

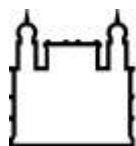
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

Helver Gonçalves Dias

INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS ZIKA E OUTROS FLAVIVÍRUS EM ANIMAIS SILVESTRES NO
CENTRO-OESTE DO BRASIL

Rio de Janeiro
2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Helver Gonçalves Dias

Investigação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil

Dissertação de mestrado apresentada à
coordenação do Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Orientador (es): **Dr^a. Flávia Barreto dos Santos**
Dr. Alex Pauvalid-Corrêa

RIO DE JANEIRO
31 de janeiro de 2019

Dias, Helver Gonçalves.

Investigação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil

/ Helver Gonçalves Dias. - Rio de Janeiro, 2019.

163 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

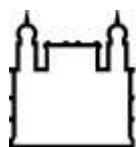
Orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

Co-orientador: Alex Pauvolid-Corrêa.

Bibliografia: f. 65-90

1. Vírus zika. 2. Flavivírus. 3. Animais silvestres. 4. centro-oeste. 5. Brasil. I. Título.

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

Helver Gonçalves Dias

Investigação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil

Orientadora: Dr^a Flávia Barreto dos Santos

Coorientador: Dr. Alex Pauvolid-Corrêa

Banca examinadora:

Dr^a. Elba Regina Lemos - Presidente (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Norma Suely de Oliveira Santos (UFRJ/IMPPG)

Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos (IEC)

Dr^a. Maria Angélica Monteiro de Mello Mares-Guia (Fiocruz/IOC)

Prof. Dr. Renato Santana de Aguiar (UFRJ/IB)

Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2019

À Ilka de Souza Pecego.

Aos meus pais, Inez e Luiz.

AGRADECIMENTOS

À Flavia Barreto dos Santos, minha orientadora, pelas boas conversas, pelo apoio e carinho incondicionais, por acreditar no meu potencial, pelo incentivo inexorável aos seus alunos e por defendê-los como uma mãe defende seus filhos. Sem o seu apoio, palavras acolhedoras e diplomacia esse trabalho teria sido mais difícil.

Ao coorientador Alex Pauvalid-Corrêa, que chegou de pára-quadras e se tornou um amigo. Obrigado pelas conversas, pelos ensinamentos pessoais e profissionais que levarei para a vida. Obrigado pela grande oportunidade que foi participar do projeto Ecologia do vírus zika na América do Sul. Suas contribuições pessoais para a arbovirologia brasileira, em especial no Pantanal, me motivam a pesquisar neste vasto e ainda desconhecido universo dos arbovírus silvestres.

À Ilka de Souza Pecego, por me amar como seu neto, mesmo sem vínculo sanguíneo. Sua imagem sempre estará na minha mente, seu amor sempre estará no meu coração. Obrigado por tudo.

Aos meus pais, Inez e Luiz, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e por serem o meu alicerce. Obrigado por viverem em prol dos seus filhos, abrindo mão dos seus próprios sonhos. Ambos vieram ainda adolescentes do nordeste, tentar a vida na cidade grande. Orgulhem-se, pois hoje, seus dois filhos são formados em universidades públicas e eu, Mestre. Vocês são fonte eterna da minha admiração, respeito e amor.

Ao meu irmão, Elmer Dias. Obrigado por esses anos de convivência e companheirismo, o vínculo que nos une é indestrutível.

Ao João Vitor Esteves, meu velho amigo, obrigado pelo sempre presente ombro amigo, pelas palavras necessárias, por incentivar e acreditar. Nossas aventuras serão passadas por gerações.

À Gabriela Cardoso Caldas, amiga que conquistei no decorrer desta dissertação. Obrigado pelo convívio diário, repleto de atenção, carinho, amor e palavras doces. Obrigado por ouvir as lamúrias dos resultados negativos. Sem você, eu não teria conhecido a Flávia e os caminhos teriam sido outros. Sem você os dias no HPP não teriam a mesma felicidade.

Ao Lucas Cavalcanti. Há alguns anos, ninguém imaginaria que você estaria nos meus agradecimentos. Fico feliz de incluí-lo aqui. Obrigado, querido.

Ao Hugo Rodrigues Marins. Obrigado pelos abraços sempre calorosos e por esses anos de amizade.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Viral (LIV). Às coordenadoras do LIV, Dr^a. Luzia Pinto e Dr^aa. Elzinandes Azeredo. Aos colegas de trabalho, Priscila Guerra, Monique Lima, Manoela Heringer, Patrick Souza, Thiara Manuele, Juan Camilo, Luciana Santos, Iury Paiva, Jéssica Badolato, Marcio Cipitelli, Gabriel Guimarães, Thais Chouin, Débora Familiar, Raquel Curtinhas, Caroline dos Santos, Larissa Tomé e Flávio Virla.

Aos amigos da turma de mestrado da Pós-graduação em Medicina Tropical, Carol, Érica, Filipe, Flávia, Igor, Ingrid, Isabela, Mariana, Patrick, Daniel, Pedro e Viviane. Aos agregados também, William, Nathália, Peliganga e Luciana.

Às instituições parceiras que muito contribuíram para o desenvolvimento deste estudo, em especial no trabalho de campo para amostragem dos animais. Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) e Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Campo Grande (CRAS).

Aos colaboradores envolvidos no estudo Ecologia do vírus zika na América do Sul, em especial Gilberto Sabino Santos-Junior, Jaire Torres, Andressa Zelinski, Wesley Nantes, Wanessa Barreto, Gabriel Macedo, Laura Maia, Grasiela Porfírio, Paulo Mallmann, Jean Carvalho, Emilly Hannon, Heitor Herrera, Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, Emily Miranda, Sheila Lima, Flávia Barreto dos Santos, Ana Bispo de Fillippis, Renata Dezengrini Shhessarenko, Stephanie Salyer, Joel Montgomery e Nicholas Komar.

Ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e todos os envolvidos desta instituição, os quais cumprimento a pessoa do Dr. Nicholas Komar. A participação no projeto Ecologia do vírus zika na América do Sul notadamente contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado pela oportunidade.

À coordenadora de curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Marta Cecília Suarez Muthis, pela sempre carinhosa e simpática recepção.

À Lívia, secretária da Pós-graduação em Medicina Tropical. Obrigado por sempre solucionar os problemas, esclarecer as dúvidas e por desburocratizar, sempre que possível, os caminhos institucionais.

À Pós-graduação em Medicina Tropical, pelo apoio financeiro no trabalho de campo e participação em congressos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida durante parte do desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa de mestrado nota 10 concedida durante parte do desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz.

Às minhas ex-orientadoras Selma Majerowicz (EPSJV/Fiocruz), Norma Santos e Gabriella Mendes (IMPG/UFRJ), pelos ensinamentos que levarei para vida.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG/UFRJ), casa que sempre me recebe de braços abertos.

Aos amigos do Laboratório de Vírus Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO) do IMPG/UFRJ, pela recepção calorosa durante as minhas visitas.

Ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS), o qual cumprimento a Dr^a Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira e o Dr. Fernando do Couto Motta, pela gentil autorização do uso do equipamento de PCR em tempo real.

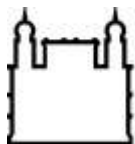
Ao Laboratório de Flavivírus, o qual cumprimento a Dr^a Ana Maria Bispo de Fillippis, pela colaboração e gentil autorização de uso do espaço e equipamentos do laboratório.

À Dr^a. Elba Regina Lemos pelo gentil aceite em revisar este trabalho.

À Dr^a. Elba Regina Lemos, Dr. Pedro Vasconcelos, Dr^a Norma Santos, Dr^a Maria Angélica Guia e Dr. Renato Santana de Aguiar pelo aceite em compor a banca de mestrado.

“Basta que os pesquisadores olhem pela janela e se deparem com a carência das comunidades que nos cercam para se certificarem do quanto nosso trabalho é importante”

Hermann Gonçalves Schatzmayr



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Investigação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil

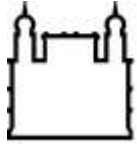
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Helver Gonçalves Dias

À exceção dos estudos sobre o vírus da febre amarela em primatas não humanos (PNH) no Brasil, estudos sobre outros flavivírus em diferentes espécies silvestres de vida livre no país, são escassos. Neste sentido, como parte de um estudo de ecologia do vírus Zika (*Zika virus* ou ZIKV) do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) na América do Sul, uma investigação sobre o ZIKV e outros flavivírus foi conduzida em animais silvestres capturados entre 2017 e 2018, em área metropolitana de Cuiabá e Campo Grande, na Região Centro-Oeste do Brasil. Amostras de sangue foram coletadas de 685 indivíduos hígidos de vinte espécies, comumente observadas em parques locais, incluindo mamíferos (N = 372), répteis (N = 213) e anfíbios (N = 100). Amostras de sangue total foram submetidas à extração de ácido ribonucleico (RNA), seguida de reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real para o gênero flavivírus. As amostras positivas foram então confirmadas através de RT-PCR específica para ZIKV e sequenciamento nucleotídico. Um total de 43 (6,3%) amostras foi positivo no RT-PCR para flavivírus e negativo no RT-PCR específico para ZIKV. Todas as 43 amostras positivas para RT-PCR de flavivírus foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico, mas nenhuma apresentou similaridade às sequências de nucleotídeos ou proteínas de flavivírus, disponíveis na ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST). Dos 685 animais testados por RT-PCR, 174 (25,4%) tiveram amostras de plasma também submetidas ao teste de neutralização por redução de placas (PRNT₉₀) para detecção de anticorpos neutralizantes para ZIKV. Das 174 amostras testadas, sete (4%) foram sororeativas (PRNT₉₀ título ≥ 10), incluindo três capivaras

(Campo Grande), um morcego (Cuiabá), um quati (Campo Grande), um gambá (Cuiabá) e um macaco-prego (Campo Grande), todos capturados em 2017. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem ausência de infecção aguda, mas potencial exposição ao ZIKV de animais silvestres de vida livre capturados em área metropolitana de Cuiabá e Campo Grande, entre 2017 e 2018. Mais estudos são necessários, incluindo análises de diferentes tipos de amostras de cada indivíduo, bem como a pesquisa de anticorpos neutralizantes para outros flavivírus para descartar reações heterólogas e confirmar exposição ao ZIKV de animais silvestres da Região Centro-Oeste do Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Investigation of Zika virus and others flaviviruses in wild animals in West-central Brazil

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Helver Gonçalves Dias

Despite some yellow fever studies in nonhuman primates (NHP) in Brazil, investigations for other flaviviruses, involving different free-ranging wild species in the country, are scarce. In this sense, as part of a Zika virus (ZIKV) ecology study of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in South America, an investigation for ZIKV and other flaviviruses was conducted with wild animals captured between 2017 and 2018, in metropolitan areas of Cuiabá and Campo Grande, West-Central Brazil. Blood samples were collected from 685 healthy individuals of twenty species, commonly seen in local parks, including mammals (n=372), reptiles (n=213) and amphibians (n=100). Whole blood samples were submitted to ribonucleic acid (RNA) purification and screened by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the flavivirus genus. Positive samples were confirmed by specific RT-PCR for ZIKV and nucleotide sequencing. A total of 43 (6.3%) samples were positive by RT-PCR for flaviviruses, but negative by ZIKV-specific RT-PCR. All 43 flavivirus-RT-PCR positive samples were submitted to nucleotide sequencing, but none showed regions of similarity to nucleotide or protein sequences of flaviviruses available at the basic local alignment search tool (BLAST). Of the 685 animals tested by RT-PCR, 174 (25.4%) had also plasma samples tested by plaque reduction neutralization test (PRNT₉₀) for the detection of neutralizing antibodies to ZIKV. Of the 174 samples tested, seven (4%) were seroreactive (PRNT₉₀ titre ≥ 10), including three capybara (Campo Grande), one bat (Cuiabá), one coati (Campo Grande), one possum (Cuiabá) and one capuchin monkey (Campo Grande). The present results suggest the absence of acute infection, but potential exposure to ZIKV of

free-ranging wild species in metropolitan areas of Cuiabá and Campo Grande, between 2017 and 2018. More studies are needed, including testing other tissues of each individual, as well as testing ZIKV-seroreactive samples to other flaviviruses to discard heterologous reactions, to confirm ZIKV exposure of wild species in West-Central Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.....	2
Ciclos de transmissão de arbovírus.	
Figura 02.....	5
Mapa de distribuição mundial das principais arboviroses de interesse em saúde pública.	
Figura 03.....	6
Representação esquemática da organização do genoma dos flavivírus.	
Figura 04.....	10
Primatas não humanos envolvidos na transmissão enzoótica do ZIKV na África.	
Figura 05.....	11
PNH envolvidos no potencial ciclo de transmissão enzoótico do ZIKV no Brasil. TT: transmissão transovariana.	
Figura 06.....	12
Dinâmica de transmissão do YFV.	
Figura 07.....	13
Área com recomendação de vacinação contra febre amarela no Brasil no ano de 2018.	
Figura 08.....	15
Expansão da febre amarela no Brasil desde a década de 1990.	
Figura 09.....	20
Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil cuja circulação do ILHV foi detectada.	

Figura 10.....	22
Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil cuja circulação do ROCV foi detectada.	
Figura 11.....	25
Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil cuja circulação do SLEV foi detectada.	
Figura 12.....	33
Localização das áreas de coleta em MT e MS (pontos vermelhos) na Região Centro-Oeste do Brasil, áreas de realização das amostragens.	
Figura 13.....	34
Localização dos subsítios amostrados no presente estudo.	
Figura 14.....	42
Esquema representativo do fluxo de testagem das amostras por PRNT ₉₀ .	
Figura 15.....	43
Captura de mamíferos silvestres e coleta de material clínico em parques florestais urbanos localizados em áreas metropolitanas de Cuiabá, MT e Campo Grande, MS, 2017 e 2018.	
Figura 16.....	47
Extração de RNA realizada no Laboratório de Nível de Biossegurança 3.	
Figura 17.....	48
Gráfico da curva de dissociação da RT-PCR em tempo real para detecção de flavivírus.	
Figura 18.....	49
Distribuição das espécies no grupo de amostras reativas por RT-PCR em tempo real para detecção de flavivírus provenientes do Centro-oeste.	

Figura 19.....	50
Espécies com indivíduos reativos na RT-PCR para detecção do grupo flavivírus.	
Figura 20.....	51
Alinhamento da sequência amplificada da amostra reativa AG0459 (<i>Bothropos mattogrossensis</i>) com <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> SEC62 homolog, preprotein translocation factor (SEC62), mRNA.	
Figura 21.....	53
Soropositividade por PRNT ₉₀ para ZIKV dos animais silvestres capturados nas áreas metropolitanas de Campo Grande e Cuiabá.	
Figura 22.....	54
Subsítios amostrados com detecção de amostras soropositivas. (A) Subsítios na região metropolitana de Cuiabá, MT; (B) Subsítios na região metropolitana de Campo Grande, MS.	
Figura 23.....	56
Espécies com indivíduos soropositivos no PRNT ₉₀ . (A) <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> ; (B) <i>Nasua nasua</i> ; (C) <i>Artibeus planirostris</i> ; (D) <i>Sapajus cay</i> ; (E) <i>Didelphis albiventris</i> .	
Figura 24.....	57
PRNT ₉₀ para ZIKV com a amostra do plasma do morcego da espécie <i>Artibeus planirostris</i> (código AU042) em 12 diluições (1:10 até 1:20480).	

LISTA DE QUADROS

Quadro 01.....	35
Localização dos subsítios amostrados durante as campanhas de investigação de flavivírus em animais silvestres provenientes de Campo Grande, MS e Cuiabá, MT durante 2017 e 2018.	
Quadro 02.....	44
Distribuição das espécies capturadas nas áreas metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande de acordo com a classificação taxonômica.	
Quadro 03.....	45
A distribuição das espécies de acordo com os sítios e subsítios de coleta.	
Quadro 04.....	52
Distribuição das espécies submetidas a PRNT ₉₀ para ZIKV.	
Quadro 05.....	55
Amostras de animais silvestres de áreas metropolitanas de Campo Grande e Cuiabá soropositivas para ZIKV	

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.....	23
Espécies de aves silvestres positivas para presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para SLEV na Amazônia brasileira.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSQV – *Bussuquara virus*

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CEUA - Comitê de ética no uso de animais

CHIKV - *Chikungunya virus*

CPCV - *Cacipacore virus*

CxFlavivírus - *Culex flavivirus*

DENV - *Dengue virus*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

dpi - Dias pós-infecção

ECP - Efeito citopatogênico

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

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

IGUV - *Iguape virus*

IEC - Instituto Evandro Chagas

IMASUL - Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul

ILHV - *Ilhéus virus*

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

JEV - *Japanese encephalitis virus*

LABFLA - Laboratório de Flavivírus

LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica

LIV - Laboratório de Imunologia Viral

MAGV - *Maguari virus*

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MS - Estado de Mato Grosso do Sul

MT - Estado de Mato Grosso

NB-3 - Laboratório de Biossegurança 3

NHUV - *Nhumirim vírus*

NT – *Neutralization test*

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

OROV - *Oropouche virus*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PNH – Primata não humano

PRNT - *Plaque reduction neutralization test*

RNA - *Ribonucleic acid*

ROCV - *Rocio virus*

RT-PCR - *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SEMA - Secretaria de Meio Ambiente de Mato Grosso

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SLEV - *Saint Louis encephalitis virus SP*

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

UCDB - Universidade Católica Dom Bosco

UFP – Unidade formadora de placas

USP – Universidade de São Paulo

WNV - *West Nile virus*

WHO – *World Health Organization*

YFV - *Yellow fever virus*

ZIKV - *zika virus*

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.....	91
Licença do comitê de ética no uso de animais Protocolo nº 2809SALMULX-A2	
Anexo B.....	94
Licença do comitê de ética no uso de animais Protocolo nº 001/2017	
Anexo C.....	95
Licença do comitê de ética no uso de animais Protocolo nº 23108.169037/20116-24	
Anexo D.....	96
Autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO MT) nº 54728-1	
Anexo E.....	102
Autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO MS) nº 56912-1 e Nº 57450-1	
Anexo F.....	112
Autorização SEMA Protocolo nº 61/405959/2116	
Anexo G.....	115
Autorização IMASUL Protocolo nº 003/2017	
Anexo H.....	117
Protocolo de extração de RNA em placa de 96 poços	
Anexo I.....	119
Protocolo de PCR em tempo real para detecção de flavivírus	
Anexo J.....	121
Protocolo de PCR em tempo real para detecção do ZIKV	
Anexo K.....	122
Protocolo de sequenciamento	

Anexo L.....124
Formulário de preenchimento do aplicativo do Estudo Ecológico do vírus zika no Brasil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Arbovírus.....	1
1.2 Breves considerações sobre o diagnóstico laboratorial das arboviroses.....	3
1.3 A circulação de arbovírus no Brasil.....	4
1.4 Arbovírus do gênero Flavivirus.....	5
1.4.1 Vírus dengue (Dengue virus ou DENV).....	6
1.4.2 Vírus zika (Zika virus ou ZIKV).....	7
1.4.3 Vírus da febre amarela (Yellow fever virus ou YFV).....	11
1.4.4 Vírus do oeste do Nilo (West Nile virus ou WNV).....	16
1.4.5 Vírus ilhéus (Ilheus virus ou ILHV)	18
1.4.6 Vírus rocio (Rocio virus ou ROCV)	20
1.4.7 Vírus da encefalite de Saint Louis (Saint Louis encephalitis virus ou SLEV).....	22
1.4.8 Vírus cacipacoré (Cacipacore virus ou CPCV).....	25
1.4.9 Vírus bussuquara (Bussuquara virus ou BSQV).....	26
1.4.10. Outros flavivírus identificados no Brasil.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos:.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.	31
4.1 Instituições Participantes.....	31
4.2 Autorizações e Licenças.....	31
4.3 Metodologia das Amostragens.....	32

4.3.1 Local de estudo.....	32
4.3.2 Subsítios de amostragem em área metropolitana de Campo Grande.....	35
4.3.3 Subsítios de amostragem em área metropolitana de Cuiabá.....	36
4.3.4 Captura dos animais silvestres e coleta de espécimes clínicos.....	37
4.4 Metodologias Moleculares.....	38
4.4.1 Extração de ácido nucleico e investigação por métodos moleculares.....	38
4.4.2 Detecção dos flavivírus.....	38
4.4.3 Detecção de ZIKV.....	39
4.4.4 Purificação dos produtos.....	40
4.4.5 Quantificação da massa dos produtos.....	40
4.4.6 Reação de sequenciamento.....	40
4.4.7 Sequenciamento nucleotídico.....	40
4.5 Metodologia Sorológica.....	41
4.5.1 Teste de neutralização por redução de placas (PRNT90) para ZIKV.....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Captura de mamíferos silvestres nos parques florestais urbanos localizados em áreas metropolitanas de Cuiabá, MT e Campo grande, MS.....	43
5.2 Investigação de flavivírus por RT-PCR em tempo real.....	47
5.3 Detecção do ZIKV por RT-PCR em tempo real.....	51
5.4 Sequenciamento nucleotídico.....	51
5.5 PRNT90 para ZIKV.....	52
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Os arbovírus (do inglês, *arthropod-borne virus*) constituem um importante grupo de vírus responsáveis por epidemias e epizootias em diferentes regiões geográficas, onde são mantidos em natureza principalmente através da transmissão biológica entre artrópodes vetores e hospedeiros vertebrados susceptíveis (WHO, 1985). Outras formas de transmissão dos arbovírus também já foram reportadas, incluindo a transmissão horizontal através da alimentação ou do coito, e a transmissão vertical, em que arbovírus são transmitidos da genitora para a prole (Freier e Beier, 1984; Nuttall *et al.*, 1994; Cruz, *et al.*, 2015; Tingström *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Entre as formas de transmissão direta entre os hospedeiros vertebrados estão a transfusão de sangue, transplante de órgãos, exposição de pele lesionada e contato com peles e mucosas (Kuno e Chang, 2005; Motta *et al.*, 2016; Galel *et al.*, 2017; Nogueira *et al.*, 2017).

Em ciclos de transmissão de arbovírus, os artrópodes vetores são considerados hospedeiros amplificadores definitivos, pois após infecção e amplificação viral se mantêm infectados e com capacidade de transmissão por toda sua vida. Os hospedeiros vertebrados são considerados hospedeiros amplificadores temporários, porque de um modo geral, após infecção, sustentam por apenas alguns dias uma viremia por tempo e com carga viral suficiente para infecção dos artrópodes vetores durante o repasto sanguíneo. Os hospedeiros vertebrados susceptíveis à infecção, mas que não participam do ciclo de transmissão, são considerados hospedeiros acidentais ou terminais, isto é, pode se infectar, mas não apresentam uma amplificação viral suficiente para servirem de fonte de infecção para o artrópode vetor (Kuno *et al.*, 2017). Na grande maioria dos ciclos de transmissão de arbovírus, o homem e os animais domésticos participam como hospedeiros terminais, culminando na interrupção da transmissão (Weaver *et al.*, 2018).

Alguns arbovírus têm mais de uma espécie de hospedeiro amplificador em seus ciclos de transmissão, sendo a espécie mais eficiente chamada de hospedeiro amplificador primário. Hospedeiros amplificadores menos eficientes são chamados de hospedeiros amplificadores secundários (Figura 01) (Clements, 2012).

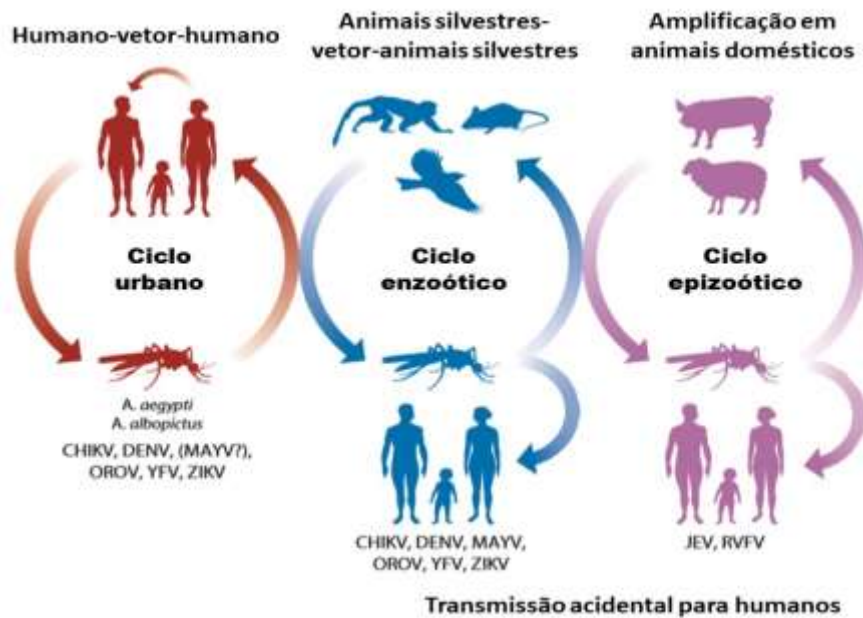


Figura 01: Ciclos de transmissão de arbovírus (Adaptado de Weaver *et al.*, 2017). Os arbovírus são mantidos na natureza através da transmissão biológica entre artrópodes vetores e hospedeiros vertebrados susceptíveis. Existem três principais ciclos de transmissão de arbovírus, os ciclos urbano, enzoótico e epizootico.

As arboviroses são um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, em especial nos países tropicais, pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade e, entre alguns grupos populacionais, pelas altas taxas de letalidade. Nas últimas décadas, grandes epidemias provocadas por arbovírus emergentes e reemergentes ocorreram nas Américas, África e Ásia. A partir de 2015, se verificou no Brasil a ocorrência de uma tríplice epidemia, provocada pelos vírus dengue, zika e chikungunya, apresentando um novo perfil epidemiológico de co-circulação viral no país (Zanotto e Leite, 2018).

Aproximadamente 100 arbovírus são conhecidos por infectar humanos, no entanto, os quadros são predominantemente caracterizados por síndromes sistêmicas inespecíficas e assintomáticas. Os casos clínicos apresentam manifestações inespecíficas como febre, fadiga e cefaléia. Os eventos graves ocorrem com uma incidência baixa e envolvem quadros de desordem neurológica e febres hemorrágicas (Meltzer, 2012; Vieira *et al.*, 2015).

É pertinente informar que no contexto econômico da pecuária e agronegócio brasileiros, as epizootias por arbovírus vêm se destacando. O Brasil é o maior exportador de carne bovina e aves do mundo e o quarto maior de suínos. Os rebanhos de equinos, o terceiro maior do mundo, caprinos e ovinos também são expressivos e movimentam a balança comercial. Epizootias pelos

vírus da língua azul (*Blue tongue virus* ou BTV) e vírus da encefalite equina do leste (*Eastern equine encephalitis virus* ou EEEV) vêm sendo reportadas em território nacional. Recentemente, a ocorrência de uma epizootia provocada pelo vírus do oeste do nilo (*West Nile virus* ou WNV) no Brasil levantou o alerta para a importância deste agente no contexto da sanidade animal, em especial ao rebanho equino brasileiro, principalmente pelos quadros de encefalite frequentemente observados (Brasil., 2016; Diniz *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2018).

Um número significativo de arbovírus parece passar por períodos nos quais existem escassos relatos de doença associada a esses vírus. Os fatores envolvidos na redução ou ausência momentânea de agravos relacionados a esses arbovírus ainda são pouco conhecidos. Entretanto, acredita-se que mesmo durante esses períodos, esses arbovírus se mantenham na natureza através de ciclos silenciosos de transmissão enzoótica e transmissão vertical entre vetores. Esses intervalos de atividade podem ser separados por curtos espaços de tempo ou até por décadas, até que uma súbita recrudescência epidemiológica seja detectada (Reiter, 1988). Nos centros urbanos, somam-se as características do território, no seu sentido morfológico amplo, e as ações antropogênicas como elementos fundamentais, através por exemplo da formação iatrogênica de criadouros de vetores, para a explosão epidêmica dessas enfermidades (Dégallier *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 2017).

1.2 Breves considerações sobre o diagnóstico laboratorial das arboviroses

O diagnóstico laboratorial dos arbovírus pode ser realizado através de técnicas para identificação direta da presença do vírus, como o isolamento viral e/ou detecção do ácido nucleico viral, e de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos e antígenos.

O isolamento viral é considerado padrão ouro para a confirmação de um caso, no entanto, sua aplicabilidade aos centros de diagnóstico é limitada. A técnica se fundamenta na capacidade de determinados vírus, quando inoculados em uma monocamada celular, de provocarem alterações morfoestruturais nesta mesma monocamada, designadas de Efeito Citopático (ECP) (Santos, 2015). As culturas de células provenientes de mosquito (clone C6/36 de larva de *Aedes albopictus*) e de mamíferos (VERO - Rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) são as mais utilizadas para o isolamento viral dos arbovírus (Casals, 1972).

As técnicas sorológicas também são amplamente empregadas no diagnóstico dos arbovírus. Entretanto, em virtude a alta similaridade antigênica entre membros de um mesmo grupo, as reações

cruzadas são frequentemente observadas, principalmente em técnicas sorológicas de baixa especificidade, como a inibição da hemaglutinação (IH) (Góes e Bruno-Lobo, 1961; WHO, 2007).

Os anticorpos detectados por testes de neutralização (NT) são os mais específicos. O PRNT₉₀ consiste em avaliar a capacidade de uma amostra reduzir em 90% o número de placas de lise causadas pelas unidades formadoras de placa (UFP) do vírus utilizado no ensaio. As monocamadas celulares inoculadas com amostras que apresentam anticorpos neutralizantes irão apresentar 10% ou menos do número de placas de lise observadas no controle da suspensão viral. Caso a amostra não apresente anticorpos neutralizantes, o número de placas observado deverá ser equivalente ao do controle da suspensão viral utilizado no ensaio. O PRNT é considerado o teste sorológico padrão para a pesquisa de flavivírus (WHO, 2007).

A partir da década de 1990, as metodologias moleculares, em especial a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram sendo incorporadas como método de diagnóstico de diferentes agentes, incluindo os arbovírus. A detecção de uma sequência alvo, seja de uma única espécie ou comum a um grupo antigenicamente relacionado, permite a amplificação do fragmento e posterior sequenciamento nucleotídico que possibilita a análise filogenética do vírus (Kuno *et al.*, 1998; Scaramozzino *et al.*, 2001).

1.3 A circulação de arbovírus no Brasil

O Brasil, além de representar o ícone mundial da biodiversidade, com a maior floresta tropical e a maior bacia hidrográfica do mundo, tem em seu território cerca de 15 a 20% das 1,5 milhão de espécies catalogadas e identificadas no mundo (Ricardo e Campanili, 2005; Guedes, 2012).

Neste cenário tropical diverso, os arbovírus circulam em ciclos enzoóticos de transmissão que têm sido caracterizados em investigações ativas realizadas em sua maioria na Amazônia (Causey *et al.*, 1961; Pinheiro *et al.*, 1962; Shope *et al.*, 1966; Travassos da Rosa *et al.*, 1998; Casseb *et al.*, 2013, 2014; Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2010b, 2013, 2015a, 2015b, 2017a; IEC, 2018).

Dentre as centenas de arbovírus que circulam no Brasil, os de interesse em saúde pública e animal são os mais estudados. Cerca de 30 espécies têm potencial de causar doença em humanos e são classificadas em três principais famílias virais, *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae* e *Togaviridae* (Figura 02).

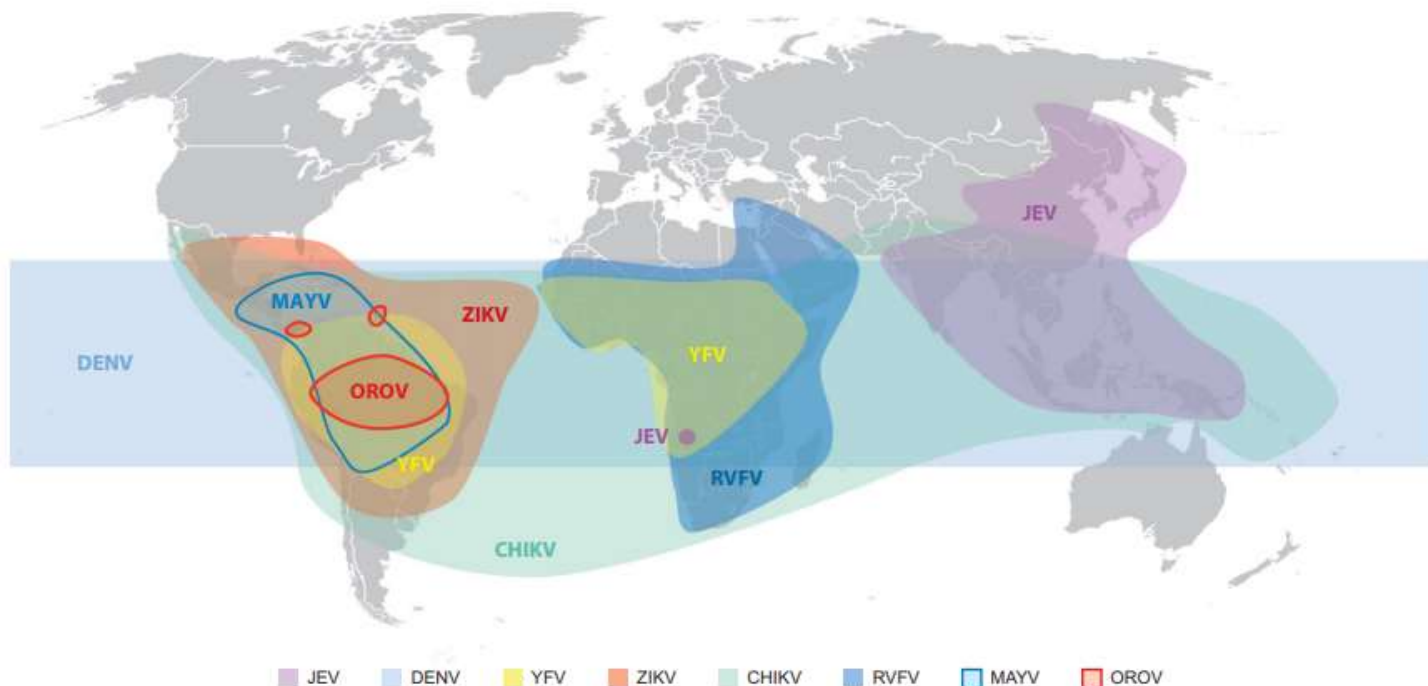


Figura 02: Mapa de distribuição mundial das principais arboviroses de interesse em saúde pública (Weaver *et al.*, 2017).

