecido</i>	Sudeste da África	Surto de febre hemorrágica de transmissão nosocomial
Luna (LUNV)	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Sudeste da África	<i>Desconhecido</i>
Lunk (LNKV)	Velho Mundo	<i>Mus Minutoides</i>	Zâmbia	<i>Desconhecido</i>
Machupo (MACV)	Novo Mundo Clade B	<i>Calomys callosus</i>	Bolívia-Beni	Febre hemorrágica Boliviana
Mariental (MRTV)	Velho Mundo	<i>Micaelamys namaquensis</i>	Namíbia	<i>Desconhecido</i>
Merino Walk (MEWV)	Velho Mundo	<i>Myotomys unisulcatus</i>	África do Sul	<i>Desconhecido</i>
Mobala (MOBV)	Velho Mundo	<i>Praomys</i> spp.	África Central	<i>Desconhecido</i>
Mopeia (MOPV)	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Sudeste da África (Moçambique e Zimbábue)	<i>Desconhecido</i>
Okahandja (OKAV)	Velho Mundo	<i>Micaelamys namaquensis</i>	Namíbia	<i>Desconhecido</i>
Oliveros (OLVV)	Novo Mundo Clade C	<i>Necromys benefactus</i>	Central da Argentina	<i>Desconhecido</i>
Paraná (PARV)	Novo Mundo Clade A	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Sul do Paraguai	<i>Desconhecido</i>
Pichindé (PICV)	Novo Mundo Clade A	<i>Oryzomys albigularis</i>	Sul da Colômbia	Soroconversão sem doença associada
Piritai (PIRV)	Novo Mundo Clade A	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela Central	<i>Desconhecido</i>
Sabiá (SABV)	Novo Mundo Clade B	<i>Desconhecido</i>	Brasil-São Paulo	Febre hemorrágica Brasileira e dois casos de infecção laboratorial subsequentes
Solwezi (SOLV)	Velho Mundo	<i>Grammomys</i> sp.	Zâmbia	<i>Desconhecido</i>

Quadro 1.1. *cont.* Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

Arenavírus	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
<i>Mammarenavirus</i>				
Tacaribe (TACV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Artibeus (Artibeus) jamaicensis trinitatis</i>	Trinidad	Doença febril, adquirida em laboratório
Tamiami (TAMV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Sigmodon hispidus</i>	EUA-Florida	<i>Desconhecido</i>
Wenzhou (WENV)	Velho Mundo	<i>Rattus novergicus, Niniventer niniventer, R. exulans, R. rattus, Suncus murinus</i>	China e Cambodia	<i>Doença febril</i>
Withewater Arroyo (WWAV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma spp.</i>	Sudeste dos EUA	Possível caso de febre hemorrágica
<i>Reptarenavirus</i>				
<i>Alethinophid 1</i>	Não definida	<i>Boa constrictor</i>	EUA- California	Associado com corpusculo de inclusão em serpentes de cativeiro
<i>Alethinophid 2</i>	Não definida	<i>Boa constrictor, Corallus annulatus, C. hortulanus</i>	Finlândia	Associado com corpusculo de inclusão em serpentes de cativeiro
<i>Alethinophid 3</i>	Não definida	<i>Corallus annulatus</i>	EUA- California	Associado com corpusculo de inclusão em serpentes de cativeiro

9.2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-39/14

Certificamos que o protocolo (P-70/13.2), intitulado “ESTUDOS TAXONÔMICOS E ECO-EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES NÃO VOADORES DO BRASIL”, sob a responsabilidade de PAULO SERGIO D’ANDREA atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/05/2018 e inclui o uso total de:

Marsupialia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas.

Rodentia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2014.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04628550

9.3. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/FIOCRUZ



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecção por robovirus e rickettsias lato sensu em diferentes populações rurais do Brasil

Pesquisador: Elba Regina Sampaio de Lemos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61629416.2.1001.5248

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Instituto Oswaldo Cruz-RJ
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.986.413

Apresentação do Projeto:

O presente estudo visa avaliar a prevalência de infecção por robovirus (arenavirus e hantavirus) e por rickettsias "lato sensu" - Anaplasma, Bartonella, Coxiella burnetii, Ehrlichia e Rickettsia - em indivíduos residentes em áreas rurais, onde se verifica, com frequência ausência de infraestrutura, segregação social e espacial levando a inúmeras exposições a condições insalubres comparadas com as áreas urbanas. O Brasil se destaca pela sua extensão territorial, seus diferentes biomas e sua grande biodiversidade com 80,25 milhões de hectares de área da agricultura familiar no Brasil, dos quais 45% destinam-se às pastagens e 22%, a lavouras. Devido à utilização da terra na maior parte do país, um processo de fragmentação acelerado vem sendo observado em todo território, colocando em risco a grande diversidade e aumentando o impacto na dinâmica de transmissão das doenças zoonóticas que, com maior frequência, acometem populações de áreas rurais e de regiões de transição entre o ambiente rural e silvestre. Diante do exposto e levando em conta que o uso e manejo da terra, durante as diversas atividades realizadas por indivíduos residentes em áreas rurais, pode intensificar o contato com animais silvestres com consequente aumento do risco de transmissão de robovirus (vírus transmitidos por roedores) e rickettsias "lato sensu", uma análise retrospectiva de amostras de sangue de populações rurais previamente coletadas por diferentes grupos de pesquisa no território brasileiro será realizada durante o período de 2017 a 2020.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.986.413

Espera-se, com o desenvolvimento do presente estudo, no qual é estimada a análise de 2500 amostras de sangue, aumentar o nosso conhecimento sobre estes agentes zoonóticos, além de contribuir com a formação de recursos humanos e na implantação de medidas preventivas necessárias para reduzir o risco de infecção por estes agentes de elevada morbidade e letalidade em nosso território.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o perfil soropidemiológico de infecção por robovírus e rickettsias lato sensu em diferentes populações rurais do Brasil.