Os arbovírus de interesse em saúde pública são agentes amplamente distribuídos pelo mundo. Nas Américas, já foi reportada a circulação de diversos arbovírus, sendo os de maior relevância os vírus dengue (DENV), mayaro (MAYV), zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), oropouche (OROV) e febre amarela (YFV).

1.4 Arbovírus do gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* era, até recentemente, organizada em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (King *et al.*, 2012). No entanto, em 2017, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) realizou uma atualização da nomenclatura viral incluindo o gênero *Pegivirus* (Stapleton *et al.* 2011; Simmonds *et al.*, 2017).

Os vírus pertencentes a esta família apresentam partículas virais esféricas e envelopadas, de 40 a 60nm de diâmetro e genoma composto por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva. O genoma é constituído de aproximadamente 11.000 pares de bases que codificam dez proteínas, sendo três estruturais e sete não estruturais. A proteína do capsídeo (C), a proteína pré-membrana (prM) e a do envelope (E) constituem as proteínas estruturais, e as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, as proteínas não estruturais (Figura 03) (Guzman *et al.*, 2010).

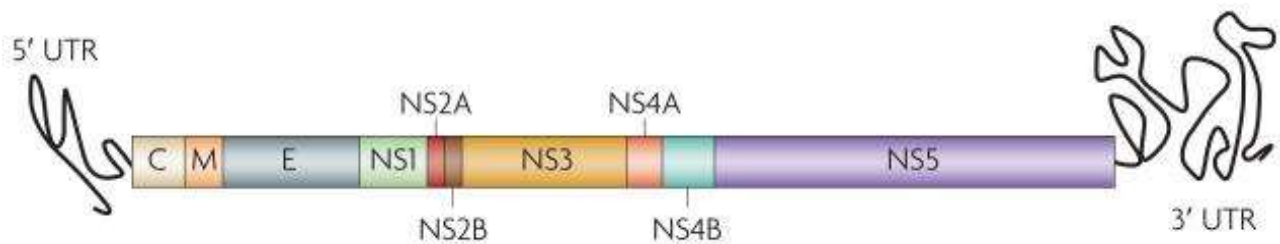


Figura 03: Representação esquemática da organização do genoma dos flavivírus (Guzman *et al.*, 2010).

O material genético dos flavivírus é composto por um RNA de fita simples e polaridade positiva. O genoma é constituído de aproximadamente 11.000 pares de bases e codifica dez proteínas, sendo três estruturais e sete não estruturais.

O gênero *Flavivirus* é o mais diverso da família *Flaviviridae* e apresenta 53 espécies reconhecidas pelo ICTV. Entre os flavivírus, acerca de 50% são transmitidos por mosquitos, 28% transmitidos por carrapatos e o restante transmitido entre roedores e quirópteros e com artrópodes vetores ainda desconhecidos (Simmonds *et al.*, 2017). No Brasil, os vírus dengue (*Dengue virus* ou DENV), encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* ou SLEV), rocio (*Rocio virus* ou ROCV), oeste do Nilo (*West Nile virus* ou WNV), cacipacoré (*Cacipacore virus* ou CPCV), ilhéus (*Ilheus virus* ou ILHV), bussuquara (*Bussuquara virus* ou BSQV), febre amarela (*Yellow fever virus* ou YFV) e zika (*Zika virus* ou ZIKV) destacam-se pelos quadros clínicos de infecção em humanos e/ou animais silvestres e pelas características epidemiológicas de emergência e reemergência (Figueiredo, 2007; Lopes, Nozawa e Linhares, 2014; Weaver *et al.*, 2017). À exceção do DENV e ZIKV, acredita-se que os demais flavivírus sejam mantidos em ciclos enzoóticos de transmissão no país (Figueiredo, 2000). Membros do gênero *Flavivirus* estão relacionados a doença febril aguda, encefalite, febres hemorrágicas e, em casos mais graves, com potencial evolução ao óbito (Solomon, 2004).

1.4.1 Vírus dengue (*Dengue virus* ou DENV)

O DENV é considerado o arbovírus mais disseminado e de maior morbidade e mortalidade na população mundial. Estima-se que 390 milhões de infecções ocorram anualmente, dos quais 96 milhões apresentem manifestações clínicas com alguma gravidade (Bhatt *et al.*, 2013). Epidemias recorrentes ocorrem no Brasil, desde o final da década de 1980, no estabelecimento de um cenário hiperendêmico (San Martín *et al.*, 2010).

Os primeiros casos confirmados de dengue no Brasil transcorreram na capital de Roraima, Boa Vista, em 1982, onde Osanai e colaboradores (1983) isolaram o DENV-1 e DENV-4. Em 1986, ocorreu a introdução do DENV-1 na cidade do Rio de Janeiro, elevando o agravo a um problema de saúde pública a nível nacional (Schatzmayr *et al.*, 1986). O DENV-2 foi introduzido na década de 1990 e o DENV-4 reemergiu no início dos anos 2000 no norte do país. A partir deste momento, a circulação concomitante dos quatro sorotipos era detectada em solo brasileiro (Osanai *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 1990). A vertiginosa expansão do DENV pelo território brasileiro deve-se às condições climáticas, socio-ambientais, a presença de população susceptível, além da alta densidade populacional do vetor urbano (Carvalho, Magalhães e Medronho, 2017; Huber *et al.*, 2018).

A manutenção dos quatro sorotipos do DENV no mundo ocorre majoritariamente no ciclo urbano. Em algumas regiões restritas há registros da manutenção enzoótica envolvendo primatas não humanos (PNH) e espécies de *Aedes* spp arbóreos, sobretudo no sudeste asiático e África ocidental (Wolfe *et al.*, 2001; Vasilakis *et al.*, 2011). No continente asiático, espécies dos gêneros *Macaca*, *Pongos* e *Presbytis* podem participar como hospedeiros vertebrados (De Silva *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2013; Nakgoi *et al.*, 2014). Já na África, espécies dos gêneros *Erythrocebus*, *Chlorocebus*, *Cercopithecus* e *Mandrillus* foram apontados como potenciais hospedeiros (Monath *et al.*, 1974; Kading *et al.*, 2013). No ambiente silvestre, o DENV também já foi detectado por RT-PCR em um tapirídeo (*Tapirus indicus* – Malásia), e evidenciado por soroneutralização em morcegos (*Desmodus rotundus* – México) (Smith, 1956; Abundes-Gallegos *et al.*, 2018).

Nos centros urbanos o ciclo é mantido pela transmissão de mosquitos *Aedes aegypti* nas Américas e *Aedes albopictus* na Ásia. Enquanto *Ae. aegypti* apresenta hábitos antropofílicos e endofílicos, o que favorece de sobremaneira a transmissão, *Ae. albopictus* tem comportamento peridoméstico e menos endofílico, o que o torna grande transmissor também em áreas rurais (Vasilakis *et al.*, 2011). Diversos estudos sugerem que a transmissão transovariana possa contribuir para a manutenção do ciclo urbano do DENV (Khin e Than, 1983; Martínez *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015; Gutiérrez-Bugallo *et al.*, 2017; da Costa *et al.*, 2017a; Moraes *et al.*, 2018).

1.4.2 Vírus zika (*Zika virus* ou ZIKV)

Em meados da década de 1930, na antiga capital de Uganda, Entebbe, criava-se o Instituto de Pesquisa da Febre Amarela, atual Instituto de Pesquisa de Vírus de Uganda, centro colaborador da OMS no leste africano para doenças transmitidas por vetores (Dick, 1953). Em 1947, no decurso de um estudo sobre febre amarela na floresta de Ziika, localizada a cerca de 25km da capital, pesquisadores

verificaram que o macaco sentinela rhesus 766 apresentava elevação da temperatura corporal (40°C). O soro do animal foi inoculado por via intracerebral em camundongo, permitindo o primeiro isolamento do ZIKV. O vírus também foi isolado de *Aedes africanus* em 1948 (Dick, Kitchen e Haddow, 1952).

Bearcroft (1956) inoculou experimentalmente um indivíduo voluntário com suspensão de cérebro de camundongo infectado com ZIKV. Após 82 horas, o voluntário apresentou febre, cefaléia e náuseas. O isolamento do vírus, a partir do sangue, foi realizado durante a fase aguda da doença.

Durante um hiato de quase cinco décadas o ZIKV permaneceu invisível, com relatos de casos esporádicos. O primeiro estudo que apontou a circulação do vírus na Ásia, provém de 1981, onde sete indivíduos hospitalizados apresentaram sorologia positiva (Olson et al, 1981). No entanto, foi apenas em 2007 que uma epidemia explosiva e de grandes proporções acometeu as ilhas Yap, na Micronésia, onde cerca de 75% da população do arquipélago foi infectada (Duffy *et al.*, 2009).

Análises retrospectivas sugerem que a Polinésia Francesa sofreu com uma grande epidemia no ano de 2013 e estima-se que cerca de 30.000 tenham sido afetados por um genótipo asiático (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). Durante esta epidemia, observou-se pela primeira vez a ocorrência de casos da síndrome de Guillain-Barré e os primeiros casos de transmissão perinatal (Besnard *et al.*, 2014).

As primeiras notificações do ZIKV no Brasil foram feitas pelo Dr. Gubio Campos da Universidade Federal da Bahia na cidade de Camaçari, estado da Bahia, onde 24 pacientes atendidos em uma unidade hospitalar com quadro de doença dengue-like. Amostras de sangue foram coletadas e testadas por metodologias sorológicas para o DENV e molecular para ZIKV, DENV, vírus chikungunya (*Chikungunya virus* ou CHIKV), vírus mayaro (*Mayaro virus* ou MAYV) e WNV. Sete pacientes foram positivos na reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa (RT-PCR) para ZIKV e três para CHIKV (Campos, Bandeira e Sardi, 2015).

Seguido este primeiro relato, a infecção pelo ZIKV foi identificada em outros estados (Zanluca *et al.*, 2015; Brasil, 2015 e 2016) e até a semana epidemiológica 51 do ano de 2016, a transmissão autóctone do ZIKV havia sido registrada em 18 estados da nação (Brasil, 2016). Estudos filogenéticos demonstraram que a cepa epidêmica no Brasil pertence à linhagem asiática (Zanluca *et al.*, 2015) e a hipótese mais aceita para a sua introdução no Brasil aponta para a Copa das Confederações, ocorrida entre maio e dezembro de 2013 (Faria *et al.*, 2017).

No segundo semestre de 2015, os órgãos de saúde pública foram acionados pelo aumento do número de casos de microcefalia. A Rede Nacional de Alerta e Resposta às Emergências em Saúde Pública do

Ministério da Saúde avaliou a situação, levando em conta as alterações do perfil epidemiológico e desencadeou as ações descentralizando as atividades e visando ao enfrentamento da epidemia (Brasil, 2011). Em novembro de 2015, o genoma viral foi detectado no líquido amniótico de gestantes da Paraíba, com relato de infecção pelo ZIKV e fetos com microcefalia (Calvet *et al.*, 2016, Oliveira Melo *et al.* 2016). No mesmo período, pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Centro de Referência Nacional para arbovírus e centro colaborador da OMS, isolaram o ZIKV do cérebro de um recém-nascido com microcefalia que veio a óbito. Estudos adicionais comprovaram o envolvimento do ZIKV com um amplo espectro de desordens neurológicas em recém-nascidos (Garcez *et al.*, 2016). A síndrome congênita do ZIKV (SCZ), de etiologia complexa e multifatorial, pode decorrer de processos infecciosos durante a gestação e é caracterizada por um amplo espectro de malformações e manifestações clínicas no feto e recém-nascidos, dentre elas, a microcefalia (De Araujo *et al.*, 2016; De Oliveira e Vasconcelos, 2016).

Em relação ao ciclo de manutenção do ZIKV em natureza, são escassas as informações acerca dos hospedeiros vertebrados. Na África, evidências da circulação de ZIKV animais das ordens Primates, Rodentia, Carnivora, Proboscidea, Perissodactyla, Ciconiiformes, Charadriiformes, Squamata e Cetartiodactyla são reportadas (Beueno *et al.*, 2016). Os primatas não humanos (PNH) são os principais hospedeiros e participam da manutenção enzoótica. *Chlorocebus sabaues*, *Cercopithecus* spp, *Colobus guereza* e *Erythrocebus patas* já foram encontrados naturalmente infectados. Espécies do gênero *Aedes* são os principais vetores artrópodes envolvidos na transmissão enzoótica (Figura 04) (Buechler *et al.*, 2017; Vasilakis e Weaver, 2017). Na Ásia, animais das ordens Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla, Artiodactyla, Anseriformes, Rodentia e Chiroptera já foram encontrados naturalmente infectados (Bueno *et al.*, 2016).

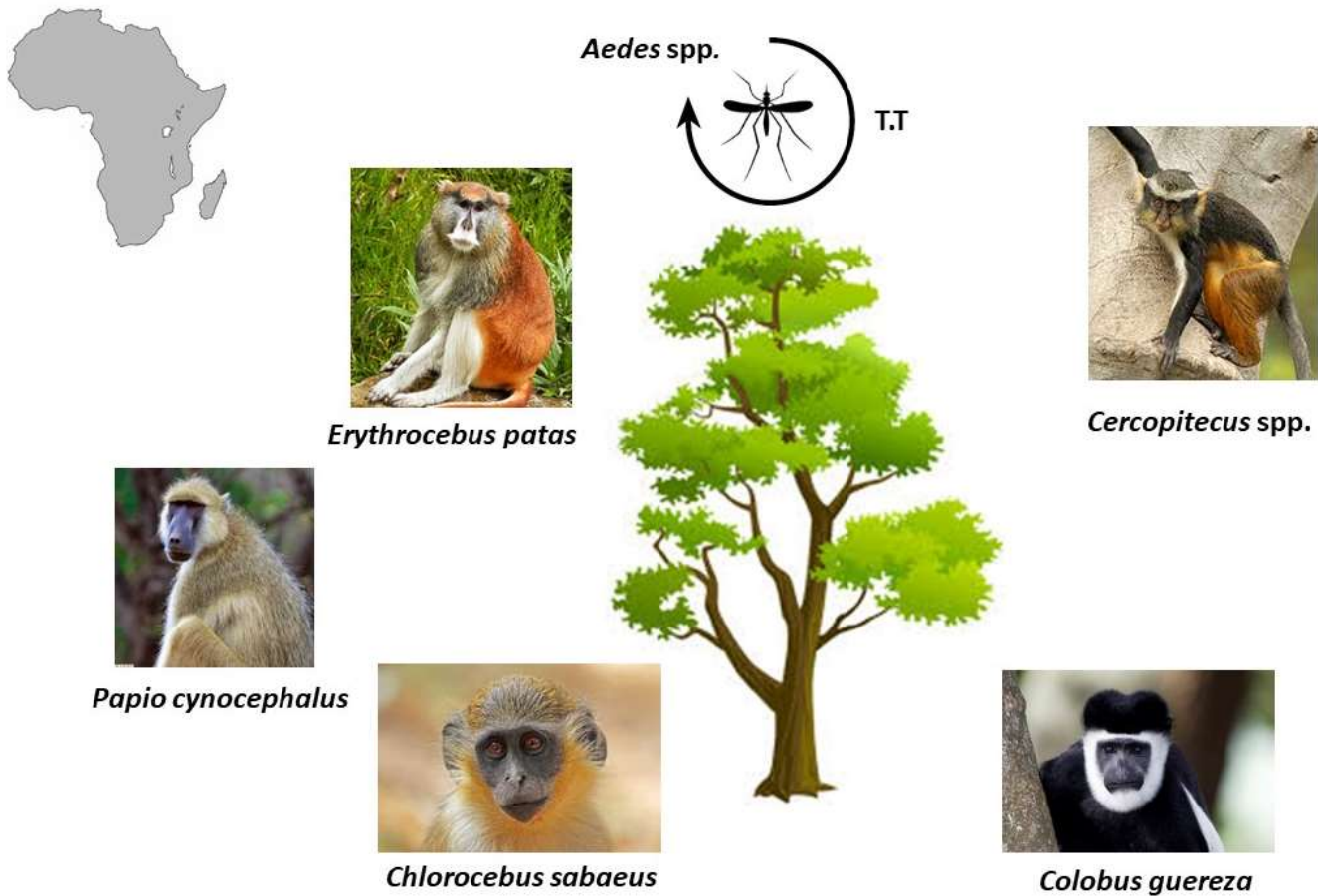


Figura 04: Primatas não humanos envolvidos na transmissão enzoótica do ZIKV na África. TT: transmissão transovariana (Adaptado de Vasilakis e Weaver, 2017). Algumas espécies de PNH já foram apontadas como potenciais hospedeiros amplificadores do ZIKV na África. Esses animais seriam os responsáveis pela manutenção do ZIKV no ciclo enzoótico.

Estudos pioneiros conduzidos no Brasil conseguiram evidenciar a infecção natural de PNH pelo ZIKV, sugerindo o estabelecimento da transmissão enzoótica no continente sul americano e anticorpos neutralizantes em indivíduos das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae (Favoretto *et al.*, 2016; de Oliveira-Filho *et al.*, 2018; Catenacci *et al.*, 2018; Moreira-Soto *et al.*, 2018; Terzian *et al.*, 2018) (Figura 05).

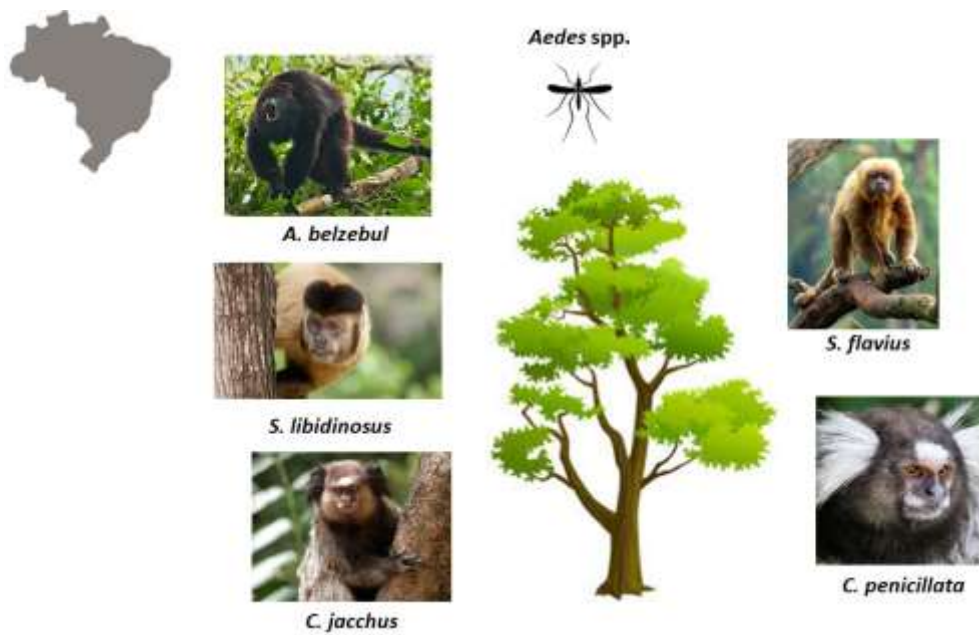


Figura 05: PNH envolvidos no potencial ciclo de transmissão enzoótico do ZIKV no Brasil. TT: transmissão transovariana (Elaboração própria). São escassas as evidências acerca da participação de PNH neotropicais em ciclos enzoóticos de manutenção do ZIKV nas Américas. Estudo recentes conseguiram detectar o RNA viral e a evidência sorológica em *Allouata belzebul*, *Sapajus libidinosus*, *Callithrix jacchus*, *Sapajus flavius* e *Callithrix penicillata*.

1.4.3 Vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* ou YFV)

O YFV é o protótipo do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*. A cepa protótipo, denominada de Asibi em homenagem ao paciente que doou a amostra, foi isolada no ano de 1927 a partir do sangue total (Karabatsos, 1985). A manutenção do YFV ocorre em três ciclos de transmissão distintos. O primeiro é o enzoótico e envolve PNH, considerados os hospedeiros vertebrados amplificadores primários, e vetores artrópodes primatófilos e acrodendrofilos. No ciclo silvestre os humanos são considerados hospedeiros acidentais, pois se infectam ao se aproximarem de áreas de transmissão enzoótica. Os principais vetores silvestres nas Américas são *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.*; o segundo é urbano e envolve a transmissão entre humanos, neste contexto considerados os hospedeiros vertebrados amplificadores primários, e mosquitos endofílicos e antropofílicos da espécie *Aedes aegypti*. O ciclo rural ou intermediário ocorre somente na África e caracteriza-se pela participação de *Aedes spp.* semidomésticos PNH e humanos. (Varma, 1989; Vasconcelos 2003). Tanto nas Américas quanto na África, os PNH apresentam importante papel na cadeia de transmissão da febre amarela (Figura 06) (Vasconcelos *et al.*, 1997; Possas *et al.*, 2018).

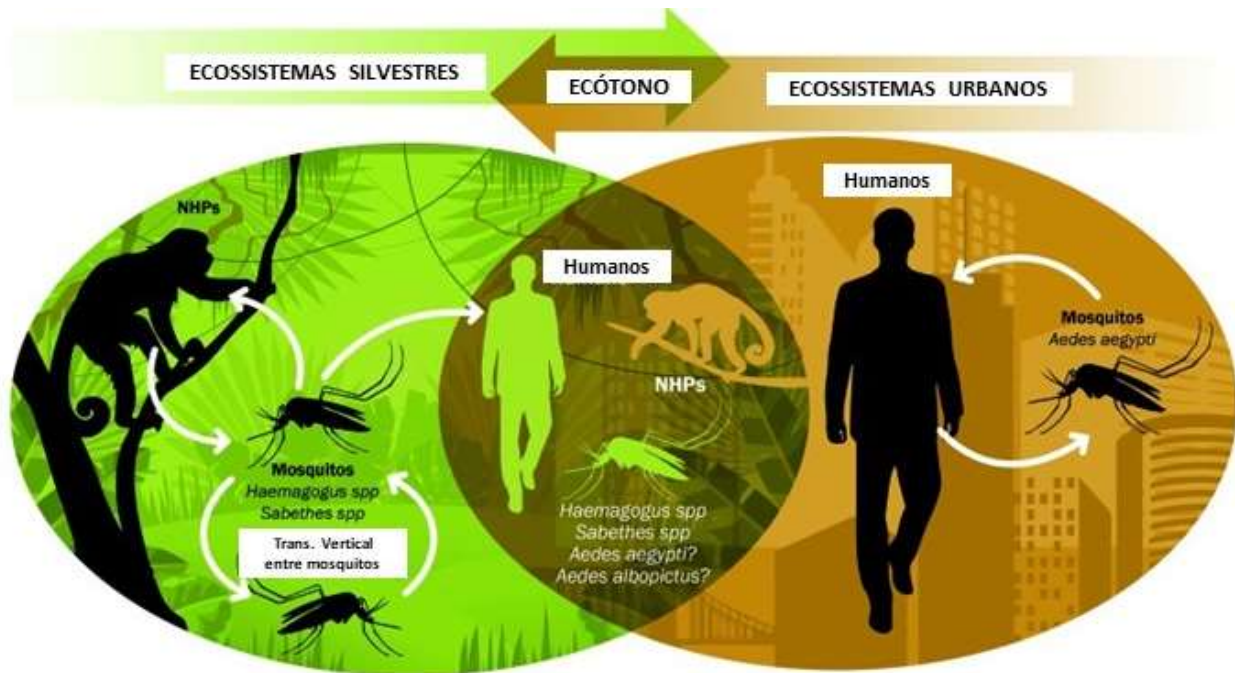


Figura 06: Dinâmica de transmissão do YFV (Fonte: Adaptado de Possas *et al.*, 2018). O YFV apresenta dois ciclos distintos de transmissão nas Américas. O ciclo silvestre caracteriza-se pela manutenção viral entre espécies de mosquitos silvestres, como *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.* e PNH. No ciclo urbano, *Aedes aegypti* e o homem participam como hospedeiros amplificadores. O ciclo rural ou intermediário ocorre somente na África e caracteriza-se pela participação de *Aedes spp.* semidomésticos PNH e humanos.

As espécies de PNH sul-americanas parecem ser mais susceptíveis ao vírus do que os africanos, e os coeficientes de mortalidade e letalidade durante epizootias são elevados. Dentre as espécies neotropicais, *Alouatta spp.* parecem ser as espécies mais sensíveis, seguidas de *Ateles spp.*, *Aotes spp.*, e *Callithrix spp.* apresentando alta letalidade. Espécies de *Cebus* parecem ser mais resistentes ao YFV (Brasil, 2005; Almeida *et al.*, 2014).

A transmissão urbana do YFV não é reportada no continente americano desde a década de 1950. A última epidemia de febre amarela urbana descrita no Brasil foi no ano de 1929. Desde então, os últimos casos notificados foram no Acre em 1942 (Vasconcelos, 2003).

Um estudo recente de Lima e colaboradores (2017) demonstrou que mosquitos *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* de áreas endêmicas, epizoóticas e livres da circulação do YFV do Brasil apresentam competência vetorial para transmitir diferentes cepas do vírus. Mosquitos *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes albiprivus* do Rio de Janeiro também foram altamente susceptíveis às cepas circulantes nas

Américas e o expressivo risco de reurbanização da febre amarela no Brasil poderia ser facilitada por populações de culicídeos competentes.

A dinâmica epidemiológica da febre amarela silvestre no Brasil se modificou ao longo das décadas, em virtude das mudanças no território e da expansão urbana desordenada, pela prática crescente do ecoturismo, por padrões migratórios, por fatores climáticos e pela indesejável cobertura vacinal (Romano *et al.*, 2014). É possível observar que a área de transmissão silvestre da febre amarela cresceu no Brasil em direção a áreas indenes (litoral, costa atlântica). O Ministério da Saúde atualizou a recomendação de vacinação para quase todo o território brasileiro, exceto algumas áreas da região nordeste (Figura 07) (Romano *et al.*, 2014; Brasil, 2018).



Figura 07: Área com recomendação de vacinação contra febre amarela no Brasil no ano de 2018 (Brasil, 2018).

Supõe-se que a região norte do país seja o principal foco da transmissão enzoótica no país, onde ascendem epizootias em PNH que se espalham em direção ao centro-oeste e culminam nos estados do sudeste e sul (Monath e Vasconcelos, 2015). Durante as epizootias, a morte de PNH é evento sentinela importante e indica que a transmissão está acontecendo naquela área. Os órgãos de vigilância em saúde devem ser alertados para intensificarem as medidas de prevenção, visando conter a propagação do agente (de Almeida *et al.*, 2012).

Na reemergência observada no período de 2007 a 2009, houve considerável expansão da área de circulação do vírus e foram notificados mais de 100 casos humanos, com letalidade de 51%. A partir de 2014 verificou-se nova alteração no padrão de ocorrência de epizootias e casos humanos, desta vez com maior incidência no centro-oeste. A reemergência detectada a partir do final de 2016 provocou uma epizootia sem precedentes que afetou uma significativa parcela das populações de PNH do Brasil. As epizootias confirmadas e em investigação concentram-se no norte, centro-oeste e sudeste (Figura 08). *Callithrix* spp. foi o gênero com maior frequência de epizootias registradas, seguido de *Alouatta* spp. Durante esta última reemergência, verificou-se pela primeira vez no Brasil o envolvimento de indivíduos dos gêneros *Aotus* sp. e *Saimiri* sp. em epizootias confirmadas de febre amarela (SVS, 2017).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, no período de julho de 2017 a junho de 2018, foram notificados 7.518 casos de febre amarela, sendo 1.376 confirmados e 483 óbitos. O estado São Paulo liderou as estatísticas com 555 casos, seguido de Minas Gerais com 532 casos confirmados (Brasil, 2018).

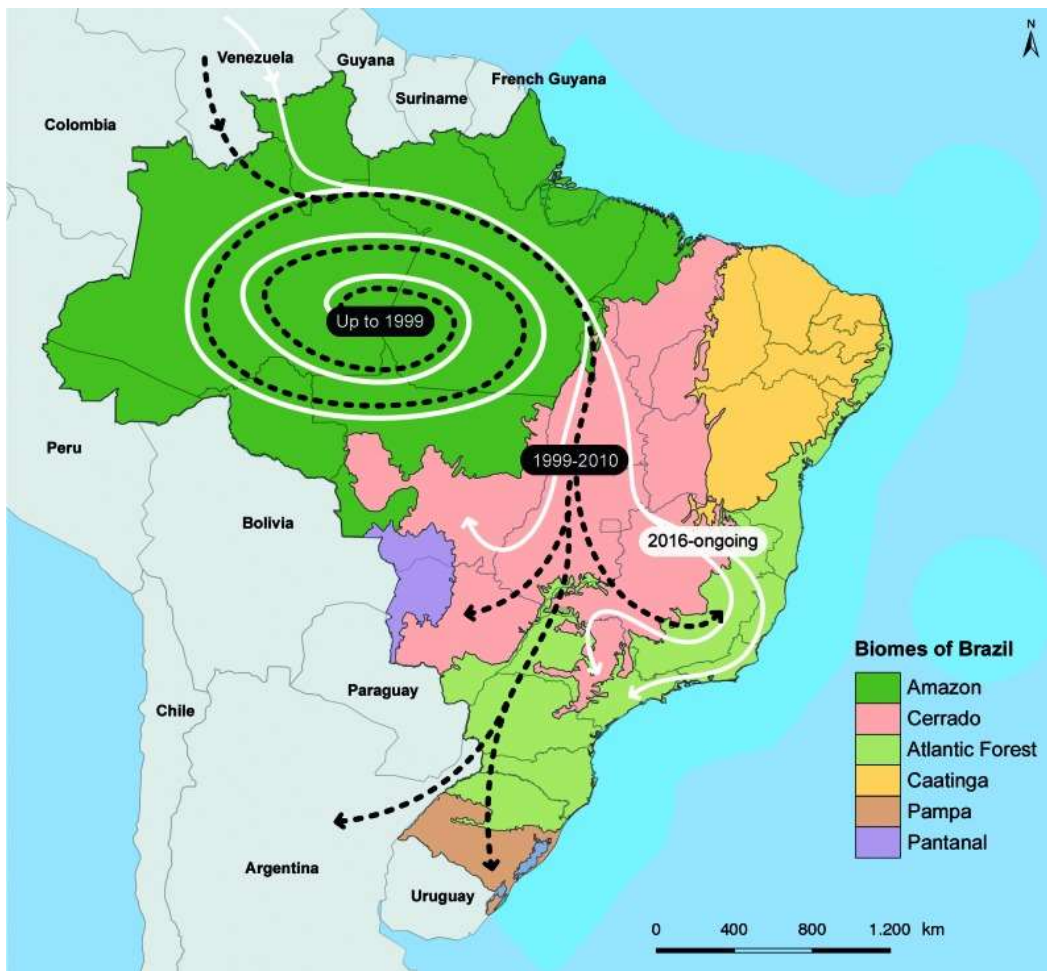


Figura 08: Expansão da febre amarela no Brasil desde a década de 1990 (Possas *et al.*, 2018). A região norte do país atua como o principal foco da transmissão enzoótica do YFV, onde ascendem epizootias em PNH que se espalham em direção ao centro-oeste e culminam nos estados do sudeste e sul.

O grande número de municípios com cobertura vacinal abaixo da recomendada pelo Ministério da Saúde (>95%) pode ter contribuído para a rápida expansão da febre amarela em direção ao litoral (SVS, 2017). A extensão da cobertura vacinal consiste na mais eficaz estratégia de contenção da epidemia e visa impedir a reurbanização da febre amarela, evento este que seria calamitoso para a saúde pública. A baixa cobertura vacinal seguida da ocorrência de casos de febre amarela em grandes cidades do sudeste do Brasil como São Paulo e Rio de Janeiro, poderia levar ao estabelecimento do ciclo de transmissão urbano de YFV no Brasil. Em virtude do risco de urbanização da febre amarela no país, estratégias de controle do vetor urbano e investimentos para melhoramento biotecnológico da vacina também devem ser prioridades (Possas *et al.*, 2018).

1.4.4 Vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus* ou WNV)

Em 1937, durante investigações para febre amarela no distrito de *West Nile*, noroeste de Uganda, identificou-se um novo agente filtrável. O vírus foi isolado a partir do sangue de uma mulher de 37 anos que apresentava febre branda e procurou o serviço médico local. O soro foi coletado e inoculado por via intracerebral em camundongos. O novo agente foi denominado *West Nile virus* (WNV ou vírus do oeste do Nilo) (Smithburn *et al.*, 1940). Por décadas o WNV manteve-se associado a surtos esporádicos de doença febril aguda sem complicações na África, Ásia e Europa (Bernkopf, Levine e Nerson, 1953; Hurlbut *et al.*, 1956; Filipe e Pinto, 1969; Couissinier-Paris, 2006).

O WNV passou a ganhar notoriedade na década de 1990, quando epidemias explosivas foram observadas com um número significativo de pacientes com comprometimento neurológico seguido a óbito. Em 1994, ocorreu na Argélia uma epidemia com 50 casos de encefalite humana, envolvendo principalmente crianças (Le Guenno *et al.*, 1996). Dois anos mais tarde, WNV foi detectado pela primeira vez na Europa, durante uma epidemia de casos com comprometimento neurológico na Romênia (Tsai *et al.*, 1998).

Em 1999, WNV foi detectado pela primeira vez no continente americano, causando alterações neurológicas em aves e humanos (CDC, 1999). Na série histórica de 1999 a 2016 foram confirmados mais de 46 mil casos, sendo aproximadamente 22.000 (4%) de doença neuroinvasiva (CDC, 2018).

Após a epidemia de 1999 nos EUA, o vírus rapidamente se disseminou pelo continente americano com sucessiva evidencia da sua circulação em países da América Latina, como Colômbia, Venezuela e Argentina (Mattar *et al.*, 2005; Komar e Clark, 2006; Diaz *et al.*, 2008). Na Argentina, WNV foi isolado em 2006 a partir do cérebro de cavalos diagnosticados com encefalite (Morales *et al.*, 2006).

No Brasil, as primeiras investigações para a circulação de WNV foram realizadas a partir de inquéritos sorológicos realizados principalmente em aves capturadas nas regiões nordeste e sul do Brasil (Brasil, 2003, 2004). Entretanto, a primeira evidência da circulação de WNV no Brasil foi reportada em cavalos no Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul (MS) em 2011, quando anticorpos neutralizantes foram detectados em cinco equinos da região (Pauvolid-Corrêa *et al.* 2011). Desde então, evidências sorológicas da circulação do WNV no Brasil passaram a ser reportadas em outros estados (Melandri *et al.*, 2012; Ometto *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Em 2014, outro estudo realizado no Pantanal de MS sugere ampla exposição de equinos ao WNV na região, considerando que os cavalos têm sido apontados como eficientes marcadores da circulação do WNV (Dauphin e Zientara, 2007).

Em 2014, foi identificado com base no quadro clínico e evidência sorológica o primeiro caso humano da febre do oeste do Nilo no Brasil. O paciente, homem, 52 anos, trabalhador rural e residente do município de Aroeiras do Itaim, Piauí, apresentou o quadro de encefalite aguda e paralisia flácida (Vieira *et al.*, 2015).

Apesar das evidências sorológicas reportadas desde 2011, tanto em amostras humanas quanto de animais, a primeira detecção de WNV no Brasil ocorreu somente em 2018, quando WNV foi detectado e isolado a partir de tecido cerebral de um equino durante uma epizootia de desordem neurológica do estado do Espírito Santo (ES). O sequenciamento nucleotídico revelou se tratar da linhagem 1, clado 1a, comumente observada nas Américas (Martins *et al.*, 2018).

Como estudo complementar, Silva e colaboradores (2018) demonstraram que a epizootia que afetou não só cavalos, mas também jumentos, nos municípios de São Mateus, Boa Esperança, Nova Venécia e Baixo Guandu no ES.

Espécies de as aves migratórias são potenciais hospedeiros amplificadores de WNV. Acredita-se que algumas espécies podem contribuir para a disseminação viral além das fronteiras territoriais, bem como para manutenção do ciclo de transmissão. Estudos ecológicos com andorinhas-do-mar (*Sterna hirundo* Linnaeus, 1758) verificaram que indivíduos dessa espécie conseguem se deslocar de regiões no extremo leste dos EUA até o Caribe e América do Sul (Rappole, Derrickson e Hubalek, 2000). Algumas espécies de aves apresentam alta susceptibilidade à infecção por WNV. Durante a epidemia causada por WNV nos EUA em 1999, 89% dos animais encontrados mortos eram corvos americanos da espécie *Corvus brachyrhynchos* Brehm 1822 (Dupuis, Marra e Kramer, 2003; Pupo *et al.*, 2006). *Passer domesticus* e *Carpodacus mexicanus* também são importantes hospedeiros amplificadores de WNV nos EUA (Komar *et al.*, 2003).

Na América do Norte, o maior número de casos é registrado entre os meses de julho a novembro, período que coincide com a alta densidade dos vetores artrópodes. Entretanto, acredita-se que em países tropicais o vírus possa circular durante todo o ano em algumas regiões. O vírus já foi isolado em mais de 40 espécies de culicídeos e também em algumas espécies de argasídeos e ixodídeos (Lawrie *et al.*, 2004). Os mosquitos do gênero *Culex* apresentam maior papel no ciclo de transmissão do WNV (Hubalek e Halouzka 1999; Molaei *et al.* 2006). As espécies mais frequentemente encontradas positivas são *Culex pipiens*, *Culex restuans* e *Culex salinarius* (Andreadis, Anderson e Vossbrinck, 2001; White *et al.* 2001; Nasci *et al.* 2001). As principais espécies envolvidas na transmissão nos EUA variam de acordo com a região do país. *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis* e *Cx. pipiens* são os principais vetores no sul, oeste e norte, respectivamente (CDC, 2013).

Em relação à população humana, os dados epidemiológicos apontam que cerca de 1 em cada 5 indivíduos infectados desenvolve febre, cefaléia, mialgia, artralgia, vômitos, diarreia e/ou erupção cutânea. Cerca de 1 em cada 150 infectados evolui para quadros neurológicos, como encefalite e meningite, às vezes com sequelas ou evolução fatal. No entanto, a grande maioria das infecções são assintomáticas e autolimitadas (CDC, 2018).

1.4.5 Vírus ilhéus (*Ilheus virus* ou ILHV)

O ILHV foi isolado em 1944, a partir de pools de *Aedes serratus* e *Psorophora ferox* durante estudo epidemiológico em área endêmica de febre amarela na cidade de Ilhéus, localizada a sul de Salvador, capital do estado da Bahia (BA). Além do isolamento viral, trabalhadores locais apresentavam anticorpos anti-ILHV sugerindo exposição de humanos ao ILHV. Estudos experimentais de ILHV em vetores demonstraram competência vetorial de *Ae. serratus*, *Psorophora ferox* e *Ae. aegypti* (Laemmert e Hughes, 1947).

Apesar de achados em diferentes vetores artrópodes, como *Psorophora lutzii*, *Psorophora albipes*, *Ae. serratus*, *Ae. fulvus*, *Ae. scapularis* e *Haemagogus leucocelaenus*. *Ae. angustivittatus*, *Cx. caudelli*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. vomerifer*, *Haemagogus capricornii*, *Sabethes chloropterus* e *Trichoprosopon* sp, acredita-se que o ILHV seja transmitido no ciclo silvestre principalmente por *Ps. ferox* (Rodaniche e Galindo 1957, 1961, 1963; Galindo 1963; Aitken 1969, Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2013).

As aves são apontadas como os principais hospedeiros vertebrados amplificadores na manutenção do ILHV na natureza. Em estudos realizados na mata atlântica do estado de São Paulo (SP), ILHV foi isolado de duas espécies silvestres, *Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*, conhecidas popularmente por coleirinho e chupim, respectivamente. Entretanto, evidências sorológicas já foram reportadas em mais de 20 espécies diferentes da avifauna local, além de PNH, como *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*, e carnívoros como o quati (*Nasua nasua*), (Ferreira *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2001).

Na Amazônia brasileira, já se detectou anticorpos em equinos, gado, búfalos, marsupiais, porcos, répteis, roedores e edentados (Karabatsos, 1985; Casseb *et al.*, 2014). Estudo realizado em Manaus (Amazonas) e Alter do Chão (Pará) detectou por metodologias moleculares fragmentos do genoma do ILHV em diferentes espécies de aves, como guaracava-debarriga-amarela (*Elaenia flavogaster*),

rapazinho-dos-velhos (*Nystalus maculatus*), arapaçu-de-bico-branco (*Dendroplex picus*), bico-chato-amarelo (*Tolmomyias flaviventris*) e papagaio-da-várzea (*Amazona festiva*) (Lopes *et al.*, 2015). Segundo McLean e Ubico (2007), devido ao hábito migratório, *Sporophila caerulescens* pode potencialmente carrear o vírus por outras regiões do país.

Nos estados da região Nordeste, como Paraíba, Pernambuco e Bahia, anticorpos neutralizantes para ILHV foram detectados em PNH, como *Sapajus flavius*, *Sapajus libidinosus* e *Leontopithecus chrysomelas* (de Oliveira-Filho *et al.*, 2018).

A evidência da circulação do ILHV na região centro-oeste, em especial o Pantanal, também já foi comprovada. Além dos estudos soroepidemiológicos realizados nas décadas de 1990 e 2000, que demonstraram exposição de equinos ao ILHV em diferentes propriedades da região, o vírus foi isolado em *Aedes scapularis* capturados na região em 2010. Acredita-se que a espécie pode ser um vetor nesta região (Figura 09) (Iversson *et al.*, 1993; Pauvolid-Corrêa, 2011 e 2013).

Evidências sorológicas em humanos também vêm sendo descritas em diferentes regiões do país. Inquérito sorológico realizado em moradores de reserva ecológica no Vale do Ribeira, no litoral de SP, demonstrou que 2,2% (4/182) dos indivíduos amostrados apresentavam anticorpos anti-ILHV (Romano-Lieber e Iversson, 2000). A soropositividade em humanos também já foi demonstrada no nordeste brasileiro, onde foram observados anticorpos inibidores da hemaglutinação e neutralizantes em 3,8% das amostras (n=288) (Tavares-Neto *et al.*, 1986).

O isolamento a partir de amostras de humanos no Brasil é evento raro, principalmente pelo curto período virêmico e pelo grande número de infecções assintomáticas. No entanto, ILHV já foi isolado de humanos no Panamá, Equador, Bolívia, Colômbia e Guiana Francesa (Srihongse e Johnson, 1967; Prías-Landínez, Bernal-Cubides e Morales-Alarcón, 1968; Panon, Fauran e Digoutte, 1979; Johnson *et al.*, 2007; Venegas *et al.*, 2012). No Brasil, há registro de isolamento em humanos na cidade de Belém (Pinheiro *et al.*, 1986; CDC, 2018).

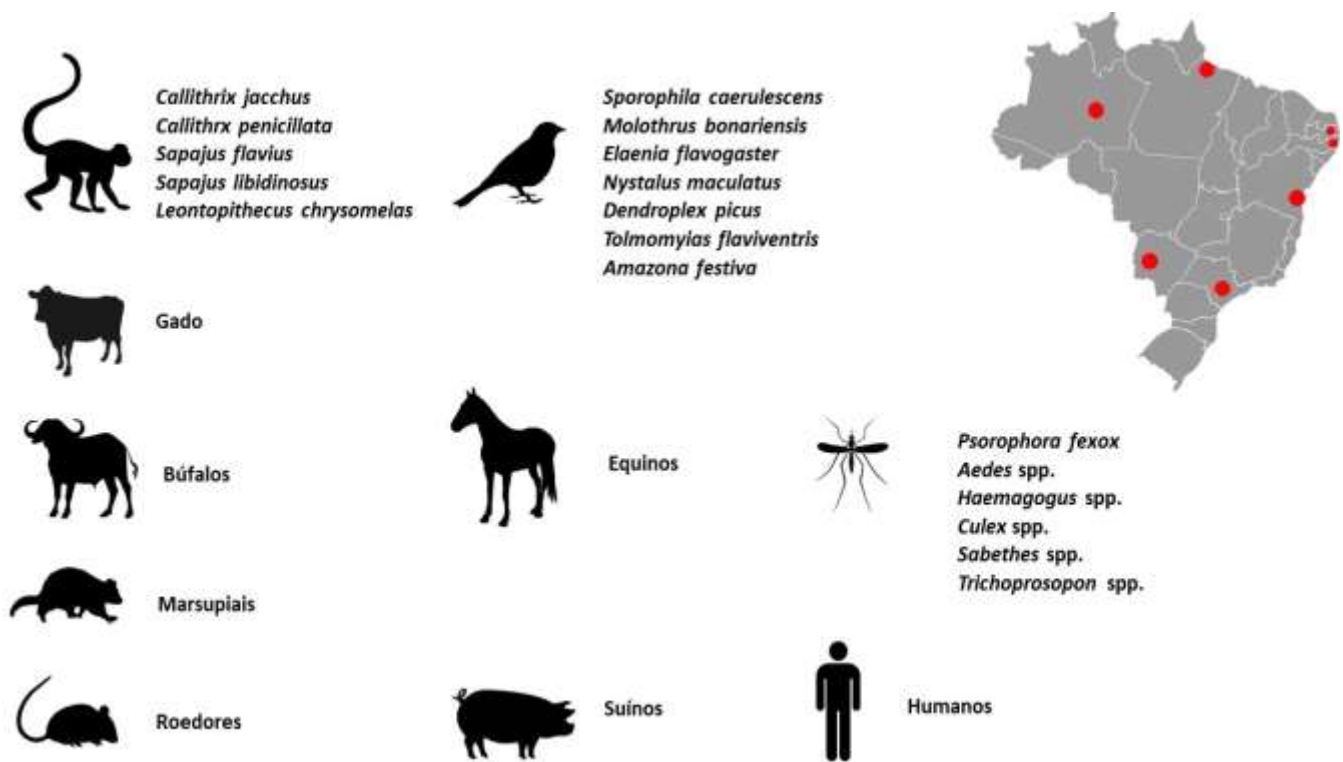


Figura 09: Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil onde a circulação do ILHV já foi detectada (Elaboração própria). Diferentes grupos de animais são apontados como potenciais hospedeiros vertebrados amplificadores do vírus Ilhéus. No Brasil, há evidência da infecção em animais domésticos e silvestres. Acredita-se que *Psorophora ferox* seja o principal vetor.

1.4.6 Vírus rocio (*Rocio virus* ou ROCV)

O ROCV foi isolado pela primeira vez no ano de 1975, a partir do tecido cerebral de um paciente que veio a óbito durante uma importante epidemia de encefalite no ocorrida no Vale do Ribeira, litoral de SP (Lopes *et al.*, 1978). O termo Rocio foi dado em referência ao nome do bairro onde o paciente morava, na cidade de Iguapé, SP. Na série histórica de 1973 a 2000, foram notificados 1021 casos de encefalite, com letalidade estimada de 10%. Uma parcela dos pacientes convalescentes apresentou sequelas neurológicas e cognitivas (Iversson, 1980).

Nos anos consecutivos à epidemia do Vale do Ribeira, anticorpos anti-ROCV foram detectados em humanos na mesma região, bem como em diferentes cidades do estado da Bahia (BA) (Tavares-Neto *et al.*, 1986; Iversson *et al.*, 1989; Straatmann *et al.*, 1997). Apesar da complexidade do diagnóstico sorológico dos flavivírus, a detecção de anticorpos neutralizantes anti-ROCV em moradores da Estação

Ecológica de Juréia-Itatins em SP em 1990, sugere manutenção de ROCV na região (Lopes *et al.*, 1978; Straatmann *et al.*, 1997; Romano-Lieber e Iversson, 2000).

Com relação aos vetores de ROCV, em uma investigação entomológica conduzida durante na década de 1970, ROCV foi isolado de pools de *Ps. ferox* (Lopes *et al.*, 1981). A competência vetorial não só de *Ps. ferox*, mas também de *Ae. scapularis* foi comprovada através de estudos experimentais. No entanto, a excelente suscetibilidade de *Ae. scapularis* à infecção oral pelo ROCV, sua eficácia na transmissão experimental, sua abundância, hábitos peridomiliares, e íntima relação com o homem na zona epidêmica sugerem que esta espécie tenha sido o principal vetor durante as epidemias ocorridas no Vale do Ribeira na década de 1970 (Mitchell e Forattini, 1984; Mitchell, Forattini e Miller, 1986).

Apesar das limitadas evidências, acredita-se que as aves sejam os hospedeiros amplificadores e dispersores de ROCV. Durante a epidemia da década de 1970, ROCV foi isolado de *Zonotrichia capensis*, popularmente conhecida como tico-tico (Lopes *et al.*, 1978). Estudos de infecção experimental com pardais (*Passer domesticus*) evidenciaram uma viremia rápida e com limitada carga viral, sugerindo a não participação da espécie em ciclos de manutenção de ROCV. Contudo, os achados corroboram o pressuposto de que as aves participam do ciclo de transmissão silvestre do ROCV (Monath *et al.*, 1978). A soropositividade em aves migratórias, como da espécie *Sporophila caerulea*, conhecida como coleirinho, e as evidências sorológicas reportadas em outros animais de outros estados, como MS, PR, BA, PB e PA, sugerem que aves com hábitos migratórios podem contribuir para a dispersão de ROCV no Brasil (Taveres-Neto *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1994; Iversson, 1988, 1994; Casseb *et al.*, 2014; Pauvolid-Correa *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Durante a epidemia, Lopes e colaboradores (1978) encontraram marsupiais (60%; 3/5), roedores (31,8%; 7/22), pombos (28,5%; 2/7), patos (25%; 1/4), morcegos (10,9%; 6/55) e galinhas (7,3%; 7/96) soropositivos na região epidêmica. Nenhuma outra evidência da infecção pelo ROCV foi demonstrada em animais silvestres.

Os animais domésticos, em especial os cavalos, vêm sendo utilizados como importantes marcadores de circulação de arbovírus. Em 2009, em um grande estudo soropizootiológico para pesquisa de flavivírus realizado com equinos no Pantanal de MS, um indivíduo foi soropositivo para ROCV e negativo para todos os outros flavivírus circulantes no país (Pauvolid-Correa *et al.*, 2014). Outros estudos também sugerem a exposição de equinos e bubalinos ao ROCV em outras regiões do Brasil (Silva *et al.*, 2014; Casseb *et al.*, 2014) (Figura 10).

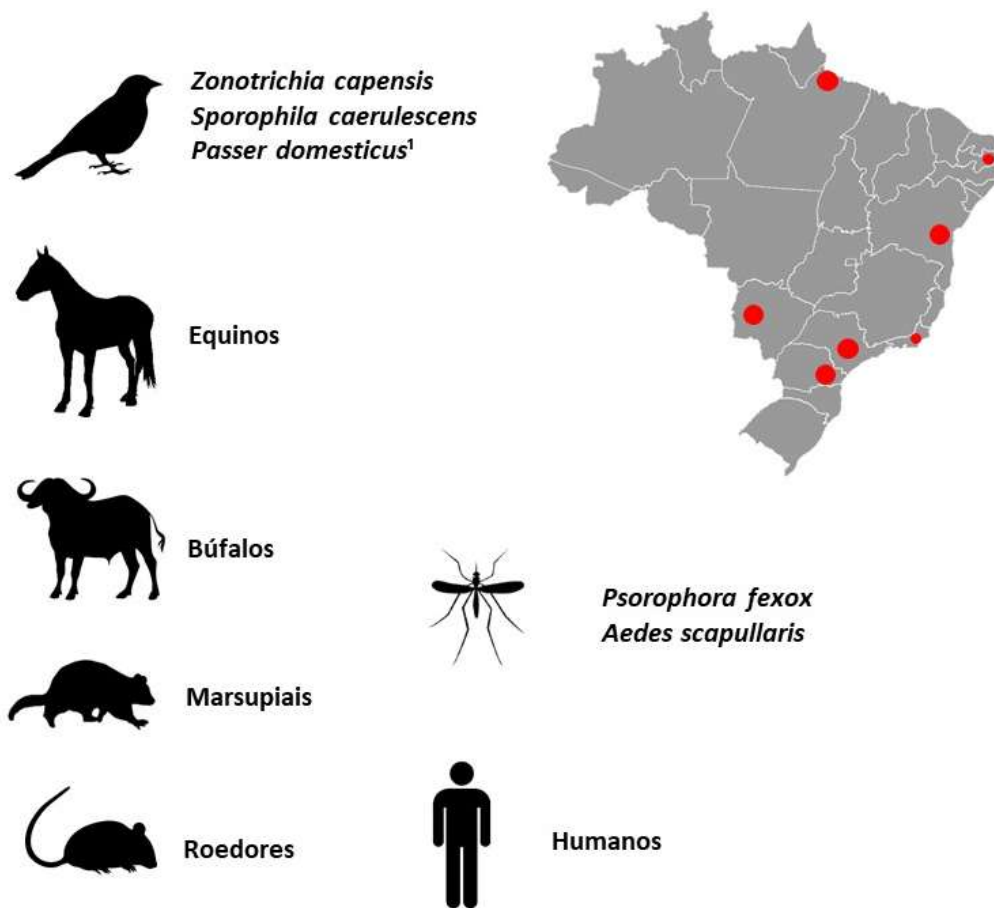


Figura 10: Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil onde a circulação do ROCV já foi detectada. Infecção experimental (Elaboração própria). Diferentes grupos de animais são apontados como potenciais hospedeiros vertebrados amplificadores do vírus rocio. No Brasil, há evidência da infecção em animais domésticos e silvestres. No entanto, as aves são consideradas o principal grupo responsável pela manutenção e dispersão viral. Acredita-se que *Psorophora ferox* seja o principal vetor.

1.4.7 Vírus da encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* ou SLEV)

Durante epidemia de encefalite ocorrida em 1933 em Saint Louis no Missouri, EUA, pesquisadores conseguiram isolar o SLEV a partir da suspensão do tecido cerebral de um caso fatal. (Webster e Fite, 1933).

Atribuiu-se a transmissão do SLEV principalmente aos mosquitos do gênero *Culex*, como *Cx. coronator*, *Cx. declarator*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. tarsalis*. No entanto,

acredita-se que espécies dos gêneros *Aedes*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Trichoprosopon* e *Wyeomyia* também possam participar como vetores secundários do ciclo de transmissão (Belle, Grant e Page, 1964; Bailey *et al.*, 1978; Figueiredo, 2007; CDC, 2018). A detecção do vírus já foi reportada em aracnídeos e laelapídeos, sendo este último ectoparasitas de roedores na região amazônica (Hammon *et al.*, 1948; Turell *et al.*, 2005).

As aves são apontadas como o principal grupo de manutenção do vírus no ciclo enzoótico. Na década de 1960 foi realizado o primeiro isolamento do SLEV a partir de aves no Brasil. Duas espécies, *Crypturellus noctivagus* e *Thraupis sayaca*, conhecidas popularmente como jaó-do-sul e sanhaço, respectivamente, foram encontradas naturalmente infectadas em SP (Lopes *et al.*, 1979). Estudos realizados na Amazônia brasileira identificaram e isolaram o vírus de membros das famílias Formicariidae (*Formicarius analis*, *Conopophaga aurita*, *Thamnomanes caesius* e *Hylophylax poecilonota*), Pipridae (*Chiroxiphia pareola*) e Columbidae (*Geotrygon montana*). Evidências sorológicas também já foram reportadas em diversas espécies de aves, com taxas de positividade variando de 1% a 16,7% (Tabela 01) (Vasconcelos *et al.*, 1991; Garret, 1998). A detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em aves foi evidenciada em SP em mais de 49 espécies, incluindo de hábitos migratórios (Ferreira *et al.*, 1994).

Tabela 01: Espécies de aves silvestres positivas para presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação para SLEV na Amazônia brasileira (Vasconcelos *et al.*, 1991).

Família	Espécie	% positividade	N
Formicariidae	<i>Myrmotherula hauxwelli</i>	2.3	196
	<i>Formicarius analis</i>	11.4	39
	<i>Pyriglema leuconota</i>	1.5	223
	<i>Thamnomanes caesius</i>	6.1	95
	<i>Hilophylax poecilonota</i>	5.1	360
	<i>Hypocnemis cantator</i>	3	134
	<i>Conopophaga aurita</i>	5.3	75
Pipridae	<i>Chiroxiphia pareola</i>	16.7	34
	<i>Pipra pipra</i>	0.7	290
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	0	289
	<i>Geotrygon montana</i>	3.4	219
Furnariidae	<i>Automolus infuscatus</i>	1.2	98
	<i>Phylidor erythrocerchus</i>	0	23
Tyranidae	<i>Myiobius barbatus</i>	1	196
Galbulidae	<i>Galbula albirostris</i>	2.7	78
Fringillidae	<i>Saltator maximus</i>	2.1	154
Dendrocolaptidae	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>	3.6	498

No Brasil, a presença de anticorpos anti-SLEV vem sendo amplamente descrita em mamíferos, sobretudo nos equinos. Diferentes inquéritos sorológicos realizados na região do Pantanal sul matogrossense detectaram anticorpos neutralizantes anti-SLEV, sugerindo um ciclo de transmissão ativo no ecossistema pantaneiro (Pauvolid-Correa, 2010, 2011, 2014). Equinos soropositivos também já foram descritos em MG, SP, RJ e PB (Silva *et al.*, 2014) e em 2009, SLEV foi isolado do tecido cerebral de um equino apresentando desordem neurológica em Abaeté, MG. Este foi o primeiro relato de quadro clínico em equino associado à infecção por SLEV (Rosa *et al.*, 2013). Em relação a outros animais Casseb e colaboradores (2014) descreveram a presença de anticorpos anti-SLEV em búfalos no Pará, enquanto que estudos recentes demonstraram soropositividade em PNH dos estados do Paraná (*Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus* e *Sapajus cay*) e Pernambuco (*Sapajus* spp.) (Figura 11) (Svoboda *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2018).

A circulação do SLEV na população humana também vem sendo descrita no Brasil desde a década de 1950. Durante investigação em ribeirinhos amazônicos, detectaram-se anticorpos neutralizantes em 5,5% das amostras (Causey *et al.*, 1964). Enquanto o isolamento viral a partir de um caso humano foi realizado de um paciente sintomático em Belém (Pinheiro *et al.*, 1981). O primeiro isolamento do vírus na região sudeste ocorreu a partir da amostra de um caso febril agudo em São Paulo (Rocco *et al.*, 2005). Indivíduos soropositivos também já foram identificados em SP, RJ e na região nordeste (Pinheiro *et al.*, 1975; Tavares Neto *et al.*, 1986; Romano-Lieber e Iversson, 2000).

Em anos recentes, SLEV vem sendo esporadicamente detectado, através de métodos moleculares, durante epidemias de dengue em áreas urbanas do país. Em São José do Rio Preto e Cuiabá foram reportados casos de co-infecção com DENV-3 ou DENV-4 (Mondini *et al.*, 2007, Terzian *et al.*, 2011, Heinen *et al.*, 2015).

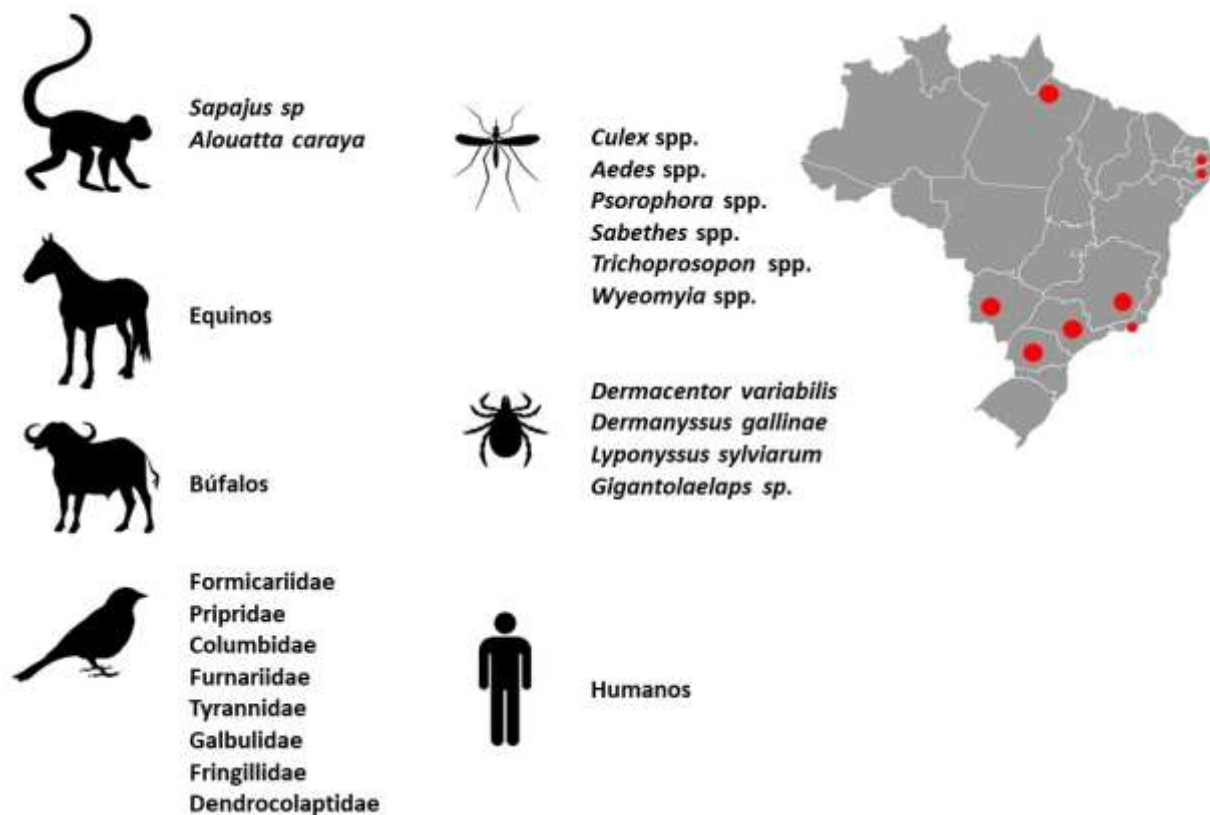


Figura 11: Hospedeiros vertebrados, artrópodes vetores e localidades no Brasil onde a circulação do SLEV foi detectada (Elaboração própria). Diferentes grupos de animais são apontados como potenciais hospedeiros vertebrados amplificadores do vírus da encefalite de Saint Louis. No Brasil, há evidência da infecção em animais domésticos e silvestres. No entanto, as aves são consideradas o principal grupo responsável pela manutenção e dispersão viral. Acredita-se que mosquitos do gênero *Culex* sejam os principais vetores.

1.4.8 Vírus cacipacoré (*Cacipacore virus* ou CPCV)

A primeira descrição do CPCV advém do isolamento viral a partir da ave silvestre *Formicarius analis*, popularmente conhecida como pinto-do-mato, capturado em Cachoeira Porteira, estado do Pará, no ano de 1977. Outros estudos conduzidos na mesma área, na cidade de Tomé-Açu e na atual Reserva Biológica do Rio Trombetas identificou anticorpos anti-CPCV em humanos, roedores, morcegos e principalmente em aves silvestres (Karabatsos, 1985). Evidência sorológica também fora reportada em PNH e equinos em MS e búfalos no estado do Pará (PA) (Batista *et al.*, 2012; Casseb *et al.*, 2014; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011, 2014).

Com relação aos vetores, investigações entomológicas realizadas com flebotomíneos e culicídeos coletados entre 1976 a 1979 em Cachoeira Porteira (PA), onde CPCV foi isolado pela primeira vez, não detectaram CPCV em mais de 2500 *pools* de insetos testados (Karabatsos, 1985). Na década de 1990, CPCV foi isolado de carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* coletados de capivaras em SP. O estudo sugere que *A. sculptum* possa ser um potencial vetor de CPCV e que mamíferos possam participar do ciclo de transmissão (Nava *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2017). Mais recentemente, o RNA de CPCV foi detectado em *pools* de *Culex* spp. e *Anopheles* spp. capturados em Rondônia e em espécimes de *Ae. aegypti* capturados no Amazonas (Henriques, 2008; Figueiredo *et al.*, 2017).

O primeiro, e até o momento único, isolamento de CPCV em humanos ocorreu em um paciente suspeito de febre amarela no município de Theobroma, Rondônia. (Batista *et al.*, 2011).

1.4.9 Vírus bussuquara (*Bussuquara virus* ou BSQV)

O BSQV foi isolado pela primeira vez no Brasil no ano de 1956, a partir do sangue de um guariba (*Alouatta beelzebul*) sentinela em Belém, Pará. A inoculação intracerebral da amostra em camundongos neonatos evidenciou o desenvolvimento de sinais clínicos. O guariba infectado apresentou icterícia e evoluiu para o óbito algumas semanas depois. Testes sorológicos demonstraram que o agente não reagia sorologicamente com nenhum outro arbovírus, caracterizando-o como um novo agente (Gomes e Causey, 1959).

São escassas as informações acerca dos hospedeiros vertebrados e invertebrados que participam do ciclo de transmissão de BSQV. O vírus tem sido isolado na região amazônica brasileira a partir de *Proechimys guyannensis*, camundongos sentinelas, *Culex* spp., *Culex taeniopus*, *Culex vomerifer*, *Mansonia titilans* e *Coquilettidia venezuelensis* (Karabatsos, 1985). Recentemente, anticorpos anti-BSQV foram detectados em búfalos no PA (Casseb *et al.*, 2014). A circulação do BSQV já foi reportada em outros países das Américas, como Colômbia, Panamá e Argentina (Morales *et al.*, 2017; Karabatsos, 1985).

O único relato de infecção sintomática humana advém do Panamá. O BSQV foi isolado de um homem de 29 anos que apresentou um quadro febril agudo, cefaléia e artralgia sem evidência de inflamação (Srihongse e Johnsn, 1971).

1.4.10. Outros flavivírus identificados no Brasil.

Além dos vírus acima descritos, outros flavivírus de menor relevância médica e veterinária também já foram reportados no Brasil. Apesar de limitadas e esporádicas evidências, há relatos na literatura científica da circulação de vírus iguapé (*Iguape virus* ou IGUV), bem como dos flavivírus específicos de insetos *Culex flavivirus* (CxFV), e vírus nhumirim (NHUV) no Brasil, cujos detalhes se encontram descritos a seguir.

O primeiro isolamento do IGUV foi realizado no ano de 1979 a partir do sangue de roedores sentinelas no Vale do Ribeira, SP. Estudos complementares realizados na mesma região detectaram anticorpos anti-IGUV em roedores, marsupiais, morcegos, galinhas, patos, focas e aves. Este último foi o grupo que apresentou maior soropositividade (Coimbra *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994). IGUV também foi isolado de um *pool* de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* capturado em área verde na Serra do Mar em SP (Bocato-Chamelet *et al.*, 2001).

O CxFV foi isolado pela primeira vez no Japão em 2007 a partir de um *pool* de *Culex pipiens*. O vírus é específico de insetos e incapaz de infectar células de mamíferos (Hoshino *et al.*, 2007). Desde sua descoberta na Ásia, CxFV vem sendo reportado em outros países por todo o mundo, incluindo Guatemala, México, EUA e Trinidad (Morales-Betoulle *et al.*, 2008; Saiyasombat *et al.*, 2010). No Brasil, o primeiro isolamento aconteceu a partir de *pools* de *Culex spp.* coletados na cidade de Ribeirão Preto, SP (Machado *et al.*, 2012).