Objetivos Secundários:

1) Realizar a detecção de anticorpos da classe IgG em amostra de soro de indivíduos residentes em áreas rurais com ênfase nas áreas agrícolas; 2) Estimar a prevalência de infecção por agentes zoonóticos associados aos diferentes tipos de atividades agrícolas realizadas por estes indivíduos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esta investigação não oferece riscos aos participantes. Todo material utilizado já foi coletado previamente. A proposta deste projeto é ampliar os conhecimentos a partir de estudos prévios, aumentando os benefícios das pesquisas realizadas, com mais baixo custo e com encaminhamento dos resultados para as instituições de vigilância epidemiológica, visando contribuir com a saúde pública.

Benefícios:

Diante do exposto, este trabalho se propõe a contribuir com o conhecimento das zoonoses, com ênfase nas roboviroses e nas rickettsioses "lato sensu" no Brasil, em populações rurais com ênfase nos pequenos agricultores. Com o desenvolvimento do presente projeto, será possível fortalecer a Política Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta proposta pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e o sistema de vigilância em áreas rurais e silvestres em populações de baixo poder aquisitivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.986.413

O presente estudo se baseia na análise retrospectiva de amostras de populações rurais previamente coletadas por diferentes grupos de pesquisa no território nacional. Sucintamente é apresentada, a seguir, uma descrição de cada uma das populações recrutadas até a presente data, considerando que novas populações poderão ser incluídas, especialmente da região Norte do Brasil, em áreas próximas à Venezuela onde o arnavírus Guanarito circula e é o agente da febre hemorrágica venezuelana e à Guiana Francesa, país com maior número de casos de febre Q, zoonose causada por *C burnetii*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto; projeto detalhado; Carta solicitando liberação de TCLE estão em conformidade com a Resol. 466/12 do CNS. Foram incluídos todos os Termos de Anuência_MS.; Termos de Anuência_MT; Termos de Anuência_GO; Termo de Compromisso BIOBANCO_MT; Carta BIOBANCO e Carta resposta ponto a ponto.

Recomendações:

Projeto deverá ser desenvolvido na forma que foi aprovado pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas pela pesquisadora principal, conforme solicitado pelo CEP Fiocruz/IOC. A saber:

1- Incluir os Termos de anuência de todos os centros envolvidos como o de SP.

Pendência atendida

2- Detalhar sobre novas amostras, de onde serão recebidas

Pendência atendida na carta resposta da pesquisadora principal

3- Ajuste de cronograma, esclarecer se o projeto já foi iniciados.

Pendência atendida

4- Esclarecer se os participantes foram informados sobre o destino dado a seu soro em pesquisas anteriores?

Pendência atendida

5- Apresentar os riscos da pesquisa, toda pesquisa com seres humanos envolve algum tipo de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.986.413

risco

Pendência atendida

6- O estudo é retrospectivo, como serão incluídas novas amostras?

A pesquisadora principal esclareceu na carta ponto a ponto, Pendência atendida.

7- Advindas de outros estudos? Incluir TCLE para as novas amostras.

A pesquisadora esclareceu que não serão coletadas novas amostras, serão utilizadas as já obtidas em duas outras instituições que no momento em que forem utilizadas no estudo, antes de iniciar, será solicitada ao CEP Fiocruz/IOC nova avaliação.

Pendência atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, em sua 225.2ª Reunião Extraordinária, realizada em 28.03.2017, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se por APROVADA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_798724.pdf	27/03/2017 08:24:27		Aceito
Outros	RESPOSTA_CEP_2017.pdf	27/03/2017 08:24:05	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	anuencia_SP.pdf	24/03/2017 16:55:08	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	anuencia_MS.pdf	24/03/2017 16:54:29	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	anuencia_MT.pdf	24/03/2017 16:54:04	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	anuencia_GO.pdf	24/03/2017 16:50:07	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	Termo_Compromisso_BIOBANCO_MT.pdf	16/10/2016 18:26:41	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	CartaBIOBANCO.pdf	16/10/2016 18:24:37	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)**Bairro:** Manguinhos**CEP:** 21.040-360**UF:** RJ**Município:** RIO DE JANEIRO**Telefone:** (21)3882-9011**Fax:** (21)2561-4815**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.986.413

Biobanco	CartaBIOBANCO.pdf	16/10/2016 18:24:37	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Populacao_rural.doc	01/10/2016 12:40:50	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	30/09/2016 22:24:17	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_ANUENCIASP.pdf	26/09/2016 11:48:46	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA_TCLE.docx	26/09/2016 11:38:07	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	COOPERACAO_SP.docx	26/09/2016 10:21:05	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	COOPERACAO_MT.docx	26/09/2016 10:19:58	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	COOPERACAO_MS.docx	26/09/2016 10:19:32	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Outros	COOPERACAO_GOIAS.docx	26/09/2016 10:19:11	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	26/09/2016 10:02:36	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	26/09/2016 10:01:03	Elba Regina Sampaio de Lemos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 28 de Março de 2017

Assinado por:

José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br