Recentemente, um flavivírus até então desconhecido da ciência foi isolado de espécimes de *Culex chidesteri* coletados em 2010 no Pantanal de MS. O vírus denominado Nhumirim (*Nhumirim virus* ou NHUV), é um flavivírus específico de insetos, mas diferente dos vírus específicos de inseto clássicos como CxFV, já que as análises filogenéticas revelaram que NHUV é um flavivírus mais relacionado aos flavivírus que utilizam dois hospedeiros como DENV, WNV, YFV etc. (Pauvolid-Corrêa *et al.* 2015). A essa característica se atribui a extraordinária capacidade de suprimir a replicação não só de WNV, bem como de ZIKV e DENV, quando experimentalmente co-infectado em *Cx. quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente (Goenaga *et al.*, 2015; Romo *et al.* 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A América do Sul, em especial o Brasil, é apontado como uma importante área para emergência e reemergência de vírus zoonóticos associada às atividades antrópicas sobre áreas de floresta e urbanização desordenada. Isso se deve não só pela grande diversidade de vírus já identificados e que circulam em ciclos enzoóticos silenciosos principalmente na Amazônia, como também pela abundante biodiversidade de potenciais hospedeiros vertebrados, incluindo roedores e quirópteros. (Weaver, 2013; Olival *et al.*, 2017).

No Brasil, epidemias recorrentes causadas pelos quatro sorotipos de DENV ocorrem, desde o final da década de 1980, culminando no estabelecimento de um cenário hiperendêmico (San Martín *et al.*, 2010). No entanto, foi após a emergência do ZIKV no país em 2015, que o país vivenciou uma emergência sanitária em saúde pública, resultante da relação causal entre o vírus e síndrome congênita da zika (SCZ) em fetos e bebês. Com a emergência do CHIKV em 2016, o país tem sido acometido por uma tríplice epidemia (Cardoso *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017). A situação é agravada pela emergência da febre amarela que forçou a implementação de campanhas de vacinação para conter o avanço da doença para os centros urbanos. A dispersão do YFV para regiões, até então consideradas indenes no país, causou grande impacto não só no sistema de saúde pública brasileiro, como também nas populações de PNH do Brasil, em especial os bugios (*Alouatta spp.*) (Goldani, 2017). A recente detecção de uma epizootia por WNV em equinos no Espírito Santo reforça o alerta e a necessidade de vigilância para as arboviroses emergentes no contexto de saúde pública e saúde veterinária (Martins *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades de mamíferos do mundo, incluindo PNH, roedores, morcegos e artrópodes vetores que podem participar da manutenção do ciclo silvestre dos diversos arbovírus, em especial dos flavivírus. Estudos que busquem compreender o papel dos hospedeiros vertebrados silvestres na manutenção dos flavivírus são escassos e se fazem essenciais ao conhecimento da manutenção e transmissão destes vírus (Figueiredo *et al.*, 2000; Althouse *et al.*, 2016; Bueno *et al.*, 2016).

Historicamente, as regiões sudeste, nordeste e norte do país têm sido de grande importância para emergência e manutenção destes vírus. No entanto, o papel da região centro-oeste também merece investigação, principalmente em face da grande biodiversidade encontrada nos biomas do cerrado e Pantanal, bem como das características sócio-econômicas dos estados da região. Neste cenário, este estudo visa investigar a circulação de flavivírus em animais silvestres de vida livre no centro-oeste do

Brasil e integra parte de um estudo coordenado e financiado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a circulação do vírus zika e outros flavivírus em animais silvestres no centro-oeste do Brasil.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar a captura de animais silvestres, incluindo mamíferos, anfíbios e répteis em parques florestais urbanos localizados em áreas metropolitanas de Cuiabá, MT e Campo Grande, MS;
- Investigar a infecção aguda de ZIKV e outros flavivírus nas amostras dos animais silvestres através de métodos moleculares (RT-PCR em Tempo Real);
- Realizar o sequenciamento nucleotídico das amostras positivas para identificação e análise filogenética dos flavivírus detectados.
- Investigar exposição de animais silvestres do centro-oeste ao ZIKV através de teste de neutralização para pesquisa de anticorpos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instituições Participantes

O presente estudo transversal, que integra parte do projeto “Estudo ecológico do ZIKV na América do Sul”, coordenado e financiado pelo CDC – EUA, foi realizado no Laboratório de Imunologia Viral (LIV) e Laboratório de Flavivírus (LABFLA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e contou com a participação de outras cinco instituições de pesquisa.

No Brasil, o estudo foi desenvolvido nas áreas metropolitanas de Cuiabá, (MT) e Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), afim de identificar potenciais espécies participantes no ciclo de manutenção do ZIKV no país. Os coordenadores do estudo são Dr. Joel Montgomery e Stephanie Salyer da Divisão de Proteção de Saúde Global e Dr. Nicholas Komar da Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores do CDC. No Brasil, o estudo foi coordenado pelo Dr. Alex Pauvolid-Corrêa, pesquisador visitante do LABFLA.

O trabalho de campo para captura e coleta de material clínico dos animais contou com o apoio da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Campo Grande (CRAS) e pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 Autorizações e Licenças:

O presente estudo é parte do projeto de ecologia do vírus Zika na América do Sul aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) das seguintes instituições:

Centers for Disease Control and Prevention, CDC – EUA (Protocolo nº 2809SALMULX-A2) (Anexo A);

Universidade Católica Dom Bosco (Protocolo nº 001/2017) (Anexo B);

Universidade Federal de Mato Grosso (Protocolo nº 23108.169037/20116-24) (Anexo C);

O programa de captura e coleta dos animais silvestres foi submetido e aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), autorizações para atividades com finalidade científica:

Nº 54728-1 (Mato Grosso – UFMT) (Anexo D);

Nº 56912-1 e Nº 57450-1 (Mato Grosso do Sul – UCDB) (Anexo E);

O estudo também possui autorizações das secretarias estaduais de meio ambiente:
Secretaria de Meio Ambiente de Mato Grosso (SEMA), protocolo nº 61/405959/2116 (Anexo F);
Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul (IMASUL/SEMADE), protocolo nº 003/2017
(Anexo G).

4.3 Metodologia das Amostragens

4.3.1 Local de estudo

A região centro-oeste, em especial as regiões metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande, foram escolhidas para realização do estudo por (1) apresentar a maior taxa de incidência do país (222 casos/100 mil habitantes) em 2016 para a febre do ZIKV (Brasil, 2017); (2) pela circulação silenciosa de arbovírus de interesse médico como o OROV e o MAYV; (3) pela proximidade com o Pantanal, área de sabida circulação enzoótica de diversos arbovírus; e (4) pelas colaborações já existentes com os centros de pesquisa da região. As amostragens foram conduzidas nas regiões metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande, Centro-Oeste do Brasil (Figura 12).



Figura 12: Localização das áreas de coleta em MT e MS (pontos vermelhos) na Região Centro-Oeste do Brasil, áreas de realização das amostragens (Google Maps, 2018).

Um total de 17 subsítios (localidades) foi amostrado, sendo 07 situadas na área metropolitana de Campo Grande e 10 na área metropolitana de Cuiabá (Quadro 01, Figura 13). A amostragem de conveniência foi realizada três campanhas (abril/maio, julho/agosto e outubro/novembro) em 2017 e uma campanha (fevereiro/março) em 2018. Apesar das diferenças climáticas de uma sub-região para a outra, a região centro-oeste apresenta duas estações bem definidas, a estação chuvosa que vai de novembro a abril e a estação seca entre maio e novembro (Alves, 2009).



Figura 13: Localização dos subsítios amostrados no presente estudo. (A) Subsítios localizados na área metropolitana de Cuiabá; (B) Subsítios localizados na área metropolitana de Campo Grande (Google Maps, 2018).

Quadro 01: Localização dos subsítios amostrados durante as campanhas de investigação de flavivírus em animais silvestres provenientes de Campo Grande, MS e Cuiabá, MT durante 2017 e 2018.

Durante as campanhas de captura dos animais silvestres, 17 subsítios foram selecionados para a amostragem, sendo 7 em Campo Grande e 10 em Cuiabá.

Estado	Área metropolitana (sítio)	Subsítio	Latitude	Longitude
Mato Grosso do Sul (MS)	Campo Grande	Campus UFMS	-20.503242°	-54.613595°
		Instituto São Vicente	-20.386024°	-54.605162°
		Fazenda Escola UCDB	-20.409188°	-54.615595°
		Centro de Reabilitação de Animais Silvestres	-20.452373°	-54.563471°
		Parque Estadual do Prosa	-20.451225°	-54.562911°
		Parque das Nações Indígenas	-20.452423°	-54.571505°
		Centro de Controle de zoonoses CCZ	-20.507340°	-54.620612°
Mato Grosso (MT)	Cuiabá	Parque Ecológico do Soter	-20.429003°	-54.576468°
		Hotel fazenda Mato Grosso	-15.636444°	-56.065033°
		Parque Massairo Okamura	-15.565406°	-56.065150°
		Parque Mãe Bonifácia	-15.580696°	-56.107170°
		Associação Voz Animal	-15.578742°	-56.011290°
		Zoológico UFMT	-15.605899°	-56.062833°
		Hospital Veterinário UFMT	-15.611543°	-56.065904°
		Bairro Santa Cruz	-15.635278°	-56.037778°
		Campus UFMT	-15.609270°	-56.063945°
	Horto florestal Tote Garcia	-15.631947°	-56.062761°	
	Rancho Raça Forte	-15.599558°	-56.047528°	
	Fazenda Santo Antônio do Levenger	-15.624879°	-56.072.824	

4.3.2 Subsítios de amostragem em área metropolitana de Campo Grande

Fundado em 1962, o campus da UFMS situado na cidade de Campo Grande possui aproximadamente 160 hectares de área. Bolsões de mata nativa (Cerradão), dentro do perímetro do campus, permanecem preservados com populações de mamíferos, aves e répteis. O Lago do Amor, localizado na porção centro-oeste do campus, serve de refúgio para grupos de capivaras (UFMS, 2017).

O Instituto Salesiano São Vicente é parte do campus da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), situado no bairro de Lagoa da Cruz, apresenta ampla área aberta e de mata verde propícia para a captura de morcegos, marsupiais peridomésticos e pequenos roedores.

A Fazenda Escola da UCDB fica situada a 2km do campus da universidade e serve de base para o ensino e pesquisa dos cursos de graduação em Medicina Veterinária, Zootecnia e Agronomia. A unidade abriga um pequeno centro de recepção de animais debilitados e apresenta área verde ideal para a captura de morcegos.

O Parque das Nações Indígenas apresenta 119 hectares de área e preserva algumas espécies de árvores nativas, mas grande parte da vegetação foi desmatada em virtude do projeto arquitetônico original. No centro do parque situa-se um lago formado pelas águas do córrego do Prosa que serve de refúgio para famílias de capivaras (IMASUL, 2018).

O Parque Ecológico do Soter apresenta área de cerca de 22 hectares e recebe diariamente centenas de pessoas para a prática de exercícios físicos e atividades de lazer.

O Parque Estadual do Prosa (PEP) é uma Unidade de Conservação estadual de proteção integral, situado no planalto da Serra do Maracajú, dentro do perímetro urbano de Campo Grande. Na região do Parque predomina o clima tropical úmido ou de savana, com duas estações definidas, uma chuvosa de outubro a maio e uma seca de julho a setembro. Uma extensa rede hidrográfica pertencente à bacia do rio Anhanduí permeia o Parque e serve de fonte de água potável para as populações no entorno. Três tipos vegetacionais são encontrados: Cerrado, Cerradão e mata Ciliar. Locais de vegetação secundária, fruto de anos de descaracterização antrópica com introdução de espécies exóticas, podem ser observados. A fauna do Parque é composta de espécies nativas e espécies introduzidas por solturas de animais apreendidos pela Polícia Florestal e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Um levantamento de fauna realizado em 2011, evidenciou a presença de 22 espécies de mamíferos, 68 espécies de aves, 14 espécies de répteis e 8 espécies de peixes (Mato Grosso do Sul, 2011).

O Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) foi fundado em 1987 e pertence a administração estadual. O CRAS recebe e oferece tratamento médico veterinário aos animais silvestres e apreendidos em operações de combate ao tráfico, entregues pela população ou vítimas de atropelamentos (IMASUL, 2018).

4.3.3 Subsítios de amostragem em área metropolitana de Cuiabá

O Hotel Fazenda Mato Grosso é uma propriedade privada situada à margem do rio Coxipó e apresenta grande área verde, predominantemente de vegetação baixa, onde se efetuou a captura principalmente de morcegos.

Os parques Massairo Okamura (51 hectares) e Mãe Bonifácia (77 hectares) pertencem à administração estadual e são áreas de proteção ambiental, possuindo nascentes de rios e vasta área de

mata preservada que abriga espécies nativas. Apesar de serem unidades de proteção ambiental, ambos os parques não apresentam plano de manejo de fauna e flora (MT, 2018a).

O zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), fundado em 1977, possui área de cerca de 12 hectares a abriga mais de 600 animais de 100 diferentes espécies. Foram amostrados neste subsítio principalmente répteis e quatis (MT, 2018b). O hospital veterinário da UFMT situa-se dentro do campus da universidade e recebe diversos animais debilitados, que recebem tratamento adequado e são reintroduzidos ao seu habitat natural. Por sua vez, o campus da UFMT apresenta área de cerca de 4.300 hectares (UFMT, 2018).

O bairro Santa Cruz é localizado perto do campus da UFMT, no entanto, apresenta grande área residencial com resquícios de mata nativa. A sua porção sul é cortada pelo rio Coxipó, local adequado para a amostragem de anfíbios.

O rancho Raça Forte é uma propriedade privada situada no bairro Morada dos Nobres. Durante o período de amostragem o bairro sofria com um intenso processo de desmatamento para a construção de complexos imobiliários.

O Horto Florestal de Cuiabá ou Horto Florestal Tote Garcia, situado na margem esquerda do rio Coxipó, no município de mesmo nome, foi instituído em 1939 e pertence à administração municipal. Devido à pressão imobiliária, o horto teve sua área inicial de 34 hectares reduzida para 15 hectares. Com presente ação antrópica, no horto encontram-se um viveiro de plantas medicinais e um centro de plantio de plantas ornamentais da prefeitura. A vegetação predominante é de mata ciliar com espécies nativas e exóticas. O horto não conta com um plano de manejo de fauna e flora (Prefeitura de Cuiabá, 2017).

A fazenda Santo Antônio do Leverger, situada no município de mesmo nome, localiza-se na região metropolitana do Vale do Rio Cuiabá, com predominância de características rurais, com criação de gado e vias não pavimentadas.

4.3.5 Captura dos animais silvestres e coleta de espécimes clínicos

As amostras de sangue dos animais foram coletadas por conveniência. Durante a coleta, informações de cada animal acerca da espécie, idade, sexo, peso, sinais clínicos, presença de ectoparasitas e morfometria foram obtidas e incluídas no banco de dados do projeto CDC através de um aplicativo de aparelho celular (Anexo L).

Para a captura dos morcegos foi utilizada uma rede de neblina com regulagem de altura dispostas nos locais de captura a partir das 18 horas. Para a captura dos gambás, primatas e quatis foram utilizadas

armadilhas Tomahawk (45 x 17,5 x 15 cm) com iscas de banana com preparado de cereais e sardinha macerados. As armadilhas eram preparadas no final da tarde e ficavam armadas, sendo vistoriadas na manhã do dia seguinte. A captura das capivaras foi realizada com o auxílio de dardo tranquilizante. A captura dos anfíbios foi realizada manualmente, por busca ativa, no período noturno por profissionais treinados na captura desses animais. A captura das tartarugas foi realizada com o auxílio de armadilhas do tipo covo (1m x 0,45m) com abertura afinulada para impedir a saída do animal.

Todas os procedimentos envolvendo a captura, sedação ou eutanásia (apenas os morcegos foram eutanasiados) e coleta de material clínico dos animais silvestres foram supervisionadas por veterinários, afim de garantir as boas práticas de bem-estar animal, de acordo com os protocolos de biossegurança padronizados (Mills *et al.*, 1998; Lemos e D'Andrea, 2014).

4.4 Metodologias Moleculares

4.4.1 Extração de ácido nucleico e investigação por métodos moleculares

Por se tratarem de amostras de sangue de animais silvestres de vida livre, visando minimizar exposição de laboratoristas aos potenciais agentes infecciosos, bem como proteção do ambiente, todo o procedimento envolvendo a manipulação das amostras e extração do RNA foi realizado no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 (Plataforma NB3 – Pavilhão Hélio e Peggy Pereira) do IOC, FIOCRUZ. As amostras de sangue total (n=685) foram submetidas a extração do ácido nucleico utilizando o kit comercial ZR-96 Viral RNA kit (número de catálogo R1041, ZymoResearch), específico para extração de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo H).

4.4.2 Detecção dos flavivírus

O protocolo descrito por Moreau e colaboradores (2007) foi empregado para a detecção do grupo flavivírus (Anexo I). O protocolo de PCR em tempo real (SYBR® Green) permite a amplificação de um fragmento (270pb) da região conservada NS5, utilizando 13,5 µM dos iniciadores PF1S (TGYRTBTAYAACATGATGGG) e PF2R-bis (GTGTCCCAICCNCGNTRTC). As condições de PCR consistem de uma etapa inicial de ativação composta por uma incubação a 50°C durante 10 minutos, seguida de outra incubação a 95°C durante 2 minutos. Após essa etapa de inicial, a reação segue com 40 ciclos de 95° por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. A reação é realizada para um volume final de 20 µL, contendo 8 µL do RNA, 10 µL do 2X QuantiNova RT-PCR Master Mix

(Qiagen), 0.2 µL de água livre de RNase e 0.8 µL de cada iniciador. A RT-PCR foi realizada no equipamento CFX96 (BioRad, Laboratories). Os resultados obtidos nesta reação são qualitativos, baseados na curva de dissociação das amostras não havendo, portanto, a determinação do Ct (*Cycle threshold*). Utilizou-se os critérios de positividade determinados pelo CDC, a saber: intensidade de fluorescência acima de 150 RFU e temperatura de anelamento igual ou superior a 85°C. Esses critérios são baseados em testes realizados com diferentes flavivírus, verificando-se semelhanças entre os membros deste gênero que permitem utilizar os critérios descritos. O protocolo foi desenhado como uma ferramenta de triagem para detecção do grupo flavivírus com subsequente sequenciamento nucleotídico para confirmação específica.

Utilizou-se como controle positivo da reação um RNA extraído de um isolado de DENV-2, gentilmente cedido pelo LABFLA. Optou-se pela utilização do DENV-2, pois este vírus apresenta essencialmente um ciclo urbano e não comumente detectado em animais silvestres no Brasil, o que facilitaria a identificação de resultados falso-positivos em caso de contaminação pelo controle.

4.4.3 Detecção de ZIKV

As amostras positivas na triagem para detecção de flavivírus foram submetidas a uma RT-PCR em tempo real para detecção específica do ZIKV. O protocolo empregado utiliza um par de iniciadores (Zika1087 – CCGCTGCCCAACACAAG; Zika1163c – CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT) e uma sonda (Zika1108pr-FAM – AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA) específica para uma região do gene NS5 (Lanciotti *et al.*, 2008).

As condições de RT-PCR consistem de uma etapa inicial de ativação composta por uma incubação a 50°C durante 30 minutos, seguida de outra incubação a 95°C durante 15 minutos. Após essa etapa de inicial, a reação segue com 45 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. A reação é realizada para um volume final de 50 µL, contendo 5 µL do RNA, 25 µL do Quantitect Probe RT-PCR 2X Master Mix (Qiagen), 18,2 µL de água livre de RNase e 0.5 µL de cada iniciador (Zika1087 e Zika1163c, concentração de 13,5 100 µM). A RT-PCR foi realizada no equipamento 7500 (Applied Biosystems) (Anexo J).

4.4.4 Purificação dos produtos

Os produtos da RT-PCR foram submetidos à purificação através do kit (QIAquick PR purification kit, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e então submetidas à reação de sequenciamento utilizando-se Big Dye V3.1 kit (Applied Biosystems).

4.4.5 Quantificação da massa dos produtos

Os produtos da RT-PCR já purificados foram submetidos à quantificação utilizando-se o equipamento NanoDrop 2000 (@ThermoFisher), gentilmente cedida pela Dra. Patrícia Bozza do Laboratório de Imunofarmacologia do IOC. Uma vez quantificados, os produtos foram então diluídos em água para obtenção de 6 a 10 nanogramas de massa como sugerido pela Plataforma de Sequenciamento nucleotídico da Fiocruz [plataformas.fiocruz.br], em um volume final de 6,5 microlitros.

4.4.6 Reação de sequenciamento

As amostras positivas na triagem para detecção molecular de flavivírus foram selecionadas para sequenciamento nucleotídico utilizando o mesmo iniciador senso da RT-PCR para flavivírus. Utilizou-se o protocolo da reação de sequenciamento nucleotídico empregado pela Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz. A reação consistiu em uma etapa inicial de incubação de 95°C por 15 segundos, seguida de 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos (Anexo K).

4.4.7 Sequenciamento nucleotídico

Os produtos amplificados foram enviados para a Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz – RJ [plataformas.fiocruz.br], onde foram precipitadas de acordo com protocolo interno e submetidas ao sequenciamento de Sanger pelo equipamento ABI 3730 (@ThermoFisher). As sequências obtidas foram editadas e analisadas, utilizando os programas BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST], e MEGA v.7.0.14 [www.megasoftware.net], e alinhadas com sequências correspondentes obtidas do GenBank.

4.5 Metodologia Sorológica

4.5.1 Teste de neutralização por redução de placas (PRNT₉₀) para ZIKV

Das amostras dos 685 animais que compõe a presente casuística, 174 (25,4%) tiveram amostras de plasma submetidas ao PRNT₉₀ para detecção de anticorpos neutralizantes para ZIKV. A realização dos ensaios de PRNT do projeto CDC foi dividida em dois segmentos, sendo o primeiro composto por amostras das duas primeiras campanhas (abril/maio e julho/agosto de 2017) e o segundo composto por amostras das duas últimas campanhas (outubro/novembro de 2017 e fevereiro/março de 2018). Dentro da casuística do presente estudo, 174 amostras coletadas nas duas primeiras campanhas foram submetidas ao PRNT₉₀. Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) de Bio-Manguinhos/Fiocruz sob supervisão da Dra. Sheila Lima e Emily Miranda.

Antes do início dos testes, todas as amostras de plasma foram inativadas a 56°C por 30 min para minimizar a reação inespecífica de componentes do sistema complemento e inativação eventual de agentes patogênicos.

Amostras de plasma inativadas e diluídas a 1:5 foram incubadas por uma hora a 37°C com 5% de atmosfera CO₂ com suspensão viral em igual volume, resultando em diluição final de 1:10. Ao fim da incubação, 100 µL foram inoculados em monocamadas de células Vero (ATCC CCL 81) com 200.000 células por poço (1ml) mantidas em placas de 24 poços. Uma segunda incubação pelo mesmo período e condições foi realizada para adsorção viral. Ao final da segunda incubação, aplicou-se 3mL de uma solução composta de CMC (carboximetilcelulose a 2% - Sigma) e meio de manutenção celular antes da terceira e última incubação, desta vez por quatro dias em mesmas condições de temperatura e CO₂, para formação das placas de lise de ZIKV. Ao final de terceira incubação, fixou-se as monocamadas celulares com solução de formaldeído a 5% por 24 horas. Para coloração, ao final do processo, desprezou-se a solução de formaldeído e CMC e inoculou-se 1mL de solução de metanol com cristal violeta a 2% para manutenção por 12 horas. Após descarte da solução de metanol, as placas foram lavadas com água corrente e secadas em estufa por 12 horas.

As amostras de plasma em diluição única de 1:10 que apresentaram 10% ou menos do número de placas em comparação ao controle da suspensão viral foram submetidas a um segundo ensaio em iguais condições, mas desta vez em duplicatas e em seis diluições seriadas de 1:10 até 1:320. O título de anticorpos de cada amostra foi determinado como o inverso da diluição sérica em que foram observados 90% ou mais de redução do número de UFP observado no controle da suspensão viral utilizado no ensaio

(PRNT₉₀). As amostras de plasma que apresentaram 10% ou menos do número de placas em comparação ao controle da suspensão viral na diluição 1:320 foram submetidas a um novo ensaio diluídas em duplicatas de 1:10 até 1:20480 (Figura 14).

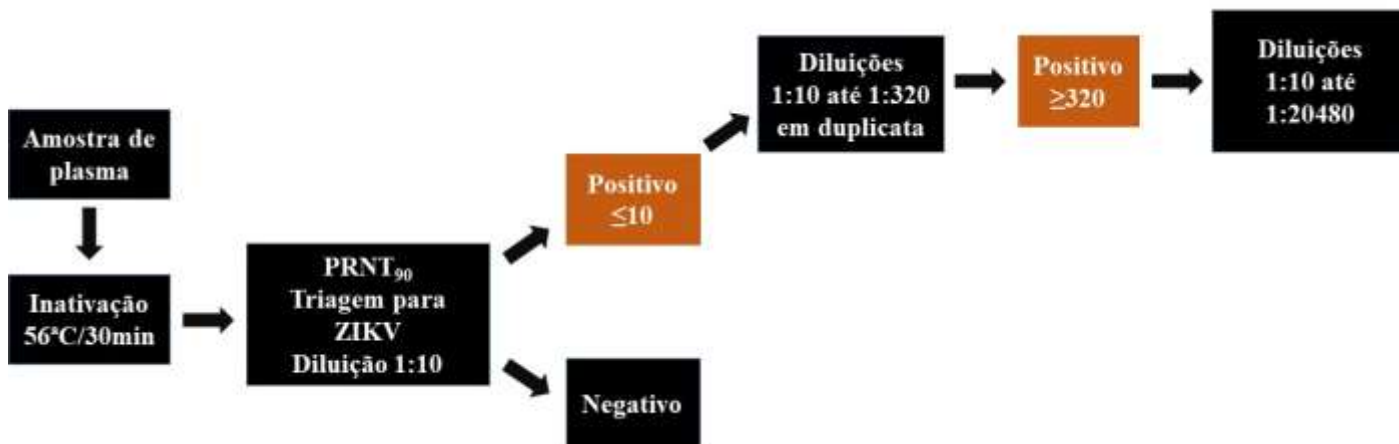


Figura 14: Esquema representativo do fluxo de testagem das amostras por PRNT₉₀ (Elaboração própria).

Após a inativação (56°C/30min), as amostras de plasma foram diluídas 1:10 e submetidas a PRNT de triagem para o ZIKV. Caso soropositivas, seguem para a confirmação, sendo submetidas a uma nova PRNT de 1:10 até 1:320. Amostras de plasma com título ≥ 320 foram submetidas a um terceiro ensaio em diluições de 1:10 até 1:20480 para determinação do título.

5. RESULTADOS

5.1 Captura de mamíferos silvestres nos parques florestais urbanos localizados em áreas metropolitanas de Cuiabá, MT e Campo Grande, MS

Durante as quatro campanhas nos anos de 2017 e 2018, em uma amostragem por conveniência, foram coletadas amostras de sangue de 685 animais silvestres de 20 espécies diferentes (Figura 15).

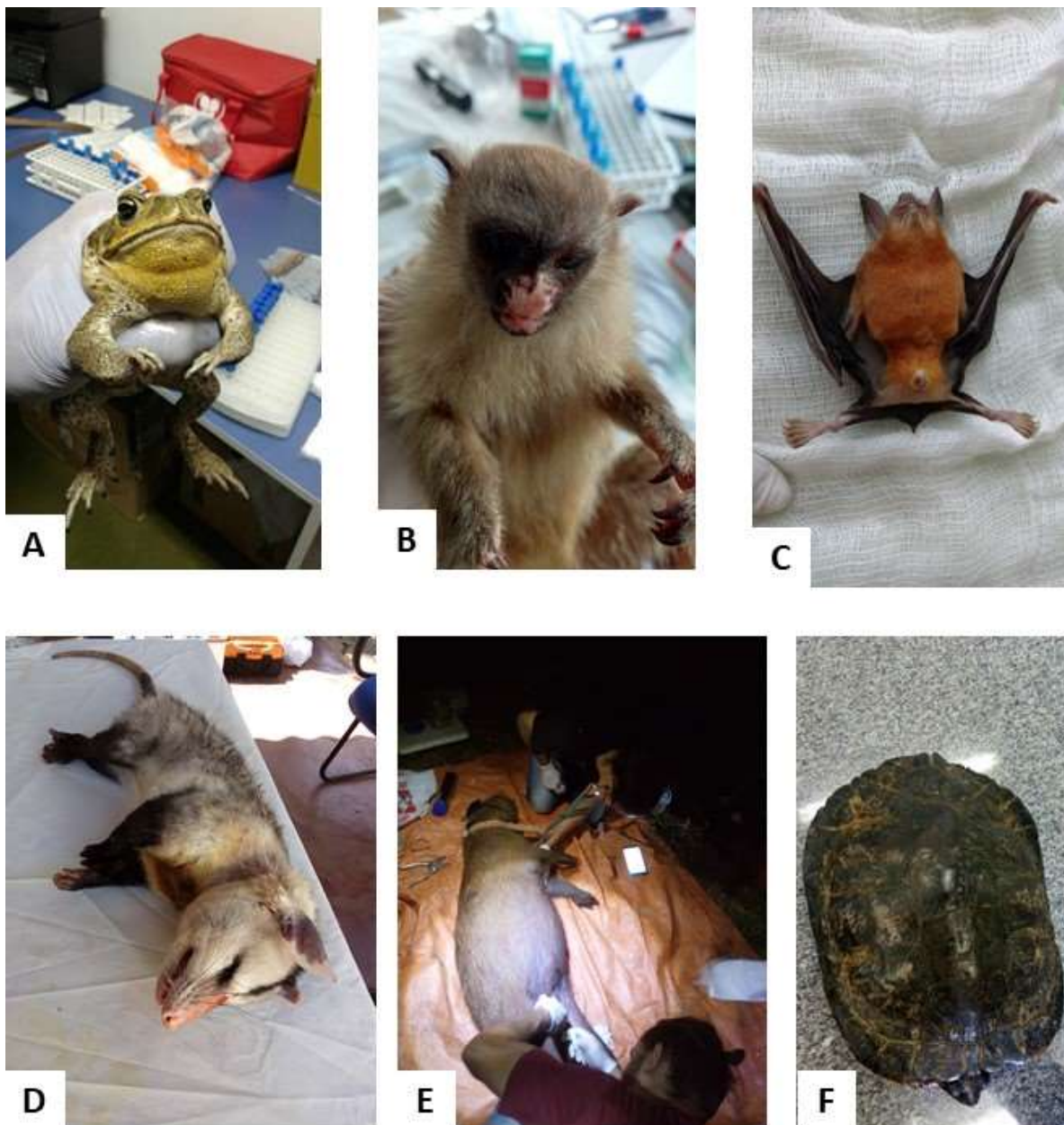


Figura 15: Captura de mamíferos silvestres e coleta de material clínico em parques florestais urbanos localizados em áreas metropolitanas de Cuiabá, MT e Campo Grande, MS, 2017 e 2018. (A) Captura de anuros; (B) Captura de primatas; (C) Captura de quirópteros; (D) Captura de marsupiais; (E) Captura de roedores; (F) Captura de testudines. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.

As estratégias de coleta para os pequenos mamíferos terrestres utilizando armadilhas Tomahawk, para os grandes roedores utilizando dardos tranquilizantes, dos morcegos por rede de neblina, dos anuros por busca ativa e dos quelônios por covos permitiu a obtenção da casuística analisada neste estudo. O esforço de captura do presente estudo está inserido dentro do esforço de captura do projeto CDC, que totalizou nas quatro campanhas nos dois sítios de captura 510 armadilhas Tomahawk dispostas em 48 dias, 45 covos dispostos em 12 dias e 128 redes de neblina dispostas em 37 noites (média de 4,2 horas por noite).

Do total amostrado (n=685), 61% (n=418) foram provenientes de Campo Grande, MS e 39% (n=267) de Cuiabá, MT. Dos 685, 54,3% (n=372) foram de mamíferos, 31,1% (n=213) de répteis e 14,6% (n= 100) de anfíbios.

De acordo com a classificação taxonômica, 132 (19,3%) indivíduos eram da ordem Chiroptera, 119 (17,4%) Squamata, 100 (14,6%) Anura, 88 (12,8%) Carnivora, 71 (10,3%) Didelphimorphia, 60 (10,4%) Testudines, 59 (8,6%) Primate, 34 (4,9%) Crocodilia e 22 (3,2%) Rodentia (Quadro 02).

Quadro 02: Distribuição das espécies capturadas nas áreas metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande de acordo com a classificação taxonômica.

Classe	Ordem	Espécie	N
Amphibia	Anura	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	11
	Anura	<i>Rhinella marina</i>	24
	Anura	<i>Rhinella schneideri</i>	65
Mammalia	Chiroptera	<i>Artibeus lituratus</i>	37
	Chiroptera	<i>Artibeus planirostris</i>	38
	Chiroptera	<i>Carollia perspicillata</i>	36
	Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	71
	Rodentia	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	22
	Primate	<i>Mico melanurus</i>	48
	Chiroptera	<i>Molossus molossus</i>	12
	Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	88
	Chiroptera	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	9
	Primate	<i>Sapajus cay</i>	11
Reptilia	Squamata	<i>Bothrops alternatus</i>	23
	Squamata	<i>Bothrops mattogrossensis</i>	11
	Squamata	<i>Bothrops moojeni</i>	37
	Crocodilia	<i>Caiman yacare</i>	34

	Squamata	<i>Crotalus durissus</i>	48
	Testudines	<i>Phrynops geoffroanus</i>	49
	Testudines	<i>Trachemys dorbigni</i>	11
TOTAL			685

A distribuição das espécies de acordo com o subsítio de coleta é apresentada no quadro 03. Dos 685 animais amostrados, 5 de Campo Grande (1 *Rhinella schneideri*, 1 *Cayman yacare* e 3 *Nasua nasua*) e 3 de Cuiabá (2 *Nasua nasua* e 1 *Didelphis albiventris*) não apresentavam informações da localização do subsítio.

Quadro 03: A distribuição das espécies de acordo com os sítios e subsítios de coleta.

Sítio	Subsítio	Espécies capturadas	N por espécie	N total
Campo Grande	Campus UFMS	<i>Artibeus lituratus</i>	10	124
		<i>Artibeus planirostris</i>	29	
		<i>Carollia Perspicilata</i>	14	
		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	12	
		<i>Molossus molossus</i>	4	
		<i>Phrynops geoffroanus</i>	45	
		<i>Platyrrhinus lineatus</i>	8	
		<i>Trachemys dorbigni</i>	2	
	Instituto São Vicente	<i>Artibeus lituratus</i>	5	15
		<i>Artibeus planirostris</i>	1	
		<i>Carollia Perspicilata</i>	1	
		<i>Didelphis albiventris</i>	3	
		<i>Molossus molossus</i>	4	
		<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1	
	Fazenda Escola UCDB	<i>Artibeus lituratus</i>	3	164
		<i>Artibeus planirostris</i>	2	
		<i>Bothrops alternatus</i>	23	
		<i>Bothrops matogrossensis</i>	11	
		<i>Bothrops moojeni</i>	37	
		<i>Crotalus durissus</i>	48	
		<i>Didelphis albiventris</i>	3	
		<i>Molossus molossus</i>	3	
	<i>Rhinella schneideri</i>	34		
	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres	<i>Sapajus cay</i>	11	11
	Parque Estadual do Prosa	<i>Artibeus planirostris</i>	1	90
		<i>Didelphis albiventris</i>	10	

		<i>Nasua nasua</i>	79	
	Parque das Nações Indígenas	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	8	8
	Parque Ecológico do Soter	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1	1
Cuiabá	Hotel fazenda Mato Grosso	<i>Rhinella marina</i>	24	50
		<i>Artibeus lituratus</i>	16	
		<i>Artibeus planirostris</i>	5	
		<i>Carollia perspicillata</i>	2	
		<i>Didelphis albiventris</i>	2	
		<i>Molossus molossus</i>	1	
	Parque Massairo Okamura	<i>Carollia perspicillata</i>	13	77
		<i>Didelphis albiventris</i>	41	
		<i>Mico melanurus</i>	23	
	Parque Mãe Bonifácia	<i>Artibeus lituratus</i>	3	31
		<i>Carollia perspicillata</i>	6	
		<i>Mico melanurus</i>	22	
	Zoológico UFMT	<i>Nasua nasua</i>	4	49
		<i>Caiman yacare</i>	33	
		<i>Phrynops geoffroanus</i>	3	
		<i>Trachemys dorbigni</i>	9	
	Hospital Veterinário UFMT	<i>Didelphis albiventris</i>	1	3
		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1	
		<i>Phrynops geoffroanus</i>	1	
	Bairro Santa Cruz	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	1	5
<i>Rhinella schneideri</i>		4		
Campus UFMT	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	10	16	
	<i>Rhinella schneideri</i>	6		
Horto florestal Tote Garcia	<i>Didelphis albiventris</i>	10	13	
	<i>Mico melanurus</i>	3		
Rancho Raça Forte	<i>Rhinella schneideri</i>	15	15	
Fazenda Santo Antônio do Levenger	<i>Rhinella schneideri</i>	5	5	

De acordo com a idade do animal, os indivíduos foram classificados em jovem, subadulto, adulto e idoso, observando as características morfométricas dos mesmos, como condição dentária e/ou reprodutiva (carnívoros, marsupiais, anfíbios e roedores) e ossificação das epífises (morcegos) (Wilson e Reed, 1993; Anthony, 1988) A distribuição por idade no sítio Campo Grande foi a seguinte: 3 (1%) jovens, 93 (22%) subadultos, 292 (70%) adultos e 30 (7%) não tiveram informações de idade coletadas

(Figura 18). Em Cuiabá, 3 (1%) foram considerados jovens, 46 (17%) subadultos, 192 (72%) adultos, 1 (1%) idoso e 25 (9%) sem informação (Figura 16).

Com relação ao sexo dos animais amostrados em Campo Grande, 54% (n=225) eram fêmeas, 36% (n=150) machos e 10% (n=43) não tiveram essa informação registrada, principalmente em virtude da dificuldade de sexagem em algumas espécies (Figura 19). Em Cuiabá, 52% (n=140) eram machos, 30% (n=80) fêmeas e 18% (n=47) não tiveram essa informação registrada.

5.2 Investigação de flavivírus por RT-PCR em tempo real

Por se tratarem de amostras sangue de animais silvestres de vida livre, incluindo morcegos e roedores eutanasiados e visando a minimização da exposição a agentes infecciosos pelos manipuladores, demais membros da equipe e proteção do ambiente, todo o procedimento envolvendo a manipulação para a extração do RNA foi realizado no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 (Plataforma NB3 – Pavilhão Hélio e Peggy Pereira) do IOC, FIOCRUZ (Figura 16).



Figura 16: A Extração de RNA realizada no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 (IOC, Fiocruz).
Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.

Do total de 685 amostras submetidas à RT-PCR, foi possível identificar amplificação em 43 (6,3%), que foram seguidamente submetidas à RT-PCR para ZIKV e sequenciamento nucleotídico para confirmação. De acordo com o sítio de coleta, 26 (n=267; 9,7%) amostras positivas foram provenientes de Cuiabá e 17 (n=418; 4%) de Campo Grande. A Fazenda Escola UCDB (n=164; 10%) foi o único subsítio de Campo Grande com amostras positivas. Em Cuiabá, sete subsítios apresentaram amostras positivas, a saber: Fazenda Santo Antônio do Levenger (3/5; 60%), Campus da UFMT (7/16; 44%), Rancho Raça Forte (6/15; 40%), Bairro Santa Cruz (1/5; 20%), Hotel Fazenda Mato Grosso (6/50; 12%), Parque Massairo Okamura (2/77; 3%) e Zoológico UFMT (1/49; 2%), Figura 17.

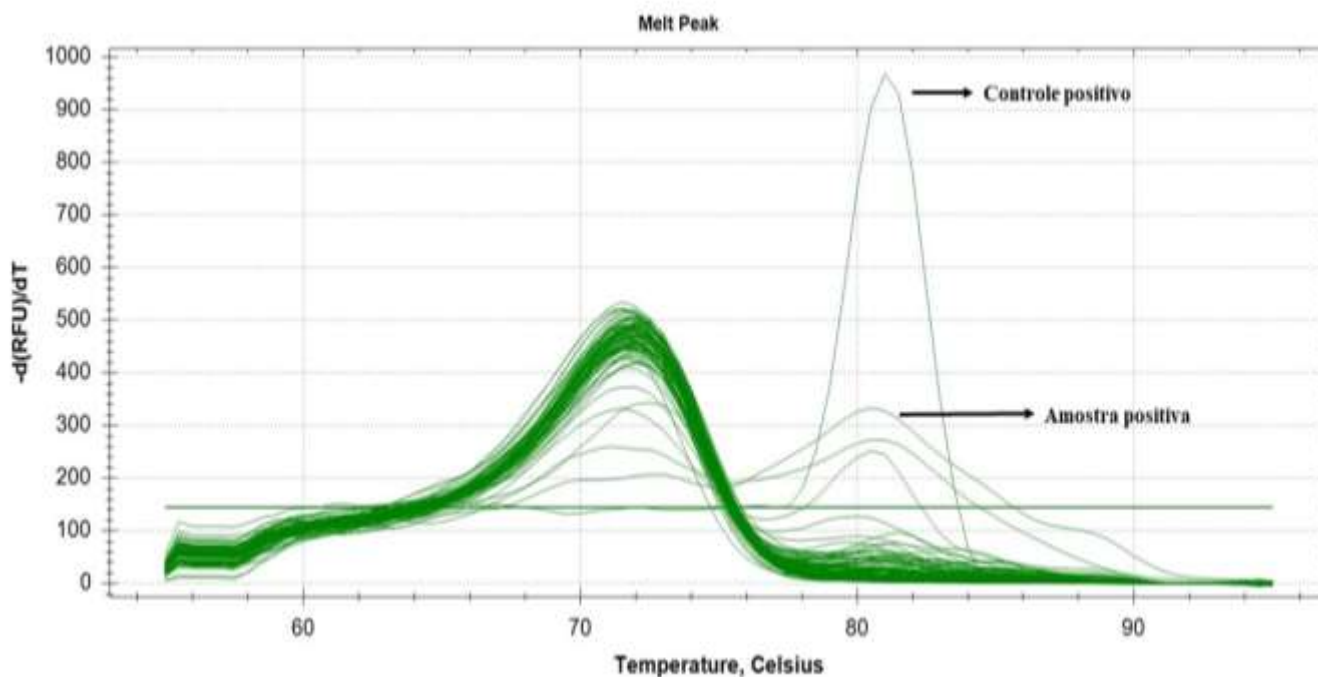


Figura 17: Gráfico da curva de dissociação da RT-PCR em tempo real para detecção de flavivírus, demonstrando o controle positivo e três amostras positivas. Em 43 amostras foi observado amplificação segundos os critérios adotados.

Dentre o total de amostras positivas, a distribuição da classe taxonômica foi de 53,4% (n=23) anfíbios, 2% (n=18) répteis e 4,6% (n=2) mamíferos. Considerando a divisão por sítio, Cuiabá apresentou 23 (53,5%) anfíbios, 2 (4,7%) mamíferos e 1 réptil (2,3%) positivo. Já nas amostras de Campo Grande, 17 (39,5%) anfíbios foram positivos.

Dentre o grupo dos positivos na triagem, a espécie com maior número de indivíduos positivos foi *Rhinella schneideri* (12/65), seguida de *Crotalus durissus* (10/48), *Rhinella marina* (6/24), *Bothrops*

moojeni (6/37), *Leptodactylus labyrinthicus* (5/11), *Carollia perspicillata* (2/36), *Bothrops mattogrossensis* (1/11) e *Trachemys dorbigni* (1/11) (Figuras 18 e 19).

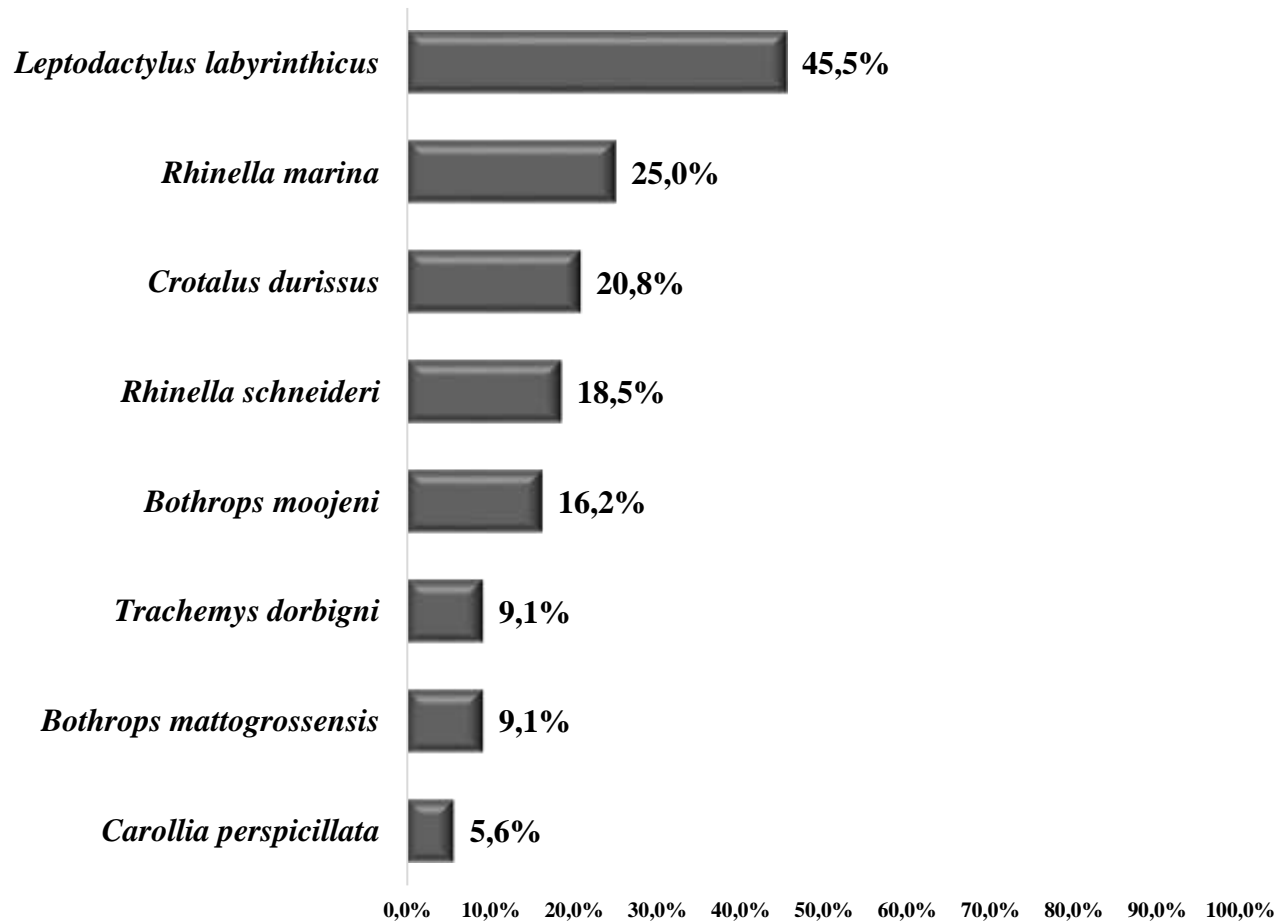


Figura 18: Distribuição das espécies no grupo de amostras positivas por RT-PCR em tempo real para detecção de flavivírus provenientes do Centro-oeste.



Figura 19: Espécies com indivíduos RT-PCR positivos para o grupo flavivírus. (A) *Rhinella schneideri*; (B) *Crotalus durissus*; (C) *Rhinella marina*; (D) *Leptodactylus labyrinthicus*; (E) *Trachemys dorbignii*; (F) *Bothrops moojeni*; (G) *Bothrops mattogrossensis*; (H) *Carollia perspicillata*. Fonte: Google, 2018.

5.3 Detecção do ZIKV por RT-PCR em tempo real

As 43 amostras RT-PCR positivas na triagem para detecção do grupo flavivírus foram submetidas à RT-PCR em tempo real específica para detecção de RNA do ZIKV. Nenhuma amostra mostrou-se positiva nos ensaios realizados.

5.4 Sequenciamento nucleotídico

As 43 amostras reativas por RT-PCR em tempo real para flavivírus e negativas para ZIKV foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger para confirmação da presença de genoma de flavivírus. As sequências geradas não apresentaram homologia às sequências de flavivírus disponíveis no banco de dados internacional. Algumas sequências apresentaram homologia a sequências de genes endógenos dos hospedeiros, sugerindo inespecificidade (Figura 20).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
272 bits(147)	4e-69	159/165(96%)	0/165(0%)	Plus/Plus
Query 25	AGCTGTGGACTGCCTTTTGGATTCTAAGTGGGCAAAGGCTAAGAAAGGAGAAAAAGCTCT			84
Sbjct 180	AGCTGTGGACTGCCTTTTGGATTCTAAGTGGGCAAAGGCCAAGAAGGGAGAAGAAGCTCT			239
Query 85	GTTTACAACCTCGAGAGTCAATAGTGGATTATTGTAACAACTTCTAAAGAAACAGTTTTT			144
Sbjct 240	GTTTACAACCTCGAGAATCAATAGTGGATTATTGTAACAGACTTCTAAAGAAACAGTTTTT			299
Query 145	TCACCGAGCACTAAAAGTGATGAAAATGAAACCTGACAAGGACAC		189	
Sbjct 300	TCACCGAGCACTAAAAGTGATGAAAATGAAACCCGACAAGGACAC		344	

Figura 20: Alinhamento da sequência amplificada da amostra positiva AG0459 (*Bothropos matto grossensis*) com *Protobothrops mucrosquamatus* SEC62 homolog, preprotein translocation factor (SEC62), mRNA. Nota-se que a sequência amplificada tem alta identidade com um gene de uma espécie de víbora pertencente a ordem Squamata.

5.5 PRNT₉₀ para ZIKV

Foram submetidas ao PRNT₉₀ para ZIKV, amostras de plasmas de 174 (25,4%) indivíduos, sendo 112 (64,4%) da região metropolitana de Campo Grande e 62 (35,6%) de Cuiabá (Quadro 04). As amostras elencadas para a triagem são referentes às 1ª e 2ª campanhas, realizadas em março e julho de 2017. Os animais capturados nas 3ª e 4ª campanhas ainda não foram submetidos a triagem inicial para ZIKV por PRNT na diluição 1:10.

Quadro 04: Distribuição das espécies submetidas a PRNT₉₀ para ZIKV.

Sítio	Espécie	N	Sororreatividade
Região Metropolitana de Campo Grande	<i>Bothrops alternatus</i>	5	0
	<i>Bothrops matogrossensis</i>	1	0
	<i>Bothrops moojeni</i>	5	0
	<i>Carollia perspicillata</i>	3	0
	<i>Crotalus durissus</i>	21	0
	<i>Didelphis albiventris</i>	4	0
	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	12	3 (25%)
	<i>Nasua nasua</i>	35	1 (2,%)
	<i>Phrynops geoffroanus</i>	16	0
	<i>Sapajus cay</i>	10	1 (10%)
Região Metropolitana de Cuiabá	<i>Artibeus lituratus</i>	13	0
	<i>Artibeus planirostris</i>	3	1 (33,3%)
	<i>Caiman yacare</i>	24	0
	<i>Didelphis albiventris</i>	17	1 (5,9%)
	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	1	0
	<i>Mico melanurus</i>	1	0
	<i>Nasua nasua</i>	2	0
	<i>Rhinella marina</i>	1	0
Total	174	7 (4,2%)	

Das 174 amostras de plasma submetidas ao PRNT₉₀, 20 (11,5%) foram consideradas soropositivas (título de PRNT₉₀ ≥ 1:10) e 154 (88,5%) foram consideradas soronegativas (<1:10).

As amostras consideradas soropositivas (título de PRNT₉₀ ≥ 1:10) na triagem (N = 20) foram submetidas a um novo PRNT₉₀ para ZIKV, desta vez em duplicatas com diluições de 1:10 até 1:320. Das 20 amostras soropositivas na triagem em diluição única, 13 (65%) não confirmaram soropositividade, apresentando título de PRNT₉₀ <1:10 no segundo ensaio e foram consideradas soronegativas. Das sete

amostras que se confirmaram soropositivas (título de PRNT₉₀ ≥1:10), 4 (57,1%) apresentaram título de PRNT₉₀ 1:10, uma (14,3%) 1:20, uma (14,3%) 1:160 e uma (14,3%) apresentou título de PRNT₉₀ ≥1:320. Essa última amostra foi então submetida a um terceiro ensaio em duplicata com diluições seriadas de 1:10 até 1:20480 apresentando título de PRNT₉₀ 1:2560, Ao final, das 174 amostras de plasma testadas, sete (4,2%) apresentaram anticorpos neutralizantes para ZIKV (Figura 21).

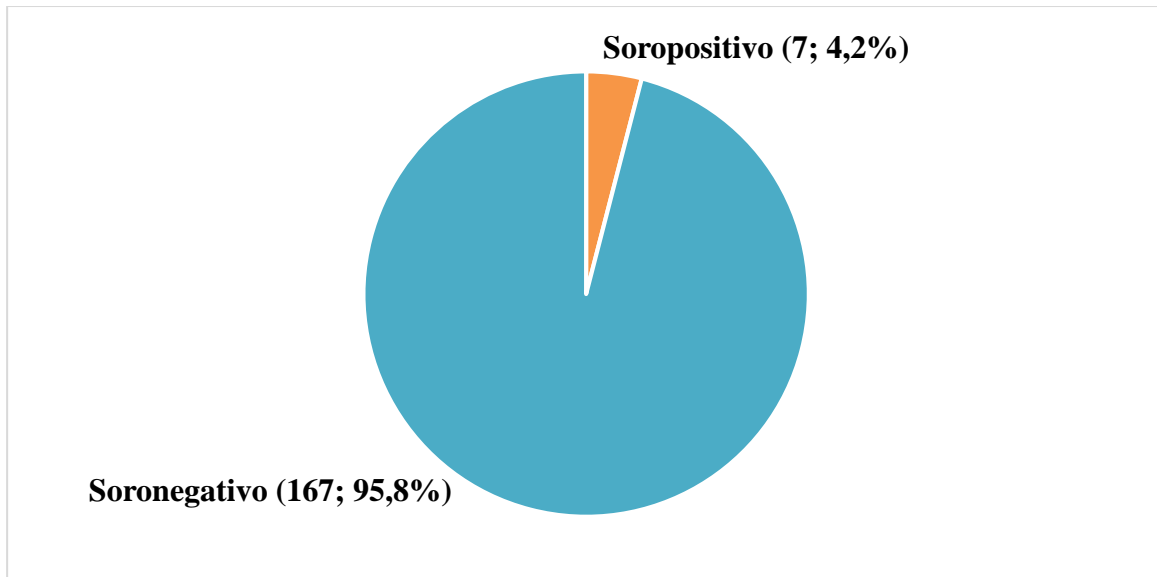


Figura 21: Soropositividade por PRNT₉₀ para ZIKV dos animais silvestres capturados nas áreas metropolitanas de Campo Grande e Cuiabá.

Dentre as amostras soropositivas, os subsítios com maior número de animais soropositivos foram o Campus UFMS (MS) com três (n=29; 10,3%) amostras soropositivas, seguido do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (MS) com uma amostra (n=10; 10%), Parque Massairo Okamura (MT) com uma amostra (n=15; 6,7%), Hotel Fazenda Mato Grosso (MT) (n=17; 5,9%) e Parque Estadual do Prosa (MS) (n=39; 2,6%) (Figura 22).

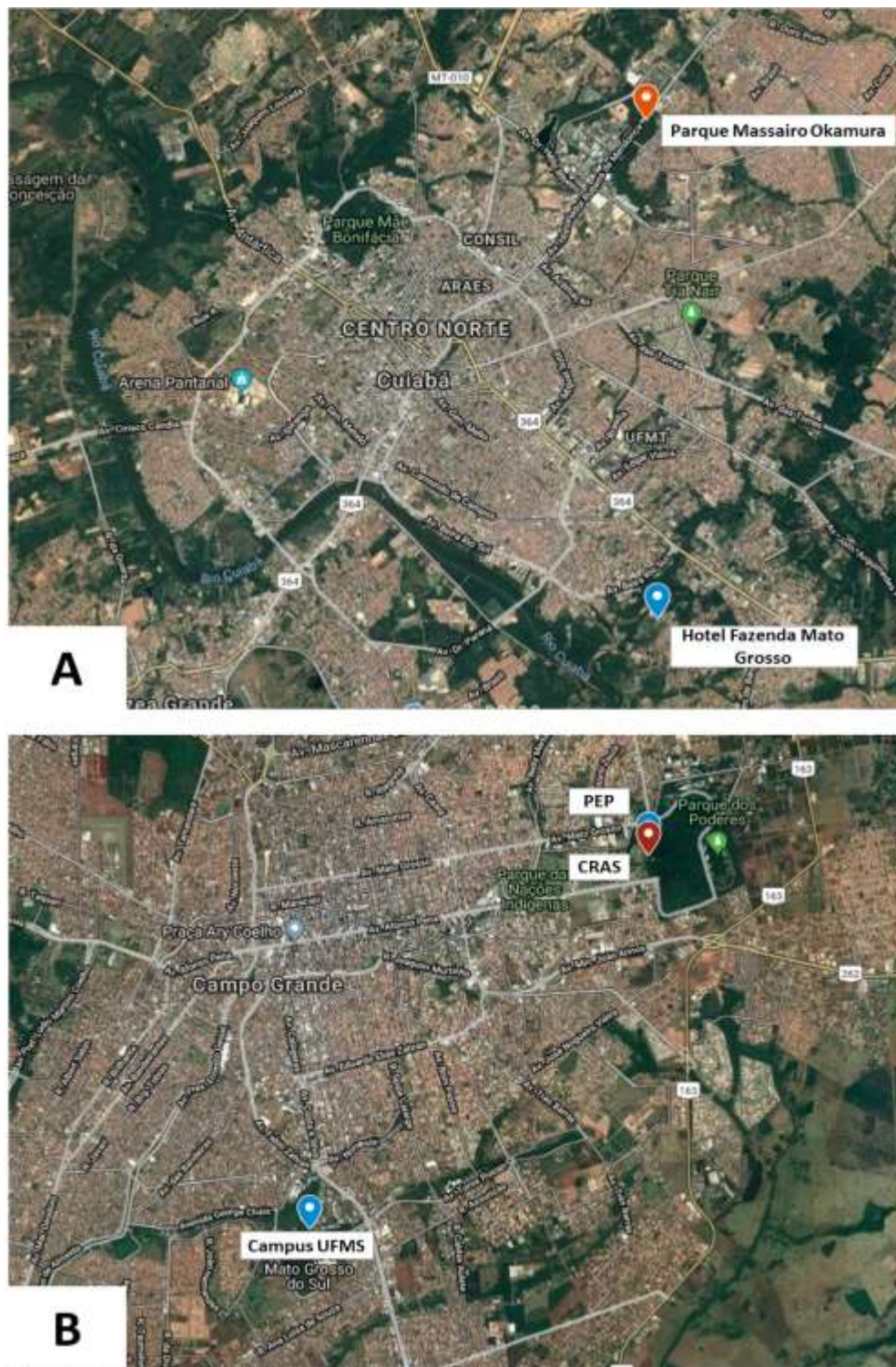


Figura 22: Subsítios amostrados com detecção de amostras soropositivas. (A) Subsítios na região metropolitana de Cuiabá, MT; (B) Subsítios na região metropolitana de Campo Grande, MS.

Em relação às espécies soropositivas, três (25%; n=12) foram capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), um (33,3%; n=3) morcego (*Artibeus planirostris*), um (2,7%; n=37) quati (*Nasua nasua*), um (100%; n=1) primata (*sapajus cay*) e um (4,7%; n=21) gambá (*Didelphis albiventris*) (Quadro 05, Figura23).

Quadro 05: Amostras de animais silvestres de áreas metropolitanas de Campo Grande e Cuiabá soropositivas para ZIKV.

Código das amostras	Título	Sítio	Espécie	Subsítio	Idade	Sexo
AEU042	1:2560	Cuiabá	<i>Artibeus planirostris</i>	Hotel fazenda Mato Grosso	Adulto	Macho
AU0485	1:20	Cuiabá	<i>Didelphis albiventris</i>	Parque Massairo Okamura	Adulto	Macho
AG0185	1:10	Campo Grande	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Campus UFMS	Adulto	Macho
AG0417	1:10	Campo Grande	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Campus UFMS	Adulto	Fêmea
AG0419	1:10	Campo Grande	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Campus UFMS	Adulto	Macho
AG0186	1:10	Campo Grande	<i>Nasua nasua</i>	Parque Estadual do Prosa	Subadulto	S.R
AG0297	1:160	Campo Grande	<i>Sapajus cay</i>	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres	Adulto	Fêmea

SR: Sem registro

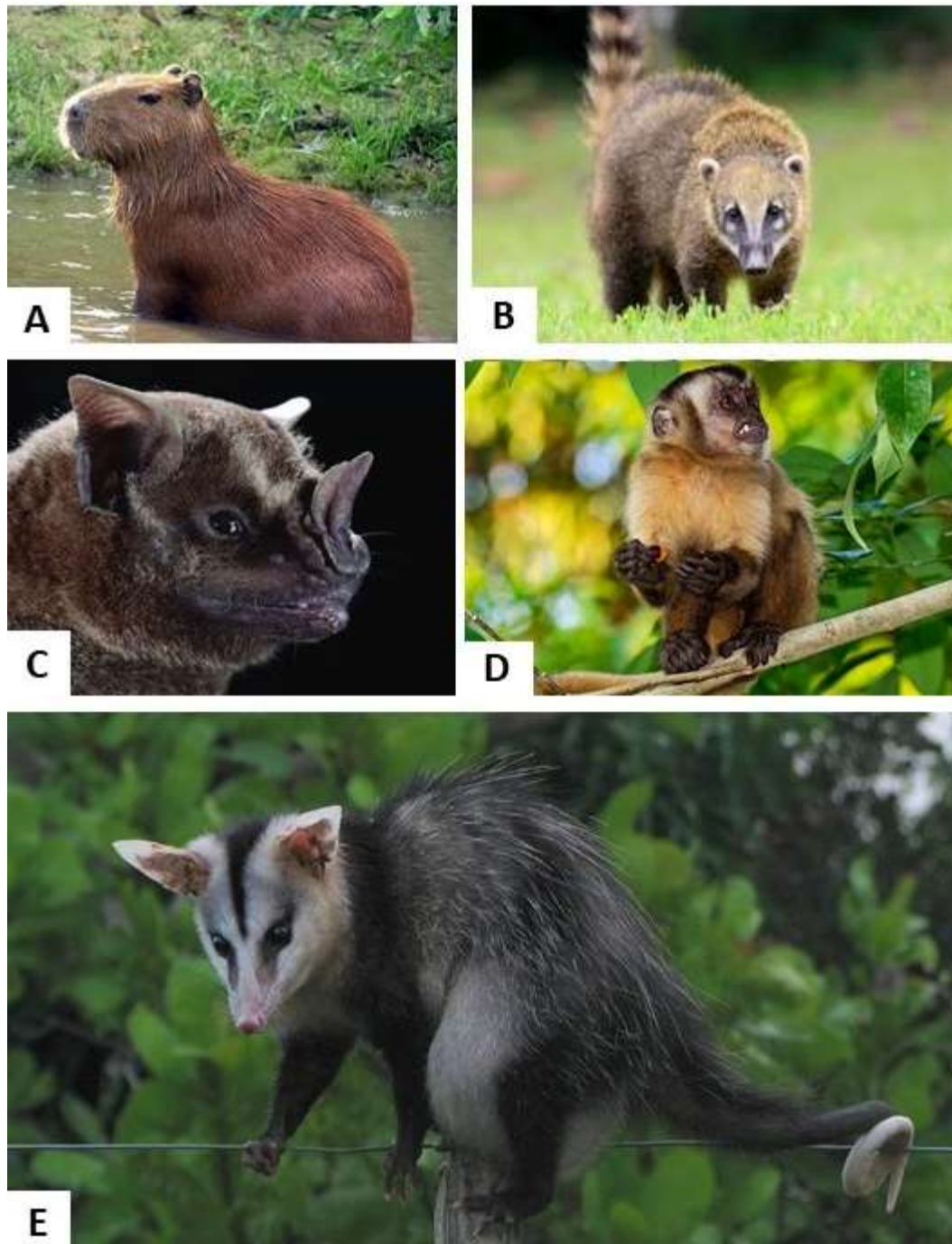


Figura 23: Espécies com indivíduos soropositivos no PRNT₉₀. (A) *Hydrochoerus hydrochaeris*; (B) *Nasua nasua*; (C) *Artibeus planirostris*; (D) *Sapajus cay*; (E) *Didelphis albiventris*. Fonte: Google, 2018.

No grupo dos soropositivos, de acordo com a idade, seis (85,7%) animais eram adultos e um (14,3%) subadulto. Em relação ao sexo, quatro (57,1%) eram machos, dois (28,6%) fêmeas e um (14,3%) sem registro.

Do total de 19 amostras de morcegos testadas, incluindo três espécies, *Artibeus lituratus* (n=13), *Carollia perspicillata* (n=3) e *Artibeus planirostris* (n=3), uma (código AEU042, *A. planirostris*) foi considerada soropositiva com alto título de 1: 2560 (Figura 24).

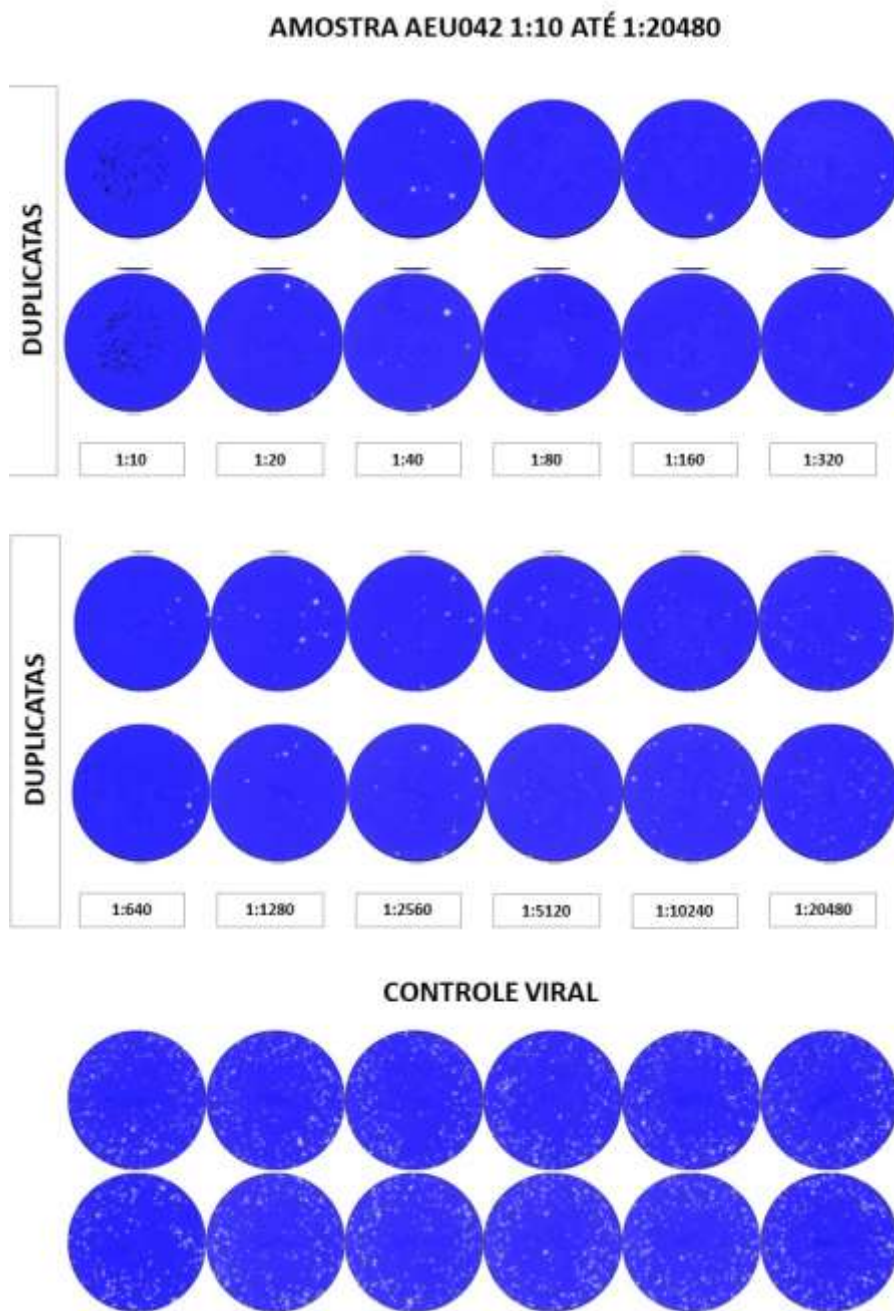


Figura 24: PRNT₉₀ para ZIKV com a amostra do plasma do morcego da espécie *Artibeus planirostris* (código AU042) em 12 diluições (1:10 até 1:20480). O título de PRNT₉₀ para ZIKV desta amostra foi de 1:2560. O controle viral demonstra as placas de lise na monocamada celular. Fonte: Emily Miranda.

6. DISCUSSÃO

Já foi reportada no Brasil a circulação de doze flavivírus de interesse médico, além de outras espécies sem registro de infecções em humanos. No entanto, pouco se sabe sobre os hospedeiros vertebrados que participam da manutenção desses vírus em natureza. Alguns estudos têm contribuído para este entendimento, mas ainda são incipientes diante da complexidade dos ciclos de transmissão e da escassez de informação (Karabatsos, 1985; Vasconcelos *et al.*, 1989; Kuno *et al.*, 2017).

No presente estudo, investigamos a presença de infecção por flavivírus em amostras de animais silvestres, incluindo mamíferos, répteis e anfíbios de MT e MS entre 2016 e 2017. Estudo recente de Moreira-Soto e colaboradores (2018) analisou amostras de PNH nas regiões nordeste e centro-oeste do Brasil, visando à detecção de flavivírus, empregando o mesmo protocolo molecular utilizado neste estudo, porém nenhuma amostra foi positiva. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, em que dos 59 primatas testados (*Sapajus cay*, n=11; *Mico melanurus*, n=48), nenhum apresentou RNA de flavivírus. Esses resultados não são surpreendentes, uma vez que para detecção de infecção aguda de flavivírus seria necessária a coleta de amostra de sangue durante o período virêmico, que normalmente é fulgaz mesmo nos hospedeiros amplificadores. Além disso, muitos desses animais poderiam participar apenas como hospedeiros terminais em ciclos abortivos de transmissão, apresentando uma viremia ainda mais curta e com baixa carga viral tornando ainda mais difícil a detecção de RNA viral na corrente sanguínea.

Todavia, apesar dos resultados negativos reportados aqui e por Moreira-Soto e colaboradores (2018), dois estudos realizados no Brasil detectaram RNA de ZIKV em PNH, sugerindo exposição de PNH neotropicais ao ZIKV e potencial para estabelecimento de um ciclo enzootico de transmissão no país (Favoretto *et al.*, 2016; Terzian *et al.*, 2018). Além disso, infecções experimentais com ZIKV em PNH do novo mundo suportam a hipótese de que este grupo de animais reproduzem as alterações patológicas identificadas em humanos e, assim poderiam atuar como hospedeiros amplificadores em natureza (Chiu *et al.*, 2017; Vanchiere *et al.*, 2018; Seferovic *et al.*, 2018).

Considerando os critérios de detecção adotados na RT-PCR em tempo real para flavivírus, 43 amostras foram consideradas positivas. No entanto, o sequenciamento nucleotídico revelou se tratarem de reações inespecíficas. O posterior alinhamento dos iniciadores no BLAST evidenciou que os mesmos também hibridizam em regiões inespecíficas de DNA endógeno. Esta ligação inespecífica pode ter ocorrido em virtude da presença de nucleotídeos degenerados na sequência dos iniciadores.

Em virtude da não utilização de uma sonda, o sistema SYBR green apresenta menor especificidade, quando comparado com outros sistemas que utilizam sonda, como por exemplo o sistema TaqMan. Em contrapartida, o SYBR apresenta alta sensibilidade, característica desejada em protocolos utilizados como triagem (Yang *et al.*, 2010; Romeiro *et al.*, 2016a, Romeiro *et al.*, 2016b; Vina-Rodriguez *et al.*, 2017). Essa alta sensibilidade e menor especificidade pode ter influenciado os resultados encontrados. Uma vez que de 43 amostras positivas na triagem por SYBR, nenhuma se confirmou positiva para flavivirus.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados foi o tipo de espécime utilizado. Amostras de sangue total são ricas em ácido nucléico celular o que pode ter facilitado a ligação inespecífica dos primers ao DNA endógeno da amostra. No presente estudo, algumas amostras positivas no SYBR para flavivirus apresentaram sequências nucleotídicas de alta similaridade com DNA de vertebrados. Talvez em virtude disso, 95,3% (41/43) das amostras positivas no SYBR para flavivirus eram de anfíbios e répteis, grupos que apresentam hemácias nucleadas e consequentemente amostras ainda mais ricas em material genético.

Optou-se por utilizar o protocolo de detecção descrito por Moreau e colaboradores (2007) pela preferência de um protocolo com alta sensibilidade, com o intuito de detectar um maior número de flavivírus e pela descrição prévia de detecção de flavivírus ainda desconhecidos da ciência com este mesmo protocolo. É oportuno destacar que o NHUV foi identificado no Pantanal a partir do pool de *Cx. chidesteri* com base na detecção pelo mesmo protocolo utilizado no presente trabalho e que o sequenciamento nucleotídico revelou se tratar de um novo flavivírus, indicando que o protocolo é eficiente para os objetivos propostos (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2015).

A detecção ou não de infecção aguda por ZIKV e outros flavivírus em primatas pode estar de fato estar relacionada ao curto período de viremia. Neste caso, técnicas sorológicas de pesquisa de anticorpos talvez se apresentem como uma valiosa ferramenta, uma vez que teriam a capacidade de evidenciar infecções passadas. Moreira-Soto e colaboradores (2018) detectaram anticorpos neutralizantes para ZIKV por PRNT₉₀ em PNH das regiões nordeste e centro-oeste do Brasil. Apesar dos baixos títulos de anticorpos (1:40), indivíduos das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae foram soropositivos.

O presente estudo corrobora parte desses resultados, uma vez que um cebídeo da espécie *Sapajus cay*, popularmente conhecida como macaco-prego, capturado no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres em 2017, foi soropositivo com título de PRNT₉₀ de 1:160.

Infecções experimentais com ZIKV também vêm sendo realizadas em diferentes grupos taxonômicos, incluindo espécies silvestres e domésticas. Estudo recente investigou a capacidade de amplificação de ZIKV de diferentes espécies da América do Norte, incluindo cobras, tatus e sapos, cabras, suínos, gado, pato, galinhas e coelhos. Após infecção experimental, ZIKV foi isolado de tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e rã-leopardo (*Lithobates* sp.) sugerindo viremia por ZIKV nessas espécies. Além disso, anticorpos neutralizantes anti-ZIKV puderam ser detectados em cabras, coelhos, patos, rãs e porcos (Ragan *et al.*, 2017). Desta forma, além dos animais silvestres, deve-se considerar outros potenciais hospedeiros susceptíveis, amplificadores ou não, como por exemplo, os animais domésticos, e os seus papéis na manutenção do ZIKV no contexto urbano e silvestre, analisando o nicho ecológico de cada um (Yasri e Wiwanitkit, 2017).

Em outro estudo realizado no Brasil, Bittar e colaboradores (2018) realizaram investigação de flavivírus em morcegos, incluindo as espécies *A. planirostris*, *A. lituratus* e *C. perspicillata*, as mesmas que compõem a casuística da presente dissertação, em áreas densamente povoadas de SP e BA e os resultados foram concordantes com os dados do presente estudo, uma vez que das 132 amostras de sangue de cinco espécies de morcegos testadas (*A. planirostris*, n=38; *A. lituratus*, n=37; *C. perspicillata*, n=36; *M. molossus*, n=12; *P. lineatus*, n=9), todas foram negativas para RNA de ZIKV. No entanto, em nosso estudo uma amostra de plasma de um espécime de morcego da espécie *Artibeus planirostris* (código AEU042) apresentou alto título de anticorpos por PRNT₉₀ para ZIKV de 1:2560, sugerindo potencial exposição do indivíduo para ZIKV. Todavia, apesar do PRNT₉₀ ser considerada a técnica mais específica para o diagnóstico sorológico de infecção por flavivírus, reações cruzadas são comumente observadas no grupo e por isso novos estudos estão em andamento, como a realização de PRNT₉₀ para outros flavivírus, para descartar potencial reação heteróloga.

A detecção de alto título de anticorpos neutralizantes para ZIKV em um morcego capturado na região de Cuiabá deve ser motivo de atenção, uma vez que morcegos são considerados um importante grupo amplificador e dispersor de arbovírus, incluindo os flavivírus. Os vírus Saboya, vírus Uganda, vírus Yokose e o vírus da encefalite japonesa já foram isolados de diferentes espécies de quirópteros na África e Ásia (Kading e Schountz, 2016).

Apesar da ausência de detecção viral nas amostras testadas, as evidências sorológicas reportadas no presente estudo são achados importantes. Evidências sorológicas eventuais reportadas em investigações ativas podem indicar precocemente a circulação viral durante períodos de baixa circulação viral em ausência de epidemias e epizootias. A primeira evidência sorológica da circulação do WNV no Brasil, por exemplo, foi reportada a partir da detecção de anticorpos

neutralizantes anti-WNV em soro de cavalos no Pantanal de MS em 2011 (Pauvolid-Correa *et al.*, 2011). Sete anos mais tarde, WNV foi isolado a partir do tecido cerebral de cavalos com desordem neurológica no ES (Martins *et al.*, 2018). Desta forma, estudos de investigação ativa como descrito no presente estudo devem ser incentivados.

O presente trabalho analisou um total de 174 amostras de plasma por PRNT₉₀ para ZIKV, resultando na detecção de 7 (4%) amostras soropositivas. Cinco espécies compõem o grupo dos soropositivos, sendo três (n=22) capivaras, um (n=3) morcego, um (n=37) quati, um (n=21) gambá e um (n=1) PNH. As evidências sorológicas encontradas para a circulação do ZIKV nas populações estudadas sugerem exposição desses hospedeiros ao ZIKV. Ressalta-se que apesar da utilização de uma técnica altamente específica e do critério de soropositividade conservador, outros onze flavivírus antigenicamente relacionados circulam no Brasil e por isso testes adicionais estão em andamento para confirmação de reações monotípicas.

A detecção de anticorpos neutralizantes para ZIKV em populações de capivaras, morcegos, gambás e quatis são a primeira evidência sorológica da circulação do ZIKV nessas espécies no Brasil. No continente africano, onde ZIKV foi originalmente isolado, outros grupos taxonômicos também já foram encontrados naturalmente infectados pelo ZIKV, como carnívoros, artiodáctilos, anseriformes, roedores e também quirópteros (Bueno *et al.*, 2016).

A localização dos sítios e subsítios elencados para a realização da captura dos animais, todos situados dentro das áreas metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande, reforça o papel deste trabalho em pesquisar a circulação de flavivírus na casuística. Os parques florestais urbanos e demais subsítios, como os *campi* da UFMS e UFMT, o hotel fazenda Mato Grosso e o zoológico da UFMT, recebem milhares de pessoas por dia, incluindo visitantes, funcionários e estudantes, todos expostos a uma densa população de vetores (Cruz *et al.*, 2015; Serra *et al.*, 2016).

Os animais silvestres, incluindo principalmente os marsupiais, capivaras e morcegos são reservatórios de diversos agentes zoonóticos. Adicionalmente, dada a incidência e morbidade das doenças provocadas por flavivírus, o diagnóstico e investigação precoce nestes grupos de animais tornam-se cada vez mais relevante, visto que as populações desses animais convivem em proximidade com os humanos (de Albuquerque *et al.*, 2017; Bittar *et al.*, 2018).

A manifestação epizootica de um grande número de arboviroses está relacionada com fatores ambientais, como padrões climáticos, densidade populacional de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, e artrópodes vetores (Vasconcelos *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2017; Mackenzie *et al.*, 2017).

Apesar da expressiva redução da incidência da infecção pelo ZIKV nos últimos dois anos (Brasil, 2017, 2018), acredita-se que o vírus tenha potencial para se manter circulando em ciclos enzoóticos silenciosos no país, como se observa com o YFV, com eventuais reemergências resultando em epidemias (Brasil, 2018). Como observado para o DENV, a massiva epidemia da febre do zika pode ter produzido uma grande parcela da população imunizada pela primo-infecção. A recrudescência da circulação viria quando uma nova parcela da população estiver susceptível, gerando uma nova onda epidêmica. Nos períodos interepidêmicos, o vírus ficaria sendo mantido em ciclos inaparentes de circulação em espécies de vertebrados e invertebrados (Kuno *et al.*, 2017).

O Brasil apresenta território vasto e de dimensões continentais, com aproximadamente 8.516.000 km² divididos em cinco macroregiões: Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Os biomas Pampa, Mata Atlântica, Serrado, Caatinga, Amazônia e Pantanal constituem a grandiosa diversidade biológica brasileira. O cerrado, bioma predominante na região do presente estudo, sofre um profundo processo de desmatamento e perda de áreas virgens, principalmente em face à intensa pressão agropecuária e imobiliária (Sano *et al.*, 2008; Bonilla-Bedoya *et al.*, 2018). Os grandes parques com áreas verdes nas capitais Cuiabá e Campo Grande são, na verdade, de administração estadual e apresentam um plano de conservação e criação de espaços para o lazer da população. Portanto, há íntima relação entre a redução de áreas verdes, com frequente interferência na dinâmica ecológica, expondo a população a agentes de circulação enzoótica e potencialmente zoonóticos (Ulisses *et al.*, 2014; Romero-Alvarez & Escobar, 2017).

É pertinente reforçar a grande diversidade de artrópodes vetores, em especial os culicídeos, no Brasil. Estima-se que 470 espécies de *Culicidae* tenham sido identificadas no país, entre silvestres e antrópicas. Uma parcela significativa, no entanto, seja de invertebrados ou vertebrados, ainda permanece desconhecida e intocada no interior das matas virgens, aumentando a complexidade da ecoepidemiologia das arbovirose no Brasil (Guedes, 2012).

Já foram isolados de animais e artrópodes vetores centenas de vírus e, desde sua criação em 1936, à época Instituto de Patologia Experimental do Norte, o Instituto Evandro Chagas (IEC) já catalogou mais de 210 novas espécies de vírus, a maioria na região amazônica (Causey *et al.*, 1961; Pinheiro *et al.*, 1962; Shope *et al.*, 1966; Travassos da Rosa *et al.*, 1998; Casseb *et al.*, 2013, 2015; IEC, 2018).

Além da região Amazônica, arbovírus de circulação enzoótica vêm sendo detectados em diferentes regiões do Brasil. Na região do Pantanal de MS já foram detectadas evidências da

circulação de dezenas de arbovírus em animais, incluindo flavivírus, alfavírus e ortobuniavírus (Pauvolid-Correa *et al.*, 2010, 2013, 2015, 2017). Esses achados sugerem a Região Centro-Oeste como também uma importante área de circulação de arbovírus em ciclos silvestres no país

Dentre as centenas de arbovírus que circulam no Brasil, cerca de 30 espécies têm potencial de causar doença em humanos. Além dos arbovírus de importância médica já circulantes no país, como DENV, YFV, ZIKV e CHIKV, destacam-se ainda os MAYV e OROV pelos recentes surtos em áreas urbanas, pela circulação silenciosa em diferentes regiões do país e pelo potencial de emergência (Lopes, Nozawa e Linhares, 2014; Donalisio, Freitas e Zuben, 2017; Weaver *et al.*, 2017).

Como visto para a febre amarela, em que a circulação do vírus foi detectada em parques urbanos de São Paulo, provocando a interdição temporária dos mesmos e levantando o alerta de que essas áreas verdes poderiam atuar como potenciais sítios de manutenção e dispersão do YFV, o mesmo pode ocorrer com outros flavivírus. A presença de potenciais vetores do YFV, como *Haemagogus leucocelaenus* e *Ae aegypti*, em parques florestais na cidade de São Paulo reforçaram a preocupação no papel destas áreas na manutenção viral (Mucci *et al.*, 2016; Heinisch *et al.*, 2018).

A exceção do vírus da febre amarela, eventualmente detectado em primatas não humanos durante epizootias no Brasil, a circulação dos outros 11 flavivírus de interesse em saúde pública em outros mamíferos silvestres de vida livre no país é ainda pouco conhecida. Desta forma, estudos de investigação ativa como descrito no presente trabalho visando a detecção precoce da circulação silenciosa de arbovírus patogênicos, antecedendo a ocorrência de epizootias e casos humanos contribuem para a vigilância do país e devem ser incentivados. Adicionalmente, este estudo, mesmo com resultados moleculares negativos, contribui com dados epidemiológicos sobre a não circulação de flavivírus na casuística durante o período de amostragem.

Por outro lado, a detecção de animais silvestres soropositivos sugere que esses hospedeiros possam ter sido expostos ao ZIKV. Os testes de sorologia iniciais foram realizados somente para a pesquisa de anticorpos neutralizantes para o ZIKV, entretando, está em andamento a realização de PRNT₉₀ para as outras onze espécies de flavivírus que circulam no Brasil, com um critério de positividade a diferença de quatro vezes entre os títulos de anticorpos para todos os flavivírus testados, evidenciando reações monotípicas e heterotípicas.

7. CONCLUSÕES

- A estratégia de coleta de mamíferos silvestres utilizada no estudo foi bem-sucedida e permitiu a captura de vinte diferentes espécies de interesse para a investigação de flavivirus;
- Não foi possível a detecção de ZIKV e outros flavivírus em amostras sanguíneas de vertebrados testadas de áreas urbanas de Cuiabá e Campo Grande.
- A evidência de animais silvestres soropositivos para ZIKV por PRNT₉₀ em regiões metropolitanas de Cuiabá e Campo Grande pode indicar potencial exposição de animais silvestres ao ZIKV. No entanto, testes adicionais deverão ser realizados para descartar reações cruzadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abundes-Gallegos J, Salas-Rojas M, Galvez-Romero G, Perea-Martinez L, Obregon-Morales CY, Morales-Malacara JB, et al. Detection of Dengue Virus in Bat Flies (Diptera: Streblidae) of Common Vampire Bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. Vector borne and zoonotic diseases. 2018;18(1):70-3.
2. Aitken TH, Spence L, Jonkers AH, Downs WG. A 10-year survey of Trinidadian arthropods for natural virus infections (1953-1963). *Journal of medical entomology*. 1969;6(2):207-15.
3. Almeida MA, Cardoso JdC, dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJ, et al. Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in Southern Brazil, 2001–2011: A tool for prioritizing human populations for vaccination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3):e2741. pmid:24625681
4. Althouse BM, Vasilakis N, Sall AA, Diallo M, Weaver SC, Hanley KA. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005055.
5. Alves LM. Clima da região centro-oeste do Brasil. *Tempo e Clima no Brasil*. São Paulo: Oficina de Textos. 2009; p. 235.
6. Anderson CR, Downs WG, Wattley GH, Ahin NW, Reese AA. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1957;6(6):1012-6.
7. Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken TH. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1961;10:574-8.
8. Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR. Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):670-4.
9. Anthony ELP. Age determination in bats. In: KUNZ, T. H. ed. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Washington, Smithsonian Institution. 1988. p.47-58.
10. Azevedo RS, Nunes MR, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY, et al. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(6):912-5.
11. Azevedo RS, Silva EV, Carvalho VL, Rodrigues SG, Nunes-Neto JP, Monteiro H, et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(11):1830-2.

12. Bailey CL, Eldridge BF, Hayes DE, Watts DM, Tammariello RF, Dalrymple JM. Isolation of St. Louis encephalitis virus from overwintering *Culex pipiens* mosquitoes. *Science*. 1978;199(4335):1346-9.
13. Batista PM, Andreotti R, Chiang JO, Ferreira MS, Vasconcelos PF. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(2):168-73.
14. Batista WC, Tavares Gda S, Vieira DS, Honda ER, Pereira SS, Tada MS. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondonia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44(4):528-30.
15. Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1956;50(5):442-8.
16. Belle EA, Grant LS, Page WA. The Isolation of St. Louis Encephalitis Virus from *Culex Nigrlpalpus* Mosquitoes in Jamaica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1964;13:452-4.
17. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of West Nile virus in Israel. *The Journal of infectious diseases*. 1953;93(3):207-18.
18. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February. *Euro Surveill*. 2014;19(13).
19. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
20. Bittar C, Machado RRG, Comelis MT, Bueno LM, Morielle-Versute E, Beguelini MR, et al. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. *PloS one*. 2018;13(11):e0207010.
21. Bocato-Chamelet EL, Coimbra, T. L. M., Nassar, E. D. S., Pereira, L. E., Ferreira, I. B., Souza, L. T. M. D., & Suzuki, A. Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Jucituba-Estado de São Paulo-Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001:65-9.
22. Bonilla-Bedoya S, Estrella-Bastidas A, Molina JR, Herrera MÁ. Socioecological system and potential deforestation in Western Amazon forest landscapes. *Sci Total Environ*. jul 2018.
23. Brasil. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. In: Saúde SdVeSMd, editor. 2017.

24. Brasil. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus zika até a semana epidemiológica 51, 2015. . In: Saúde. SdVeSMd, editor. 2016.
25. Brasil. Decreto no 7.616 de 17 de novembro de 2011. In: Saúde Md, editor. 2011.
26. Brasil. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de galinhos/rn para detecção do vírus da febre do nilo ocidental e outros vírus. Ano 04. In: Saúde SdVe, editor. 2004.
27. Brasil. Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos. Série A. Normas e Manuais Técnicos. In: Epidemiológica MdSSdVeSDdV, editor. Brasília2005. p. 56.
28. Brasil. Primeiro inquérito sorológico em aves migratórias e nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo Ocidental. Ano 03. In: Saúde SdVe, editor. 2003.
29. Brunini S, Franca DDS, Silva JB, Silva LN, Silva FPA, Spadoni M, et al. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(6):1025-6.
30. Buechler CR, Bailey AL, Weiler AM, Barry GL, Breitbach ME, Stewart LM, et al. Seroprevalence of Zika Virus in Wild African Green Monkeys and Baboons. *mSphere*. 2017;2(2).
31. Bueno MG, Martinez N, Abdalla L, Duarte Dos Santos CN, Chame M. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(12):e0005073.
32. Calisher CH, Coimbra TL, Lopez Ode S, Muth DJ, Sacchetta Lde A, Franczy DB, et al. Identification of new Guama and Group C serogroup bunyaviruses and an ungrouped virus from Southern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(2):424-31.
33. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(6):653-60.
34. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(10):1885-6.
35. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(6):1085-6.
36. Cardoso CW, Kikuti M, Prates AP, Paploski IA, Tauro LB, Silva MM, et al. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(1):e0005334.
37. Carvalho S, Magalhaes M, Medronho RA. Analysis of the spatial distribution of dengue cases in the city of Rio de Janeiro, 2011 and 2012. *Revista de saude publica*. 2017;51:79.
38. Casals J. Arboviruses. *American journal of clinical pathology*. 1972; 57(6), 762-770.

39. Casseb AR CL, Silva SP, Vasconcelos PFC. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. *Veterinária e Zootecnia*. 2013;20(3):391-403.
40. Casseb AR, Cruz AV, Jesus IS, Chiang JO, Martins LC, Silva SP, et al. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2014;20(1):9.
41. Catenacci LS, Ferreira M, Martins LC, De Vleeschouwer KM, Cassano CR, Oliveira LC, et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *EcoHealth*. 2018;15(4):777-91.
42. Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1961;10:227-49.
43. Causey OR, Maroja OM. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Para, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1957;6(6):1017-23.
44. Causey OR, Shope RE, Theiler M. Isolation of St. Louis Encephalitis Virus from Arthropods in Par'a, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1964;13:449.
45. CDC. Arbovirus Catalog. In: *Prevention CfDCa*, editor. 2018.
46. CDC. Centers for Diseases, Control and Prevention. Division of Vector-Borne Diseases. *West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control*. 4Ed. 2013.
47. CDC. Centers for Diseases, Control and Prevention. USA. 1999. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4838a1.htm>>. Acesso em 06 de dezembro de 2018.
48. Chevillon C, Briant L, Renaud F, Devaux C. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in microbiology*. 2008;16(2):80-8.
49. Chiu CY, Sanchez-San Martin C, Bouquet J, Li T, Yagi S, Tamhankar M, et al. Experimental Zika Virus Inoculation in a New World Monkey Model Reproduces Key Features of the Human Infection. *Scientific reports*. 2017;7(1):17126.
50. Clements AN. *The biology of mosquitoes, volume 3, transmission of viruses and interactions with bacteria*. CABI, Cambridge, 2012; 584 pp.
51. Coimbra TL, Nassar ES, Nagamori AH, Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, et al. Iguape: a newly recognized flavivirus from Sao Paulo State, Brazil. *Intervirology*. 1993;36(3):144-52.

52. Coimbra TL, Santos CL, Suzuki A, Petrella SM, Bisordi I, Nagamori AH, et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2007;49(4):221-4.
53. Confalonieri ECU, Margonaria C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Tropica*. 129, 3-41. 2014.
54. Couissinier-Paris P. West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*. 2006;99(5):348-54.
55. Cruz LC, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro AL, Shlessarenko RD, Santos MA. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015;48(1):18-25.
56. Cuiabá. Portal da Câmara Municipal de Cuiabá Mato Grosso. Acesso em 08 de dezembro de 2018. Disponível em: <<http://www.camaracba.mt.gov.br>>.
57. da Costa CF, Dos Passos RA, Lima JBP, Roque RA, de Souza Sampaio V, Campolina TB, et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasites & vectors*. 2017a;10(1):249.
58. da Costa VG, de Rezende Feres VC, Saivish MV, de Lima Gimaque JB, Moreli ML. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017b;62:84-5.
59. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*. 2007;25(30):5563-76.
60. de Albuquerque NF, Martins G, Medeiros L, Lilenbaum W, Ribeiro VMF. The role of capybaras as carriers of leptospirae in periurban and rural areas in the western Amazon. *Acta tropica*. 2017;169:57-61.
61. de Almeida MA, Dos Santos E, da Cruz Cardoso J, da Fonseca DF, Noll CA, Silveira VR, et al. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *American journal of primatology*. 2012;74(1):68-76.
62. De Araújo TVD, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes A, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL *et al*. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(12):1356-1363.
63. de Figueiredo GG, Amarilla AA, de Souza WM, Fumagalli MJ, de Figueiredo MLG, Szabo MPJ, et al. Genetic characterization of Cacipacore virus from ticks collected in Sao Paulo State, Brazil. *Archives of virology*. 2017;162(6):1783-6.

64. De Oliveira CS, Vasconcelos PFDC. Microcephaly and Zika virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92(2):103-5.
65. de Oliveira-Filho EF, Oliveira RAS, Ferreira DRA, Laroque PO, Pena LJ, Valença-Montenegro MM, et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transboundary and emerging diseases*. 2018;65(4):1094-7.
66. de Silva AM, Dittus WP, Amerasinghe PH, Amerasinghe FP. Serologic evidence for an epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60(2):300-6.
67. de Souza Lopes O, Coimbra TL, de Abreu Sacchetta L, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. *American journal of epidemiology*. 1978;107(5):444-9.
68. de Souza Lopes O, de Abreu Sacchetta L, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). *American journal of epidemiology*. 1981;113(2):122-5.
69. de Souza Luna LK RA, Santos RIM, Sesti-Costa R, Ferreira Criado M, Martins RB, et al. . Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *J Med Virol* 2016;89:1108–11.
70. de Souza TMA, Ribeiro ED, Correa VCE, Damasco PV, Santos CC, de Bruycker-Nogueira F, et al. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. *Viruses*. 2018;10(11).
71. de Souza WM, Acrani GO, Romeiro MF, Reis O, Jr., Tolardo AL, da Silva SP, et al. Molecular characterization of Capim and Enseada orthobunyaviruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;40:47-53.
72. Dégallier N RA, Silva JMC, Rodrigues SG, Vasconcelos PFC, Rosa JFST, Silva GP, Silva RP. . As aves como hospedeiras de arbovirus na amazonia brasileira. . *Bol Mus Para Emílio Goeldi, sér Zool*. 1992;8(1).
73. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60(2):281-6.
74. Diaz AL, Komar N, Visintin A, Dantur Juri MJ, Stein M, Lobo Allende R, et al. West Nile virus in birds, Argentina. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(4):689-91.

75. Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952;46(5):509-20.
76. Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1953;47(1):13-48.
77. Diniz MAC, Alvarez BMF, Maldonado CGM, Costa EA, Ca MRJL, Costa AT, Branda OFZ, Portela LZL. Epidemiology of Blutongue outbreak in a sheep flock in Brazil. *Vet Ital*. 2016; 52(3-4):325-331.
78. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben A. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Revista de saude publica*. 2017;51:30.
79. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(24):2536-43.
80. Dupuis AP, Marra PP, Kramer LD. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(7):860-3.
81. Eastwood G, Sang RC, Guerbois M, Taracha ELN, Weaver SC. Enzootic Circulation of Chikungunya Virus in East Africa: Serological Evidence in Non-human Kenyan Primates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;97(5):1399-404.
82. Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(10):673-85.
83. Esposito DLA, Fonseca B. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2017;21(5):540-4.
84. Estofolete CF, Mota MT, Vedovello D, Gongora DV, Maia IL, Nogueira ML. Mayaro fever in an HIV-infected patient suspected of having Chikungunya fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016;49(5):648-52.
85. Faria NR, Quick J, Claro M, Theze J, de Jesus JG, Giovanetti M *et al*. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017; 546(7658): 406-410.
86. Favoretto S AD, Oliveira D, Duarte N, Mesquita F, Zanotto P, Durigon E. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. In press *BioRxiv*. 2016.
87. Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, de Souza LT, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest Region, State of Sao Paulo, Brazil. I. Detection of

hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1994;36(3):265-74.

88. Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007;40(2):224-9.

89. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and infection*. 2000;2(13):1643-9.

90. Figueiredo MLG, Amarilla AA, Figueiredo GG, Alfonso HL, Lippi V, Maia FGM, et al. Cacipacore virus as an emergent mosquito-borne Flavivirus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017;50(4):539-42.

91. Filipe AR, Pinto MR. Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1969;18(3):423-6.

92. Freier JE, Beier JC. Oral and transovarial transmission of La Crosse virus by *Aedes atropalpus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1984;33(4):708-14.

93. Galel SA, Williamson PC, Busch MP, Stanek D, Bakkour S, Stone M, et al. First Zika-positive donations in the continental United States. *Transfusion*. 2017;57(3pt2):762-9.

94. Galindo P. *Culex* mosquitoes of the subgenus *Melanoconion* and allied subgenera as hosts of arboviruses. *An Microbiol* 1963;11 (parte A):83-7.

95. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816-8.

96. Garret L. Clinic, laboratorial diagnostic, and epidemiology of arboviruses and certain other viruses of vertebrates. In: Travassos da Rosa APAV, P.F.C; Travassos da Rosa, J.F.S. , editor. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries IEC*; 1998.

97. Goenaga S, Kenney JL, Duggal NK, Delorey M, Ebel GD, Zhang B, et al. Potential for Co-Infection of a Mosquito-Specific Flavivirus, Nhumirim Virus, to Block West Nile Virus Transmission in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(11):5801-12.

98. Góes P, Bruno-Lobo M. Estudos sobre arbovírus: Síntese do problema e plano inicial de trabalho: Diagnóstico das arboviroses. *An Microbiol* 1961; 9 (parte A): 67- 79.

99. Goldani LZ. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2017;21(2):123-4.

100. Gomes G, Causey OR. Bussuauara; a new arthropod-borne virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1959;101(2):275-9.

101. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One health*. 2017;4:1-13.

102. Grosso MGGdM. Portal do Governo de Mato Grosso Mato Grosso2018 [cited 2018 08 de dezembro]. Available from: www.mt.gov.br.
103. Guedes MP. Culicidae (Diptera) no brasil: relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. *Oecologia Australis* 2012;16(2):283-96.
104. Gutierrez-Bugallo G, Rodriguez-Roche R, Diaz G, Vazquez AA, Alvarez M, Rodriguez M, et al. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta tropica*. 2017;174:146-8.
105. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(12 Suppl):S7-16.
106. Hammon WM, Reeves WC, Cunha R, Espana C, Sather G. Isolation From Wild Bird Mites (*Liponyssus sylviarum*) of a Virus or Mixture of Viruses From Which St. Louis and Western Equine Encephalitis Viruses Have Been Obtained. *Science*. 1948;107(2769):92-3.
107. Heinen LB, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, Gondim BH, Dos Santos MA, et al. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2015;57(3):215-20.
108. Heinisch MRS, Diaz-Quijano FA, Chiaravalloti-Neto F, Menezes Pancetti FG, Rocha Coelho R, Dos Santos Andrade P, et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in Sao Paulo, SP, Brazil. *Acta tropica*. 2018;189:104-13.
109. Henriques DA. Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna Diptera Nematocera do estado de Rondônia (Amazônia Ocidental Brasileira). São Paulo. Doutorado [Tese em Ciências] – Universidade de São Paulo. 2008.
110. Henriques, DA. Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna Diptera Nematocera do estado de Rondônia (Amazônia Ocidental Brasileira). Tese de doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2009.
111. Hoch AL, Peterson NE, LeDuc JW, Pinheiro FP. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1981;30(3):689-98.
112. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*. 2007;359(2):405-14.
113. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):643-50.

114. Huber JH, Childs ML, Caldwell JM, Mordecai EA. Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue, chikungunya, and Zika transmission. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(5):e0006451.
115. Hurlbut HS, Rizk F, Taylor RM, Work TH. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1956;5(4):579-620.
116. IEC. Portal do Instituto Evandro Chagas. Acesso em 19 de novembro de 2018. Disponível em: <www.iec.gov.br/portal/historia/>.
117. IMASUL. Portal do IMASUL 2018 Disponível em <http://www.imasul.ms.gov.br/centro-de-reabilitacao-de-animais-silvestres-cras/>. Acesso em 08 de dezembro de 2018
118. Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RR, Candelario JR, et al. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *Journal of medical primatology*. 2003;32(2):89-94.
119. Iversson L. Rocio encephalitis. *The arboviruses: Epidemiology and ecology*. IV. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1988. p. 77-92.
120. Iversson LB, Silva RA, da Rosa AP, Barros VL. Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, Ilheus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1993;35(4):355-9.
121. Iversson LB, Travassos da Rosa AP, Rosa MD. [Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in the Valley of Ribeira region]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1989;31(1):28-31.
122. Iversson LB. [Aspects of the encephalitis epidemic due to arbovirus in the region of Vale do Ribeira, S. Paulo, Brazil from 1975-1978]. *Revista de saude publica*. 1980;14(1):9-35.
123. Johnson BW, Cruz C, Felices V, Espinoza WR, Manock SR, Guevara C, et al. Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(6):956-8.
124. Junglen S MM, Zirkel F, Drosten C. . ICTV taxonomic proposal Herbevirus. Create genus Herbevirus in the family Peribunyaviridae in the new order Bunyavirales (family and order proposed in 2016.030M). 2016.
125. Kading RC, Borland EM, Cranfield M, Powers AM. Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. *Journal of wildlife diseases*. 2013;49(3):587-99.
126. Kading RC, Schountz T. Flavivirus Infections of Bats: Potential Role in Zika Virus Ecology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;95(5):993-6.

127. Karabatsos N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 3 ed., American Society of Tropical Medicine & Hygiene, San Antonio, p 1147. 1985.
128. Kato F, Ishida Y, Kawagishi T, Kobayashi T, Hishiki T, Miura T, et al. Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 10):2202-7.
129. Kenney JL, Solberg OD, Langevin SA, Brault AC. Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 12):2796-808.
130. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(3):590-4.
131. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, 2012; 1327 pp.
132. King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Archives of virology*. 2018.
133. King AMQ, AM, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012. 1327 p.
134. Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(2):112-7.
135. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 311-322.
136. Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):608-37.
137. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of virological methods*. 1991;33(1-2):101-13.
138. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Hubalek Z, Plyusnin A, Gubler DJ. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses*. 2017;9(7).
139. Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *Journal of virological methods*. 1998; 72(1), 27-41.
140. Laemmert HW, Jr., Hughes TP. The virus of Ilheus encephalitis; isolation, serological specificity and transmission. *Journal of immunology*. 1947;55(1):61-7.

141. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert Aj, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008. 14(8):1232-9.
142. Laroque PO V-MM, Ferreira DRA, Chiang JO, Cordeiro MT, Vasconcelos PFC, Silva JCR. Epidemiologic survey for arbovirus in galician capuchin monkeys (*Cebus ?avius*) free living in Paraiba and captive capuchin monkey (*Cebus libidinosus*) from northeast Brazil. . *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2014;34:462-8.
143. Lawrie CH, Uzcategui NY, Gould EA, Nuttall PA. Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerging infectious diseases.* 2004;10(4):653-7.
144. Le Guenno B, Bougermouh A, Azzam T, Bouakaz R. West Nile: a deadly virus? *Lancet.* 1996;348(9037):1315.
145. Lemos ER, D'Andrea PS. Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. In *Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança.* 2014.
146. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Advances in virology.* 2011;2011:249640.
147. Li CX, Guo XX, Deng YQ, Xing D, Sun AJ, Liu QM, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerging microbes & infections.* 2017;6(4):e23.
148. Lima DC. Risco de reurbanização da febre amarela no Brasil facilitada por populações competentes de mosquitos do gênero *Aedes*. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2017.
149. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde.* 2014;5(3):55-64.
150. Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pereira LE. Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1979; 28(3): 583-585.
151. Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pinto GA, Classer CM. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: II Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *American Journal of Epidemiology.* 1978; 108: 394-401.
152. Lopes OS, Sacchetta LA, Francy DB, Jakob WL, Calisher C. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). *Am J Epidemiol.* 1981; 113(2): 122-125.
153. Lopes SF, Farias IP, Figueiredo LTM, Figueiredo RP, Morais FA, Nunes MRT, Figueiredo MLG. Flavivirus infection in wild birds from brazilian amazon. *Entom Ornithol Herpetol.* 2015;; 4:3.

154. Lorenz C, Azevedo TS, Virginio F, Aguiar BS, Chiaravalloti-Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(9):e0005959.
155. Lourenco-de-Oliveira R, Failloux AB. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(6):e0005698.
156. Machado DC, Mondini A, dos Santos Santana V, Yonamine PT, Chiaravalloti Neto F, Zanotto PM, et al. First identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology*. 2012;55(6):475-83.
157. Mackenzie JS, Lindsay MDA, Smith DW, Imrie A. The ecology and epidemiology of Ross River and Murray Valley encephalitis viruses in Western Australia: examples of One Health in Action. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;111(6):248-54.
158. Maia FG, Chavez JH, de Souza WM, Romeiro MF, de Castro-Jorge LA, da Fonseca BA, et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;26:96-7.
159. Makino Y, Tadano M, Saito M, Maneekarn N, Sittisombut N, Sirisanthana V, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiology and immunology*. 1994;38(12):951-5.
160. Martinez NE, Dzul-Manzanilla F, Gutierrez-Castro C, Ibarra-Lopez J, Bibiano-Marin W, Lopez-Damian L, et al. Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2014;30(2):143-6.
161. Martins CM, Silva, EVP, Casseb MN, Silva, SP, Cruz ACR, Pantija JA, Filho AJR et al. First isolation of west nile virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Fast Track*. 2018. 10.1590/0074-02760180332.
162. Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia. SEMAC. Plano de Manejo do Parque Estadual do Prosa. 2011; 155 pág.
163. Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(9):1497-8.
164. McCrae AW, Henderson BE, Kirya BG, Sempala SD. Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1971;65(2):152-68.

165. McIntosh BM. Antibody against Chikungunya virus in wild primates in Southern Africa. *The South African journal of medical sciences*. 1970;35(3):65-74.
166. McLean RG, Francly DB, Monath TP, Calisher CH, Trent DW. Isolation of St. Louis encephalitis virus from adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*. 1985;22(2):232-3.
167. Melandri V, Guimaraes AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(8):1073-5.
168. Meltzer E. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2):479-96.
169. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ, Velleca WM. Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. CDC. 1998.
170. Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Revista de saude publica*. 1986;20(3):171-7.
171. Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *Journal of medical entomology*. 1984;21(1):34-7.
172. Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Anderson JF, Vossbrinck CR. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(3):468-74.
173. Monath TP e Vasconcelos PF. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015;; 64:160-73.
174. Monath TP, Kemp GE, Cropp CB, Bowen GS. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with Rocio virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1978;27(6):1251-4.
175. Monath TP, Lee VH, Wilson DC, Fagbami A, Tomori O. Arbovirus studies in Nupeko forest, a possible natural focus of yellow fever virus in Nigeria. I. Description of the area and serological survey of humans and other vertebrate hosts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974;68(1):30-8.
176. Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, dos Santos TM, Lazaro E, Nunes SH, et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(1):84-6.
177. Moraes A, Cortelli FC, Miranda TB, Aquino DR, Cortelli JR, Guimaraes MIA, et al. Transovarial transmission of dengue 1 virus in *Aedes aegypti* larvae: real-time PCR analysis in a

Brazilian city with high mosquito population density. *Canadian journal of microbiology*. 2018;64(6):393-400.

178. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(10):1559-61.

179. Morales MA, Fabbri CM, Zunino GE, Kowalewski MM, Luppó VC, Enria DA, et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(2):e0005351.

180. Morales-Betoulle ME, Monzon Pineda ML, Sosa SM, Panella N, Lopez MR, Cordon-Rosales C, et al. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *Journal of medical entomology*. 2008;45(6):1187-90.

181. Moreau G, Temmam S, Gonzales JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7(4):467-77.

182. Moreira-Soto A, Carneiro IO, Fischer C, Feldmann M, Kummerer BM, Silva NS, et al. Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. *mSphere*. 2018;3(1).

183. Motta IJ, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA, Gonzaga YB, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *The New England journal of medicine*. 2016;375(11):1101-3.

184. Mourao MP, Bastos Mde S, de Figueiredo RP, Gimaque JB, Galusso Edos S, Kramer VM, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2012;12(1):42-6.

185. Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2007;7(4):467-77.

186. Mucci LF, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, Fernandes A, Camargo AA, Evangelista E, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and Other Mosquitoes Potentially Associated With Sylvatic Yellow Fever In Cantareira State Park In the Sao Paulo Metropolitan Area, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2016;32(4):329-32.

187. Nahum L.A. RJC. Filogenômica. In: Moreira LM, editor. *Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações*. 1ª ed. São Paulo, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética; 2015. p. 117 – 42.

188. Nakgoi K, Nitatpattana N, Wajjwalku W, Pongsopawijit P, Kaewchot S, Yoksan S, et al. Dengue, Japanese encephalitis and Chikungunya virus antibody prevalence among captive monkey (*Macaca nemestrina*) colonies of Northern Thailand. *American journal of primatology*. 2014;76(1):97-102.
189. Nasci RS, White DJ, Stirling H, Oliver JA, Daniels TJ, Falco RC, et al. West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):626-30.
190. Nava S, Beati L, Labruna MB., Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and tick-borne diseases*. 2014; 5(3), 252-276.
191. Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology journal*. 2010;7:189.
192. Nogueira ML, Estofolete CF, Terzian AC, Mascarin do Vale EP, da Silva RC, da Silva RF, et al. Zika Virus Infection and Solid Organ Transplantation: A New Challenge. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(3):791-5.
193. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
194. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*. 2015;13:102.
195. Nuttall PA, Jones LD, Labuda M, Kaufman WR. Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of medical entomology*. 1994;31(1):1-9.
196. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017;546(7660):646-50.
197. Oliveira Melo AS, Malingier G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormalities and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47(1):6-7.
198. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;75(3):389-93.

199. Ometto T, Durigon EL, de Araujo J, Aprelon R, de Aguiar DM, Cavalcante GT, et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(11):723-30.
200. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.
201. Panon G, Fauran P, Digoutte JP. [Isolation of Ilheus virus in french Guyana]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1979;72(4):315-8.
202. Passos SRL, Borges Dos Santos MA, Cerbino-Neto J, Buonora SN, Souza TML, de Oliveira RVC, et al. Detection of Zika Virus in April 2013 Patient Samples, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(12):2120-1.
203. Pauvalid-Correa A, Campos Z, Juliano R, Velez J, Nogueira RM, Komar N. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(2):e2706.
204. Pauvalid-Correa A, Campos Z, Soares R, Nogueira RMR, Komar N. Neutralizing antibodies for orthobunyaviruses in Pantanal, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017a;11(11):e0006014.
205. Pauvalid-Correa A, Juliano RS, Campos Z, Velez J, Nogueira RM, Komar N. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015a;110(1):125-33.
206. Pauvalid-Correa A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZM, Schatzmayr HG, Nogueira RM, et al. Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(7):e2318.
207. Pauvalid-Correa A, Komar N. VectorTest West Nile Virus Antigen Assay in an Inhibition Platform as Field Screening Tool for Flavivirus Group-Specific Antibodies in Brazilian Equines. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2017b;33(3):237-40.
208. Pauvalid-Correa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(4):467-74.
209. Pauvalid-Correa A, Solberg O, Couto-Lima D, Kenney J, Serra-Freire N, Brault A, et al. Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Archives of virology*. 2015b;160(1):21-7.
210. Pauvalid-Correa A, Solberg O, Couto-Lima D, Nogueira RM, Langevin S, Komar N. Novel Viruses Isolated from Mosquitoes in Pantanal, Brazil. *Genome announcements*. 2016;4(6).

211. Pauvalid-Correa A, Tavares FN, Alencar J, Silva Jdos S, Murta M, Serra-Freire NM, et al. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2010a;52(1):17-24.
212. Pauvalid-Correa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolandia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010b;105(6):829-33.
213. Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TL, de Souza RP, Chamelet EL. [Ilheus arbovirus in wild birds (*Sporophila caerulescens* and *Molothrus bonariensis*)]. *Revista de saude publica*. 2001;35(2):119-23.
214. Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;57(6):709-18.
215. Pineda C, Munoz-Louis R, Caballero-Uribe CV, Viasus D. Chikungunya in the region of the Americas. A challenge for rheumatologists and health care systems. *Clinical rheumatology*. 2016;35(10):2381-5.
216. Pinheiro FP PM, Bensabath G, Causey OR, Shope RE. . Epidemia de virus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*. 1962;12:15-23.
217. Pinheiro FP TdRA, Freitas RB, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC. Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Fundação SESP; 1986. p. 375–408.
218. Pinheiro FP, Freitas RB, Travassos da Rosa JF, Gabbay YB, Mello WA, LeDuc JW. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1981;30(3):674-81.
219. Pinheiro FP, Hoch AL, Gomes ML, Roberts DR. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1981;30(1):172-6.
220. Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1981; 30(1):145-148.
221. Pinheiro FP, Rocha AG, Freitas RB, Ohana BA, Travassos da Rosa AP, Rogerio JS, et al. [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1982;24(4):246-51.

222. Pinheiro FP, Schatzmayr H, Travassos da Rosa APA, Homma A, Bensabath. Arbovirus antibodies in children of rural Guanabara, Brazil. *Intervirology*. 1975; 5(1-2): 93- 96.
223. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Bensabath G. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brazil. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 1976;27(2):213-23.
224. Possas C, Lourenco-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RVD, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180278.
225. Prefeitura de Cuiabá. Portal da Prefeitura de Cuiabá Mato Grosso 2018. Disponível em <http://www.cuiaba.mt.gov.br/>. Acesso em 08 de dezembro de 2018.
226. Prias-Landinez E, Bernal-Cubides C, Morales-Alarcon A. Isolation of Ilheus virus from man in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1968;17(1):112-4.
227. Pruetz J, Socha A, Kante D. . New range record for the lesser spot-nosed Guenon (*Cercopithecus petaurista*) in southeastern Senegal. *Afr Primates*. 2010;7:64-6.
228. Pupo M, Guzman MG, Fernandez R, Llop A, Dickinson FO, Perez D, et al. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(6):1022-4.
229. Ragan IK, Blizzard EL, Gordy P, Bowen RA. Investigating the Potential Role of North American Animals as Hosts for Zika Virus. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2017;17(3):161-4.
230. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerging infectious diseases*. 2000;6(4):319-28.
231. Reiter P, Weather, vector biology and arboviral recrudescence. In: Monath TP, editor. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1988. p. 245-55.
232. Ricardo B, Campanili M. *Almanaque Brasil Socioambiental*. São Paulo: ISA-Instituto Socioambiental; 2005.
233. Rocco IM, Santos CL, Bisordi I, Petrella SM, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2005;47(5):281-5.
234. Rodaniche E GP. Ecological observations on Ilhéus virus in the vicinity of Almirante, Republic of Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1963;12:924-8.
235. Rodaniche E GP. Isolation of Ilhéus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala em 1956. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1957;6:686-7.
236. Rodaniche E GP. Isolation of the virus of Ilhéus encephalitis from mosquitoes captured in Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1961;10:393-4.

237. Rodrigues Faria N, Lourenco J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Carlos Junior Alcantara L. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. *PLoS currents*. 2016;8.
238. Romano AP, Costa ZG, Ramos DG, Andrade MA, Jayme Vde S, Almeida MA, et al. Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(3):e2740.
239. Romano-Lieber NS, Iversson LB. [Serological survey on arbovirus infection in residents of an ecological reserve]. *Revista de saude publica*. 2000;34(3):236-42.
240. Romeiro MF, Souza WMD, Tolardo AL, Vieira LC, Colombo TE, Aquino VH, Figueiredo LTM. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016a; 49(3), 279-285.
241. Romeiro, MF, de Souza WM, Tolardo AL, Vieira LC, Henriques DA, de Araujo J, de Moraes Bronzoni RV. A real-time RT-PCR for rapid detection and quantification of mosquito-borne alphaviruses. *Archives of virology*, 2016b; 161(11), 3171-3177.
242. Romero-Alvarez D, Escobar L. vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112. 2017.
243. Romo H, Kenney JL, Blitvich BJ, Brault AC. Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 15:7(1):181.
244. Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MR, et al. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(11):e2537.
245. Saiyasombat R, Dorman KS, Garcia-Rejon JE, Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Blitvich BJ. Isolation and sequence analysis of *Culex* flavivirus from *Culex interrogator* and *Culex quinquefasciatus* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Archives of virology*. 2010;155(6):983-6.
246. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;82(1):128-35.
247. Sano EE, Rosa R, Brito JL, Ferreira Jr LG. 2008. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43: 153– 156, DOI: 10.1590/S0100-204X2008000100020.

248. Santos N. *Viroses Multissistêmicas*. In: Santos NR, M.T.V; Wigg, M.D, editor. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. p. 374-6.
249. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5), 1922-1927.
250. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986;81(2):245-6.
251. Seferovic M, Sanchez-San Martin C, Tardif SD, Rutherford J, Castro ECC, Li T, et al. Experimental Zika Virus Infection in the Pregnant Common Marmoset Induces Spontaneous Fetal Loss and Neurodevelopmental Abnormalities. *Scientific reports*. 2018;8(1):6851.
252. Serra OP, Cardoso BF, Ribeiro AL, Santos FA, Shlessarenko RD. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111(1):20-9.
253. Shope RE, de Andrade AH, Bensabath G, Causey OR, Humphrey PS. The epidemiology of EEE WEE, SLE and Turlock viruses, with special reference to birds, in a tropical rain forest near Belem, Brazil. *American journal of epidemiology*. 1966;84(3):467-77.
254. Shope RE. The use of micro-hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Microbiology: Annals of Microbiology*; 1963. p. 167-71.
255. Silva JR, Medeiros LC, Reis VP, Chavez JH, Munhoz TD, Borges GP, et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):921-3.
256. Silva JR, Romeiro MF, Souza WM, Munhoz TD, Borges GP, Soares OA, et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014;47(4):414-7.
257. Silva ML, Galiza GJ, Dantas AF, Oliveira RN, Iamamoto K, Achkar SM, Riet-Correa F. Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *J Vet Invest*. 2011; 23(3):570-5.
258. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of general virology*. 2017;98(1):2-3.
259. Smith CE. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *The Journal of tropical medicine and hygiene*. 1956;59(10):243-51.

260. Smithburn JS HT, Burke AW, Paul JH A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1940;20:471-92.
261. Solomon T. Flavivirus encephalitis. *The New England journal of medicine*. 2004;351(4):370-8.
262. Souza TM, Azeredo EL, Badolato-Correa J, Damasco PV, Santos C, Petitinga-Paiva F, Nunes PC, Barbosa LS *et al*. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Plos Curr*. 2017; 14:9.
263. Srihongse S, Johnson CM. The first isolation of Bussuquara virus from man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1971;65(4):541-2.
264. Srihongse S, Johnson CM. The isolation of Ilheus virus from man in Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1967;16(4):516-8.
265. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 2):233-46.
266. Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PF, da Rosa AP, Rodrigues SG, Tavares-Neto J. [Serological evidence of the circulation of the Rocio arbovirus (Flaviviridae) in Bahia]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997;30(6):511-5.
267. Svoboda WK, Martins LC, Malanski Lde S, Shiozawa MM, Spohr KA, Hilst CL, *et al*. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Parana River basin region, Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014;47(3):280-6.
268. SVS. Boletim Epidemiológico. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. In: Brasil. SdVeSMdS, editor. 2017.
269. Tavares-Neto J, Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Costa JM, Travassos da Rosa JF, Marsden PD. [Research on antibodies to arbovirus in the serum of residents of the village of Corte de Pedra, Valencia, Bahia]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986;81(4):351-8.
270. Terzian AC, Auguste AJ, Vedovello D, Ferreira MU, da Silva-Nunes M, Speranca MA, *et al*. Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;92(2):401-4.
271. Terzian AC, Mondini A, Bronzoni RV, Drumond BP, Ferro BP, Cabrera EM, *et al*. Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2011;11(3):291-300.

272. Terzian ACB, Zini N, Sacchetto L, Rocha RF, Parra MCP, Del Sarto JL, et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Scientific reports*. 2018;8(1):16034.
273. Tingstrom O, Wesula Lwande O, Naslund J, Spyckerelle I, Engdahl C, Von Schoenberg P, et al. Detection of Sindbis and Inkoo Virus RNA in Genetically Typed Mosquito Larvae Sampled in Northern Sweden. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2016;16(7):461-7.
274. Travassos da Rosa JFS TdRA, Vasconcelos PFC, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, et al. . Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. . In: Travassos da Rosa APA VP, Travassos da Rosa JFS, editor. *An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 19-31.
275. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*. 1998;352(9130):767-71.
276. Turell MJ, O'Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, Fernandez R, Travassos da Rosa A, Guzman H, Tesh R, Rossi CA, Ludwig GV, Mangiafico JA, Kondig J, Wasieloski LP, Pecor J, Zyzak M, Schoeler G, Mores CN, Calampa C, Lee JS, Klein T. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon basin region of Peru. *J Med Entomol*. 2005; 42(5): 891-898.
277. Turell MJ, O'Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, et al. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *Journal of medical entomology*. 2005;42(5):891-8.
278. UFMS. Portal da Universidade Federal de Mato Grosso Mato Grosso 2018. Disponível em <http://www.ufmt.br>. Acesso em 08 de dezembro de 2018.
279. UFMT. Universidade Federal do mato Grosso. Disponível em www.ufmt.br. Acesso em 18 de dezembro de 2018.
280. Vanchiere JA, Ruiz JC, Brady AG, Kuehl TJ, Williams LE, Baze WB, et al. Experimental Zika Virus Infection of Neotropical Primates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2018;98(1):173-7.
281. Varma MGR Yellow fever. In WHO - World Health Organization. *Vector biology and control division. Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors*, WHO, Geneva, p. 35-36; 1989.
282. Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuaria PC, et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates.

Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2009;44(2):129-33.

283. Vasconcelos PF, Travassos Da Rosa JF, Guerreiro SC, Degallier N, Travassos Da Rosa ES, Travassos Da Rosa AP. [1st register of an epidemic caused by Oropouche virus in the states of Maranhao and Goias, Brazil]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1989;31(4):271-8.

284. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(2):275-93.

285. Vasconcelos PFC, da Rosa, J. F. S. T., Dégallier, N., de Paula Pinheiro, F., & Sá filho, G. C. . Epidemiology of encephalitis by arboviruses in the Amazon region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1991;33(6):465-76.

286. Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Dégallier N, Moraes MA, da Rosa JF, da Rosa ES, Mondet B, Barros VL, da Rosa AP. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhao state, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomologic findings. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57(2): 132-137.

287. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. Gestão imprópria do ecossistema natural na Amazônia brasileira resulta na emergência e reemergência de arbovírus. *Cad Saude Publica*. 2001; 17: 155-164.

288. Vasilakis N e Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol*. 2017; 22:30-35.

289. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(7):532-41.

290. Venegas EA, Aguilar PV, Cruz C, Guevara C, Kochel TJ, Vargas J, et al. Ilheus virus infection in human, Bolivia. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(3):516-8.

291. Vieira MA, Romano AP, Borba AS, Silva EV, Chiang JO, Eulalio KD, et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(2):377-9.

292. Vina-Rodriguez A, Sachse K, Ziegler U, Chaintoutis SC, Keller M, Groschup MH, Eiden M. A novel pan-Flavivirus detection and identification assay based on RT-qPCR and microarray. *BioMed Research International*, 2017; 4248756.

293. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual review of medicine*. 2018;69:395-408.

294. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research*. 2015;120:32-9.
295. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in microbiology*. 2013;21(8):360-3.
296. Webster LT, Fite GL. A Virus Encountered in the Study of Material from Cases of Encephalitis N the St. Louis and Kansas City Epidemics of 1933. *Science*. 1933;78(2029):463-5.
297. White DJ, Kramer LD, Backenson PB, Lukacik G, Johnson G, Oliver JA, et al. Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of West Nile virus, New York State. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(4):643-9.
298. WHO - World Health Organization 1985. *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores: Informes técnicos 719*, World Health Organization, Ginebra, 126 pp.
299. WHO - World Health Organization Vector biology and control division Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. Ginebra: WHO; 1989. p. 35-6.
300. WHO - World Health Organization. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO, Ginebra. 2007; p. 26.
301. WHO World health Organization. *Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases; A report of a WHO scientific group*. Geneva, Switzerland: WHO; 1985. p. 1-116.
302. Wilson DE, Reeder DM. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2ed., Smithsonian Institution Press and American Society of Mammalogists. 1993. 1064 p.
303. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;64(5-6):310-6.
304. Yang CF, Chen CF., Su CL, Teng HJ, Lu LC, Lin C, Wu HS. Screening of mosquitoes using SYBR Green I-based real-time RT-PCR with group-specific primers for detection of Flaviviruses and Alphaviruses in Taiwan. *Journal of virological methods*, 2010; 168(1-2), 147-151.
305. Yang HM. The transovarial transmission in the dynamics of dengue infection: Epidemiological implications and thresholds. *Mathematical biosciences*. 2017;286:1-15.
306. Yasri S, Wiwanitkit V. Non-human Hosts and Zika Virus Maintenance. *EcoHealth*. 2017;14(2):200-2.
307. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72.

308. Zanutto PMA, Leite LCC. The challenges imposed by dengue, zika and chikungunya to Brazil. *Front Immunol.* 2018; 9:1964.
309. Zuchi N, Heinen LB, Santos MA, Pereira FC, Shessarenko RD. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2014;109(6):820-3.

ANEXO B



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
COMISSÃO PARA USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Mamíferos silvestres da área urbana de Campo Grande e Corumbá (MS) como reservatórios de parasitas emergentes.**", registrada com o nº **001/2017**, sob a responsabilidade de Grasiela Edith de Oliveira Porfirio, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco em reunião de 23/03/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/04/2017 - 04/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Cão, Caprino, Equídeo, Espécie silvestre brasileira, Ovino, Diptera
Nº de animais	1480
Peso/Idade	---
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Áreas florestadas de ambientes urbanos de Corumbá e Campo Grande, MS.

Campo Grande, 4 de abril de 2017.

Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Coordenadora da CEUA /UCDB

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.169037/2016-24, sobre “Ecologia do vírus Zika em vertebrados neotropicais”, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. RENATA DEZENGRINI SLHESSARENKO/Andressa de Lara Zelenski Pinto & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **23/06/2017**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.169037/2016-24, entitled “Ecology of Zika virus in neotropical vertebrates”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Jun 23, 2017**.

Cuiabá-MT, 23 de junho de 2017.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br



ANEXO D

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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular Título do Projeto: Ecologia de vírus Zika em vertebrados e mosquitos	
SISBIO	

neotropicais do Brasil

Nome: Renata Dezengrini Shlessarenko

CPF: 006.990.439-13

Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CNPJ: 33.004.540/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Amostragem	01/2017	12/2017
2	Análise laboratorial	03/2017	06/2018
3	Resultados, relatórios e publicações	01/2018	12/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença de autenticação abaixo, qualque cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 1/6

Código de autenticação: 92588455



ANEXO D (continuação)



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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Autorização para atividades com finalidade científica

7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblina utilizadas para a captura de morcegos deverão ser checadas no mínimo a cada 20 minutos. As armadilhas utilizadas para captura de mamíferos deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido a hipo ou hipertermia. Não está autorizada a coleta, transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação.
2	1. O volume de sangue coletado não deve ultrapassar o equivalente a 1% da massa corporal da ave. Em coletas consecutivas, não deve ultrapassar 2% a cada 14 dias.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andressa Zelenski de Lara Pinto	auxílio em coleta de amostra biológica	025.066.001-67	16752996 SSP-MT	Brasileira
2	Thais Oliveira Morgado	coleta de amostra biológica	019.218.641-84	15690970 SSP-MT	Brasileira
3	SANDRA HELENA RAMIRO CORRÊA	coleta de amostra biológica	826.530.979-15	3979647-3 SSP/PR-PR	Brasileira
4	ALEX PAUVOLID-CORRÊA	investigador principal	068.829.447-25	6996 CRMV-RJ-RJ	Brasileira
5	Daniel Moura de Aguiar	colaborador	603.780.181-91	923514 SSP-MT	Brasileira

Dados do titular Título do Projeto: Ecologia de vírus Zika em vertebrados e mosquitos

SISBIO

neotropicais do Brasil

Nome: Renata Dezengrini Shlessarenko

CPF: 006.990.439-13

Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CNPJ: 33.004.540/0001-00

6	Gilberto Sabino-Santos Jr	contenção de animais selvagens	003.544.035-08	871334151 SSP-BA	Brasileira
---	---------------------------	--------------------------------	----------------	------------------	------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CUIABA	MT	Zoológico de Cuiabá	Fora de UC Federal
2	VARZEA GRANDE	MT	Polícia Ambiental de Várzea Grande	Fora de UC Federal
3	CUIABA	MT	Parque Massairo Okamura	Fora de UC Federal
4	CUIABA	MT	Área urbana de Cuiabá	Fora de UC Federal
5	CUIABA	MT	Hotel Fazenda Mato Grosso	Fora de UC Federal

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMbio

SISBIO

na Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 2/6

Código de autenticação: 92588455



ANEXO D (continuação)



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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Tayassuidae, Aves, Didelphidae, Bradypodidae, Procyonidae, Boidae, Alligatoridae, Felidae, Cervidae, Viperidae, Amphibia, Canidae, Testudinidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rodentia, Sapajus libidinosus, Sapajus apella, Chiroptera, Mico melanurus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 30), Rodentia (*Qtde: 30), Culicidae (*Qtde: 5000)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Secreção, Sangue
2	Amostras biológicas (Aves)	Sangue, Fezes, Outras amostras biológicas(suabe oral)
3	Amostras biológicas (Carnívoros)	Outras amostras biológicas(suabe oral), Fezes, Sangue
4	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
5	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Secreção, Sangue, Fezes
6	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Outras amostras biológicas(Para os primatas do genero Mico serao coletados de 1 a 3 ml de sangue e suabes orais), Fezes
7	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Fezes, Secreção
8	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual
9	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(nao serao capturadas aves livres, somente animais de cativeiro)
10	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(serao amostrados 30 animais por especie encontrada em area urbana de cuiaba), Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
11	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Puçá, Coleta manual, Outros métodos de captura/coleta(aspirador de Nasci para amostrar mosquitos em area urbana de cuiaba), Captura manual
12	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Puçá, Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Outros métodos de captura/coleta(somente serao amostrados 30 animais por espécie presentes em area urbana de cuiabãj)
13	Método de captura/coleta (Primatas)	Outros métodos de captura/coleta(Os primatas do genero Mico serao capturados com puçãfãçãfãçã Sapajus), Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçá, Captura manual
14	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta(nao serao capturados,somente serao amostrados jacarãcs de cativeiro.)
15	Método de marcação (Aves)	Corantes
16	Método de marcação (Carnívoros)	Outros métodos de marcação(nao sera necessario marcar o animal)
17	Método de marcação (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de marcação(nao se aplica marcacao)
18	Método de marcação (Outros mamíferos)	Outros métodos de marcação(nao sera necessario marcar o animal, a coleta sera unica)

Dados do titular Título do Projeto: Ecologia de vírus Zika em vertebrados e mosquitos

neotropicais do Brasil **SISBIO**

Nome: Renata Dezengrini Silhessarenko

CPF: 006.990.439-13

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMbio

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 3/6

Código de autenticação: 92588455



ANEXO D (continuação)



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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO		CNPJ: 33.004.540/0001-00
19	Método de marcação (Primatas)	Outros métodos de marcação(tricotomia em Área visível da cauda para evitar a recaptura na mesma expedição)
20	Método de marcação (Répteis)	Outros métodos de marcação(nao sera necessario marcar o animal, a coleta sera unica)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 4/6

Código de autenticação: 92588455



ANEXO D (continuação)



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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular Título do Projeto: Ecologia de vírus Zika em vertebrados e mosquitos	
SISBIO	

neotropicais do Brasil

Nome: Renata Dezengrini Silhessarenko

CPF: 006.990.439-13

Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CNPJ: 33.004.540/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data
de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio				

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 5/6

Código de autenticação: 92588455



ANEXO D (continuação)



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

Número: 54728-1	Data da Emissão: 08/06/2017 12:22	Data para Revalidação*: 08/07/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 6/6

Código de autenticação: 92588455





ANEXO E

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular	
Nome: Jaire Marinho Torres	CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

DO **SISBIO**

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Licenças e autorizações	02/2017	03/2017
2	Captura e coleta de material biológico	03/2017	12/2017
3	Análises laboratoriais	04/2017	02/2018
4	Relatório Parcial	06/2017	06/2017
5	Relatório Final	03/2018	03/2018

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Graciela Edith Berfúrio	Pesquisador	003.136.181-74	001024081 SSP MS	Brasileira
2	ALEX PAUVOLID-CORRÊA	Pesquisador	068.829.447-25	6996 CRMV-RJ-RJ	Brasileira

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 1/5

Código de autenticação: 73781888





ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Autorização para atividades com finalidade científica

3	Gabriel Carvalho de Macedo	Médico Veterinário	008.981.562-97	001506668 SSP/MS-MS	Brasileira
4	Heitor Miraglia Herrera	Pesquisador	444.869.871-87	049724503 IFP-RJ	Brasileira
5	Wanessa Teixeira Gomes Barreto	Pesquisador	013.418.161-17	001451636 ssp-MS	Brasileira

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblina utilizadas para a captura de morcegos deverão ser checadas no mínimo a cada 20 minutos. Não está autorizada a coleta e o transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação.
---	---

Equipe**Dados do titular**

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

SISBIO
DOSUL
de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio**SISBIO**
na

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 2/5

Código de autenticação: 73781888



ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO		CNPJ: 03.226.149/0015-87		
Locais onde as atividades de campo serão executadas				
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	Campo Grande	Fora de UC Federal
2	CORUMBA	MS	Corumbá	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 120)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Secreção, Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	

Dados do titular

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 3/5

Código de autenticação: 73781888



ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO	
DO	

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

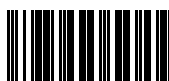
na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 4/5

Código de autenticação: 73781888





ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

DO **SISBIO**

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 5/5

Código de autenticação: 73781888





ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular	
Nome: Jaire Marinho Torres	CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

DO **SISBIO**

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Licenças e autorizações	02/2017	03/2017
2	Captura e coleta de material biológico	03/2017	12/2017
3	Análises laboratoriais	04/2017	02/2018
4	Relatório Parcial	06/2017	06/2017
5	Relatório Final	03/2018	03/2018

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Graciela Edith Berfúrio	Pesquisador	003.136.181-74	001024081 SSP MS	Brasileira
2	ALEX PAUVOLID-CORRÊA	Pesquisador	068.829.447-25	6996 CRMV-RJ-RJ	Brasileira

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 1/5

Código de autenticação: 73781888





ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Autorização para atividades com finalidade científica

3	Gabriel Carvalho de Macedo	Médico Veterinário	008.981.562-97	001506668 SSP/MS-MS	Brasileira
4	Heitor Miraglia Herrera	Pesquisador	444.869.871-87	049724503 IFP-RJ	Brasileira
5	Wanessa Teixeira Gomes Barreto	Pesquisador	013.418.161-17	001451636 ssp-MS	Brasileira

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblina utilizadas para a captura de morcegos deverão ser checadas no mínimo a cada 20 minutos. Não está autorizada a coleta e o transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação.
---	---

Equipe**Dados do titular**

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

SISBIO
DOSUL
de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio**SISBIO**
na

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 2/5

Código de autenticação: 73781888



ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO		CNPJ: 03.226.149/0015-87		
Locais onde as atividades de campo serão executadas				
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	Campo Grande	Fora de UC Federal
2	CORUMBA	MS	Corumbá	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 120)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Secreção, Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	

Dados do titular

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

SISBIO

na Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 3/5

Código de autenticação: 73781888



ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO	
DO	

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 4/5

Código de autenticação: 73781888





ANEXO E (continuação)

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

Número: 57450-1	Data da Emissão: 25/04/2017 09:51	Data para Revalidação*: 25/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Autorização para atividades com finalidade científica

Dados do titular

Nome: Jaire Marinho Torres

CPF: 028.989.481-60

Título do Projeto: OCORRÊNCIA DE ZIKA VÍRUS EM MORCEGOS DE FRAGMENTOS URBANOS DE DOIS MUNICÍPIOS DO MATO GROSSO

DO **SISBIO**

SUL

Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO

CNPJ: 03.226.149/0015-87

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio

na **SISBIO**

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base

na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Página 5/5

Código de autenticação: 73781888



ANEXO F



**AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL PARA PESQUISA EM
UNIDADES DE CONSERVAÇÃO Nº 001/2017
PROCESSO IMASUL Nº61/405959/2016
VALIDADE: MARÇO 2017/ MARÇO 2018.**

A Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Econômico - SEMADE, no uso de suas atribuições que lhe são conferidas de acordo com a Lei nº2268 de 31 de julho de 2001 e Resolução SEMADE nº 09/2015, expede a presente Autorização a Grasiela Edith de Oliveira Porfirio.

INFORMAÇÕES GERAIS:

Instituição: **Universidade Católica Dom Bosco**

Endereço: **Avenida Tamandaré, 6000.**

DO PROJETO:

Título: **Mamíferos silvestres da área urbana de Campo Grande e Corumbá (MS) como reservatórios de parasitas emergentes.**

Local do Projeto: (Unidades (s) de conservação) **Parque Estadual do Prosa**

Município: **Campo Grande, MS.**

OBJETIVO GERAL:

Avaliar o papel de mamíferos silvestre (roedores, marsupiais, tatus, mesocarnívoros e primatas não-humanos) na manutenção de parasitas emergentes (tripanosomatídeos e Zika Vírus) na área urbana de Campo Grande e Corumbá/MS.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Avaliar a exposição de mamíferos silvestres aos tripanossomatídeos e ao Zika Vírus em Campo Grande e Corumbá/MS;
2. Verificar as taxas de infecções por tripanossomatídeos e Vírus Zika em mamíferos silvestres das duas áreas urbanas;
3. Caracterizar as populações de *Leishmania* spp. e sub-populações de *T.cruzi* que infectam mamíferos silvestres das duas áreas;

METODOLOGIA:

O estudo será desenvolvido em remanescentes florestais das áreas urbanas de Campo Grande (um deles o Parque Estadual do Prosa-UC Estadual) e Corumbá, Mato Grosso do Sul, em fragmentos determinados a partir do grau de urbanização de seu entorno. Serão utilizados fragmentos presentes nos vazios urbanos do município (além da UC Prosa) que contemplem áreas privadas, e que terão seu nível de urbanização do entorno avaliado segundo Índice de Área de Superfície Impermeável. Serão escolhidos fragmentos que representam quatro classes de urbanização: 1) Baixa; 2) Média-Baixa; 3) Média-Alta; 4) Alta.

EQUIPE:

- 1- Jaire Marinho Torres
- 2- Felipe Martins Santos
- 3- Heitor Miraglia Herreira
- 4- Alex Paulvolíd
- 5- Gabriel Carvalho de Macedo
- 6- Wanessa Teixeira Gomes Barreto
- 7- Leonardo França do Nascimento
- 8- Paula Helena Santa Rita

DAS OBSERVAÇÕES/CONDICIONANTES:

1. Esta Autorização é válida **APENAS** para as atividades descritas acima, durante o período de vigência estabelecido.
2. Esta autorização é válida por 1(um) ano, podendo ser renovada, caso necessário, através de pedido a GUC/IMASUL/SEMADE.
3. Fica estabelecido que os componentes da equipe deverão se apresentar ao (à) gerente ou responsável pela Unidade de Conservação todas as vezes que for necessário o acesso à Unidade de Conservação, portando a presente autorização.
4. **O responsável pelo projeto deverá apresentar relatório parcial das atividades de campo semestral, que deverá conter, no mínimo: as atividades desenvolvidas, equipe envolvida, resultados alcançados e demais informações julgadas necessárias e/ou solicitadas pela GUC/IMASUL/SEMADE.**
5. **O responsável pelo projeto deverá apresentar relatório final, em duas vias impressas e digital no máximo 90 (noventa) dias após o término da validade desta autorização, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente autorização.**
6. **O responsável pelo projeto deverá entregar cópia de trabalho científico produzido ou quaisquer publicações oriundas desta autorização a GUC/IMASUL/SEMADE.**
7. O pesquisador e a equipe deverão sujeitar-se as normas internas da UC apresentadas pelo GUC/IMASUL/SEMADE, como portar esta autorização durante a permanência da equipe na área.
8. Quaisquer inclusões e/ou exclusões de membros da equipe deverão ser comunicadas, com antecedência, por escrito a GUC/IMASUL/SEMADE.



ANEXO F (continuação)

9. Todos os custos operacionais ficam a cargo do responsável pelo projeto, exceto eventuais apoios da GUC/IMASUL/SEMADE, claramente estabelecidos nesta Autorização.
10. Os produtos desta pesquisa que nos forem enviados ficarão anexados no processo e a disposição na GUC/IMASUL/SEMAC, para consulta quando necessário.
11. As publicações ou manifestações públicas do projeto deverão fazer referência a Unidade de Conservação pesquisada e apoio recebido.
12. Cumprir o preconizado na Resolução CFBio nº 302/2012 e portaria CFBio nº148/2012;
13. Adoção de cuidados necessários para que o processo de coleta não promova redução excessiva da fauna local;
14. Os exemplares capturados e identificados no local que não necessitam serem sacrificados deverão ser manuseados em tempo necessário para sua devolução ao meio ambiente em condições de sobrevivência;
15. Todas as armadilhas deverão ser georreferenciadas e ao final das coletas deverão ser recolhidas;
16. Quando as armadilhas não estiverem sendo usadas, deverão permanecer fechadas para evitar que animais sejam capturados.
17. Esta Autorização não permite o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, no território sul-mato-grossense, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial (Medida provisória nº 2.186-14 de 28 de junho de 2001; Decreto 4946/03 de 31 de dezembro.).
18. O não cumprimento das disposições constantes nesta Autorização Ambiental de Pesquisa e na Resolução SEMADE 09/2015, ou a violação de quaisquer condicionantes estabelecidos ou ainda, a violação ou inadequação de normas legais, importará na suspensão e/ou cancelamento da Autorização expedida, sem prejuízo da aplicação de multa e providências judiciais cabíveis.

Campo Grande, 14 de março de 2017.


Jaime Elias Verruck
Diretor-Presidente do IMASUL

ANEXO G

SEMA
SECRETARIA DE
ESTADO DE
MEIO AMBIENTEGOVERNO DO
MATO GROSSO
ESTADO DE TRANSFORMAÇÃO

MATO GROSSO ESTADO DE TRANSFORMAÇÃO

WWW.MT.GOV.BR

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA	
EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL Nº 003/2017	
Processo nº: 201624/2017	Validade: 30/05/2017 a 30/12/2017
Coordenador: Profª Drª RENATA DEZENGRINI SLHESSARENKO	CPF: 006 990 439 -13
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO – Campus Cuiabá /MT	
Projeto: “ECOLOGIA DE VÍRUS ZIKA EM VERTEBRADOS E MOSQUITOS NEOTROPICAIS DO BRASIL”	
<p>Recomendações e limitações:</p> <p>1-Esta autorização garante ao Coordenador do Projeto e aos pesquisadores o direito de acesso ao interior do Parque Estadual Massairo Okamura, com o objetivo de: 1-Avaliar a exposição de vertebrados não humanos ao ZIKV, incluindo animais selvagens de cativeiro e de vida livre e também animais domésticos em regiões de atividades do vírus ; 2) Contribuir para o conhecimento sobre o envolvimento de vertebrados no (s) ciclo(s) de transmissão de ZIKV; 3) Investigar a presença de ZIKV em diferentes espécies de mosquitos para melhor compreender as espécies que podem participar como vetores no Brasil.</p> <p>2- A execução dos trabalhos de pesquisa deverão obedecer todas as condicionantes dispostas no Parecer Técnico nº 082/CUCO/SUBIO/SAGA/SEMA/2017;</p> <p>3 -Para renovação desta autorização é obrigatória apresentação à SEMA-MT/CUCO, de relatório parcial das atividades e ao fim do período o coordenador deve apresentar, o relatório circunstanciado no aditamento e relatório final;</p> <p>4- Deverá ser apresentada à Gerencia da UC, uma listagem das presenças dos dias de campo com o nome dos participantes do projeto com o número da RG correspondente;</p> <p>5- Deverá ser apresentado à Gerencia da UC e à CUCO/SEMA, um cronograma de execução dos trabalhos de campo a ser realizados nos semestres com o objetivo de garantir os planejamentos de atividades do Parque. Assim como, um ofício de confirmação das atividades de campo, previstas no “cronograma de execução” para aprovação pela CUCO/SEMA, com antecedência de 20 (vinte) dias.</p> <p>6- Todas as expedições a campo deverão ser previamente agendadas com o gestor do Parque Estadual Mãe Bonifácia.</p> <p>7- Deve ser enviado à SEMA-MT/CUCO, uma cópia em meio impresso e digital</p>	

PARECER TÉCNICO Nº 082/CUCO/SUBIO/SAGA/SEMA/2017

ASSUNTO: Licença de Pesquisa Científica –PARQUE ESTADUAL MASSAIRO OKAMURA

INTERESSADO: RENATA DEZENGRINI SLHESSARENKO

Nº PROCESSO: 201624/2017

1. ANÁLISE

O presente parecer é referente à solicitação de Licença de Pesquisa Científica em Unidade de Conservação, para o Parque Estadual Massairo Okamura. A parte interessada é a Profª. Drª Renata Dezengrini Slhessarenko CPF 00699043913 professora da Fundação Universidade Federal do Mato Grosso no município de Cuiabá/MT. A solicitante é Coordenadora do projeto de pesquisa denominado "Ecologia de Virus Zika em Vertebrados e Mosquitos Neotropicais do Brasil" no Parque Estadual Massairo Okamura.

De acordo com o projeto de pesquisa científica apresentado, em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou que a epidemia de ZIKV e sua associação com casos de microcefalia e outras condições neurológicas constituíram uma emergência internacional de saúde pública.

O presente estudo se consolida como um esforço para entender melhor a ecologia da ZIKV no Brasil, visando obter uma visão mais clara do atual cenário ZIKV no país.

O projeto de pesquisa científica tem por objetivos: 1-Avaliar a exposição de vertebrados não humanos ao ZIKV, incluindo animais selvagens de cativeiro e de vida livre e também animais domésticos em regiões de atividades do vírus; 2) Contribuir para o conhecimento sobre o envolvimento de vertebrados no (s) ciclo(s) de transmissão de ZIKV; 3) Investigar a presença de ZIKV em diferentes espécies de mosquitos para melhor compreender as espécies que podem participar como vetores no Brasil.

O estudo tem três fases distintas:

Fase 1 - Seleção dos locais de estudo;

Fase 2- Coleta de amostras;

Fase 3- Análise laboratorial dos espécimes coletados.

Áreas de estudo:

- Estado de Mato Grosso do Sul (arredores de Campo Grande e Corumbá)

ANEXO H

Whole blood Extraction with ZR-96 Viral RNA extraction kits (for whole blood samples only)

These methods are adapted from the manufacturer extraction methods (accessible at <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/148/r1040i.pdf>)

Buffer Preparation

- Before starting, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the Viral RNA Buffer to a final dilution of 0.5%(v/v). 500 µL of beta-mercaptoethanol per 100 mL of Viral RNA Buffer.
- Add 198 ml 100% ethanol (204 ml 95% ethanol) to the 48 ml Viral Wash Buffer concentrate.

Protocol

All centrifugation steps should be performed at 3,000 – 5,000 x g (5200 rpm) unless otherwise noted. The entire protocol is performed at room temperature (24-26C).

1. Add 450 µL of **Viral RNA Buffer** to an RNAase/DNAase-free tube. Prior to removing blood for extraction, mix the entire whole blood sample with pipetting or brief vortexing. Add 150 µL of sample to the Viral RNA buffer.
 - a. Notes: when adding the sample to the buffer, clotting may occur. Do your best to mix using a pipette or vortex if necessary. Quickly mixing with the pipet seems to reduce the amount of clotting that occurs. If present, the clot does not need to be completely dissolved for successful extraction.
2. Incubate at room temperature (24-26C) for 90 minutes.
3. Briefly, vortex each sample and then centrifuge the sample at 12,000 rpm (26611 x g) for 5 minutes.
4. After centrifugation, there will be a supernatant (550 uL) and a small pellet. Transfer only the supernatant to the **Zymo-Spin™ I-96 Plate** mounted on an **Collection Plate** and centrifuge at top speed (5650 rpm) for 20 minutes. Discard the flow-through. Note: the pellet is hard to distinguish from supernatant, be extra careful with the transfer not to include any of the pellet.
 - a. If the sample does not pass through the column, or the column is still strongly discolored, centrifuge for an additional time at the top speed.
5. Add 250 µL **Viral Wash Buffer** to the column and centrifuge for 10 minutes. Discard the flow-through. Pour the collection plate onto an absorbent paper to remove excess.
6. Repeat step 5.
7. Then, carefully transfer the column plate onto an **Elution Plate**. Add ≤80 µL **DNase/RNase-Free Water** directly to each well and centrifuge for 5 minutes.

ANEXO H (continuação)

8. Eluted RNA can be used immediately or stored at -70°C .
9. At the end, cover the plate with an adhesive film.

ANEXO I

Real Time PCR for Flaviviruses

Moureau G., Temmam S., Gonzalez JP., Charrel RN., Grard G., De Lamballerie X. A Real-Time RT-PCR method for the universal detection and identification of Flaviviruses. *Vector-borne and zoonotic diseases* 2007; 7(4): 467-477.

Reagents:

- **Quantinova SYBR® Green RT-PCR**
- **Oligo Resuspension and Storage**

All DNA oligonucleotides that are provided dry are ready for use upon resuspension, with the exception of Thiol modified oligos. We recommend resuspending oligos in a weak buffer such as TE buffer (10 mM Tris, pH 7.5 – 8.0, 1 mM EDTA, diluted from Product No. T9285). In applications in which TE is not suitable, sterile nuclease-free water (Product No. W4502) may be used. However, high grade water may be slightly acidic and is not recommended for long-term storage. In RNA-related applications, DEPC treated water may be used, but residual DEPC may inhibit subsequent enzymatic reactions. Single-stranded RNA oligos should be resuspended as described above for DNA oligos.

For all oligos a 100 μ Molar stock solution may be obtained by using the following guideline. Take the number of nanomoles (nm) provided (information found on the tube label and/or quality assurance document) and multiply the number of nanomoles by ten. The result provides the number of microliters of liquid (TE, Tris, water or other buffer as required) to add to the tube for reaching a final concentration of 100 μ Molar. Note that this is equivalent to a stock solution of 100 pmol/ μ L. The stock solution may then be further diluted as necessary based upon the application requirements. Store the stock solution at - 20 °C in a non-frost-free freezer, and avoid multiple freeze-thaw cycles. Single-stranded RNA oligos should be stored at - 80 °C.

Primers dilution

PF2R-BIS

Concentration: 62831 picomoles = 62,83 nmoles nmoles

Volume: 628 μ L of water (Elution buffer better)
62,83 nmoles + 628 μ L water = 100 μ M

Working dilution 1:9,05 = 11,04 μ M/ μ L

11,04 μ M in a 20- μ L final volume = 0,55 μ M

PF1S

Concentration: 126572 picomoles = 126,57

Volume: 1266 μ L of water (Elution buffer better)
126,57 nmoles + 1266 μ L water = 100 μ M

Working dilution: 1:9,05 = 11,04 μ M/ μ L

11,04 μ M in a 20- μ L final volume = 0,55 μ M

ANEXO I (continuação)

Primers:

PF1S: TGY-RTB-TA Y -AA C- ATG-ATG-GG

PF2R-bis GTG-TCC-CA I-CCN-GCN-GTR- TC

20- μ L final volume:

- 8 μ L of RNA
- 10 μ L of 2X Quantinova® RT- PCR Master Mix
- 0,2 μ L of Quantinova RT Mix
- 0,8 μ L PF1S of working dilution at 1:9,05 (0.55 μ M)
- 0,8 μ L PF2R-bis of working dilution at 1:9,05 (0.55 μ M)
- 0,2 μ L of water

The cycling program

- 50°C for 10 min
- 95°C for 2 min
- **40 cycles** consisting of:
- 94°C for 15 seconds
- 50°C for 30 seconds
- 72°C for 45 seconds
- Melting curve 55°C to 95°C, increasing 0.5°C and staying in each step for 30 seconds (Data collection)

Analysis of the melting curve of specific PCR products was performed by slowly raising the temperature of 85°C by means of regular fluorescence measurements.

ANEXO J

Protocolo de detecção de ZIKV

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1232–1239.

Ressuspensão dos iniciadores e sonda:

Zika1087

63,41 nmoles

Adicionar 634 uL de H₂O

Zika1163c

102,42 nmoles

Adicionar 1025uL de H₂O

Concentração final de 100uM

Zika1108 pr-FAM

29,5 nmoles

Adicionar 1180uL

Concentração final de 25uM

Volume para uma reação (50uL):

10,2uL water

25uL Quantitec probe RT-PCR master mix

0,5uL RTMIX

0,5 **zika1087** [100uM]

0,5 **zika1163a** [100uM]

0,3uL **zika1108** pr-FAM [25uM]

5uL RNA

Ciclagem:

45 ciclos

50°C por 30min

95°C por 15min

95°C por 15seg

60°C por 1min

ANEXO K

Protocolo de sequenciamento

Os produtos das amostras reativas na RT-PCR genérico para flavivírus serão submetidas a purificação seguida de reação de sequenciamento e sequenciamento nucleotídico.

Purificação

- 1- Protocolo para produto de 100 bp até 10000 bp.
- 2- Na primeira vez, adicionar 220 mL de etanol (96-100%) em 55 mL de tampão de lavagem (Buffer PE – wash buffer) e marcar na tampa do frasco.
- 3- Centrifugar a 13,000 rpm (17,900 x g).
- 4- Adicionar 1:250 do indicador de pH I ao tampão PB (tampa vermelha). Como o frasco de PB tem 150 mL, retirar 600 microlitros de PB e adicionar 600 microlitros do indicador de pH I e marcar no frasco. O tampão ficará amarelo se o $\text{pH} \leq 7.5$, que é quando a adsorção do DNA na membrana é eficiente.
- 5- Adicionar o tampão PB em volume de 5X o volume do produto do RT-PCR. Exemplo: para 20 microlitros de produto de RT-PCR, adicione 100 microlitros do tampão PB. Se a coloração ficar laranja ou violeta, adicionar 10 microlitros de acetato de sódio, pH 5, e vortexar. O volume ficará amarelo.
- 6- Coloque a coluna com a membrana em um tubo de 2 mL, e adicione o volume final de produto de RT-PCR mais o tampão PB e centrifugue por 1 minuto, e depois descarte o centrifugado.
- 7- Para lavagem, adicione 750 microlitros de tampão PE e centrifugue por 1 minuto. Descarte o centrifugado e coloque a coluna com a membrana de volta no mesmo tubo.
- 8- Centrifugue mais uma vez a coluna com membrana no tubo de 2 mL por 1 minuto para remover tampão de lavagem residual.
- 9- Coloque a coluna com a membrana em um novo tubo de 1.5mL.
- 10- **Para eluição do DNA adicione 30 microlitros de tampão EB e deixe por 1 minuto e então centrifugue.** Opcionalmente, adicione 50 microlitros de tampão EB ou água no centro da coluna com membrana, e centrifugue por 1 minuto.
- 11- Para submeter o DNA purificado em eletroforese em gel, adicionar 1 volume de *loading dye* em 5 volumes de DNA purificado, e homogeneíze com micropipeta antes de colocar no gel.

Reação de sequenciamento a ser realizada na Plataforma de sequenciamento da Fiocruz

- 1- Para reações de sequenciamento, são recomendados de 3 a 10 nanogramas de massa de produto para fragmento entre 200 e 500 pares de bases. **Como o fragmento do protocolo genérico para flavivírus é de 270, utilizaremos 10 nanogramas em até 6,5 microlitros de volume de produto por reação.** Opcionalmente, pode-se utilizar de 6 a 10 nanogramas de massa.

ANEXO K (continuação)

2- Para quantificação utiliza-se a máquina nanodrop® para se descobrir a concentração de nanogramas por microlitro do produto. Caso a concentração esteja acima de 10 nanogramas por microlitro será necessária diluição em EB antes da reação de sequenciamento[§]. Caso esteja abaixo de 10 nanogramas por microlitro, utiliza-se de 1,1 a 6,5 microlitros de volume na reação de sequenciamento[&]. Opcionalmente, utiliza-se como padrão 3 microlitros de produto.

[®]Laboratório de Imunofarmacologia da Patrícia Bozza no Pavilhão 108 gentilmente permite a utilização.

Para leitura do nanodrop utiliza-se 2 microlitros do volume final de 30 microlitros de DNA eluído. Desta forma, para calcular a diluição caso necessária deve-se considerar um volume restante final de 28 microlitros de DNA.

[§] Por exemplo, uma amostra que apresentou concentração de 18,6 nanogramas por microlitro tem 520,8 nanogramas de massa total em 28 microlitros. Assim, divide-se a massa total de 520,8 por 10 (que é a concentração final que se quer chegar) para se chegar ao volume final de DNA necessário para concentração de 10 nanogramas por microlitro. Desta forma, adiciona-se aos 28 microlitros de DNA eluído 24,1 microlitros de EB, resultando em 52,1 microlitros de volume final resultando em concentração final de 10 nanogramas por microlitro. Neste caso, para reação de sequenciamento então serão utilizados 1 microlitro de DNA diluído (10 nanogramas) com 5,5 microlitros de água. Como se pode ver abaixo, para reação de sequenciamento utiliza-se 6,5 microlitros de água mais DNA para completar 10 microlitros de reação.

[&] Por exemplo, uma amostra que apresentou concentração de 7,2 nanogramas por microlitro tem 201,6 nanogramas de massa total em 28 microlitros. Assim, divide-se 10 (que é a concentração final que se quer chegar) por 7,2 que é a concentração da amostra para se chegar ao volume de DNA necessário para concentração de 10 nanogramas por microlitro. Neste exemplo, serão utilizados 1,4 microlitros de DNA (10 nanogramas) com 5,1 microlitros de água. Como se pode ver abaixo, para reação de sequenciamento utiliza-se 6,5 microlitros de água mais DNA para completar 10 microlitros de reação.

A plataforma da Fiocruz pede 10 microlitros de volume final para reação de sequenciamento. Desta forma, sugere-se a seguinte reação por amostra com os dois iniciadores:

Big dye	1 microlitro Big dye
Tampão (5X Buffer Big dye)* ²	1,5 microlitros de tampão
Iniciador (PF1S*) 3.2 micromolar	1 microlitro
Produto	De 1 a 6,5 microlitros (10 ng)
Água qs 10 microlitros	De 0 a 5,5 microlitros
Big dye	1 microlitro Big dye
Tampão (5X Buffer Big dye)* ²	1,5 microlitros de tampão
Iniciador (PF2R-bis*) 3.2 micromolar	1 microlitro
Produto	De 1 a 6,5 microlitros (10 ng)
Água qs 10 microlitros	De 0 a 5,5 microlitros

ANEXO K (continuação)

*Iniciador a 100 micromolar, 1/31,25 em EB = 3,2 micromolar por microlitro.

Como exemplo, para um volume final de primer de 70 microlitros dilui-se 3 microlitros de primer da solução estoque em 90,75 microlitros de EB

*² Buffer 5X terminator é mantido na geladeira e não junto com o kit no congelador

Termociclagem

Considerando o protocolo de sequenciamento usado no CDC, o protocolo de sequenciamento utilizado pela plataforma de sequenciamento e a RT-PCR para flavivírus que originou o produto, o seguinte protocolo de 40 ciclos foi elaborado:

A reação está gravada no termociclador LABFLA0175:

- User: Alex
- Run: Sequ-CDC

Duração:

- Aproximadamente 3h e 10 minutos

Ciclos de temperatura:

- 1- Ramp 1 grau por segundo até 96C
- 2- 95 C por 15 segundos
- 3- Ramp 1 grau por segundo até 50C
- 4- 52 C por 30 segundos
- 5- Ramp 1 grau por segundo até 60C
- 6- 60C por 4 minutos

Go to 39X

- 1- Ramp 1 grau por segundo até 96C
- 2- 95 C por 15 segundos
- 3- Ramp 1 grau por segundo até 50C
- 4- 52 C por 30 segundos
- 5- Ramp 1 grau por segundo até 60C

ANEXO K (continuação)

- 6- 60C por 4 minutos
- 7- Ramp 1 grau por segundo até 4C
- 8- 4C mantendo

Cobrir a placa com filme, envolver em alumínio e submeter ao sequenciamento. Caso a reação termine após o prazo de entrega, deixar a placa congelada a -20C até a entrega no dia seguinte.

Para utilização da plataforma de sequenciamento da Fiocruz, informar que apenas a reação de big dye foi feita e por isso havendo necessidade da plataforma fazer a precipitação e dar continuidade ao sequenciamento nucleotídico.

Plataforma de sequenciamento nucleotídico da Fiocruz

Telefone:

- 3865-8121

Local:

- Pavilhão 26 sala 110

Recebimento das placas:

- Segundas, Quartas, Quintas e Sextas-feiras entre 10:00h e 11:30h
- Terças-feiras entre 11:00h e 12:00h
- Levar os formulários preenchidos (ID: LIV)

Caso a reação termine após o prazo de entrega, deixar a placa congelada a -20C até a entrega no dia seguinte.

Resultados:

- Até 15 dias para os resultados
- A partir de 7 dias já se pode ligar para saber se já está pronto.

No dia da busca deve-se levar um CD para gravação dos resultados.

ANEXO L

Aplicativo do Estudo ecológico de vírus Zika no Brasil

Formulário de coleta de amostras:

1. Nomes dos manipuladores: _____

2. São dados retrospectivos (dados de uma coleta anterior)?
Não () Sim () Data da coleta: ____/____/____

3. País:
Brasil () Colômbia () Peru ()

4. Sítios:
Cuiabá () Campo Grande () Outro: _____

5. Nome do local de coleta: _____

6. Coleta de amostra:
a) Mesmo local que o animal foi capturado ()
b) Local diferente do local de captura ()

7. Coordenadas de GPS:
a) Latitude: _____
b) Longitude: _____
c) Elevação: _____
d) Acurácia (m): _____

8. Temperatura ambiental: _____

ANEXO L (continuação)

9. Clima

- a) Chuvoso ()
- b) Nublado ()
- c) Parcialmente nublado ()
- d) Ventando ()
- e) Ensolarado ()
- f) Noite ()
- g) Processamento não realizado ao ar livre ()

10. Umidade relativa: _____

11. Captura:

- a) Sherman ()
- b) Tomahawk ()
- c) Mist net ()
- d) Gaiola ou rede com isca em plataforma acima do solo ()
- e) Dardo com anestésico ()
- f) Zarabatana ()
- g) Captura manual ()
- h) Corvo: _____

12. Código de barras da armadilha ou transecto: _____

13. Recaptura:

Não ()

Sim () Espécie do animal e número/marcação: _____

Sendo recaptura não precisa responder as outras perguntas

14. Código de barras do animal: _____

15. Respiração do animal:

Normal ()

Anormal ()

- a. Espirrando () Quantos espirros por minuto? _____
- b. Tossindo () Quantas tosses por minuto? _____
- c. Respiração ruidosa ()

ANEXO L (continuação)

d. Narina com secreção ()

16. Atividade do animal:

- a) Agitado ()
- b) Normal ()
- c) Letárgico anormal ()
- d) Letárgico natural para a biologia ou período de atividade da espécie ()
- e) Imóvel ()
- f) Ferido () Qual ferimento? _____

17. Foi utilizada anestesia/sedação para captura?

Não ()

Sim ()

- | | |
|------------------|--------------------|
| Zoletil () | Dose por kg: _____ |
| Quetamina () | Dose por kg: _____ |
| Midazolam () | Dose por kg: _____ |
| Xilazina () | Dose por kg: _____ |
| Acepromazina () | Dose por kg: _____ |
| Detomidina () | Dose por kg: _____ |
| Medetomidina () | Dose por kg: _____ |
| Diazepam () | Dose por kg: _____ |
| Isoflurano () | Dose por kg: _____ |
| Halotano () | Dose por kg: _____ |
| Propofol () | Dose por kg: _____ |

ANEXO L (continuação)

18. Alguma outra medição?

Não ()

Sim ()

Adrenalina () Dose por kg: _____

Atropina () Dose por kg: _____

Dexametasona () Dose por kg: _____

Doxapram () Dose por kg: _____

Glicopirrolato () Dose por kg: _____

Antibiótico () Qual e dose por kg: _____

AINES () Qual e dose por kg: _____

Lidocaína () Dose por kg: _____

Fluidoterapia () Volume: _____

19. Tirou foto do animal?

Não ()

Sim () Nome: _____

20. Animal:

Número Registro local: _____

Doméstico de abrigo ()

Nome animal: _____

Nome abrigo: _____

Doméstico de protetor(a) ()

Nome animal: _____

Nome protetor(a): _____

Doméstico instituição pública ()

Nome animal: _____

Nome instituição: _____

Doméstico de vida livre ()

Doméstico propriedade privada ()

Nome animal: _____

Nome proprietário: _____

Animal silvestre em vida livre ()

Animal silvestre em cativeiro ()

Cativeiro desde quando? _____

De onde foi trazido? _____

Nome do animal? _____

ANEXO L (continuação)

Nome do local: _____

21. Classe do animal:

Mamífero ()

Espécie: _____

Anfíbio ()

Espécie: _____

Réptil ()

Espécie: _____

Ave ()

Espécie: _____

22. Idade exata?

Sim ()

Idade: _____

Não ()

Filhote ()

Jovem sub-adulto ()

Adulto ()

Idoso ()

Não sei ()

23. Sexo:

Macho ()

Inteiro ()

Castrado ()

Fêmea ()

Cio ()

Prenhe ()

Lactante (com leite) ()

Com filhote ()

Castrada ()

Desconhecido estado reprodutivo ()

Sexo Desconhecido ()

ANEXO L (continuação)

24. Mobilidade dos membros e cauda:

Normal ()

Anormal ()

Ferimento aparente ()

Tipo: _____

Membro afetado: _____

Completamente não utilizado ()

Parcialmente não utilizado ()

25. Pelo do animal:

Normal ()

Anormal ()

1-25% afetado ()

26-50% afetado ()

51-75% afetado ()

76-100% afetado ()

Cor em escala de 0-claro até 4-escurecido ()

Brilho em escala de 0-brilhoso até 4-opaco ()

Maciez em escala de 0-macio até 4-áspero ()

26. Ectoparasitas:

Não ()

Sim ()

Pulgas ()

Carrapatos ()

Piolhos ()

Outro: _____

ANEXO L (continuação)

27. Condição corporal:
- Muito magro ()
 - Um pouco abaixo do peso normal ()
 - Peso ideal ()
 - Um pouco acima do peso ()
 - Obeso ()
28. Comentários que devem incluir marcas, cicatrizes, ferimentos, ausência de membros ou cauda, etc.
29. Amostras:
- Não coletadas ()
 - Sangue:
 - Citrato de sódio ()
 - EDTA ()
 - Sem anticoagulante ()
 - Outro: _____
 - Swab oral ()
 - Swab fecal ()
 - Urina ()
 - Pele ()
 - Ectoparasitas () Qual? _____
 - Outro: _____

ANEXO L (continuação)

30. Eutanásia:

Não ()

Morreu durante procedimento ()

Sim ()

Exsanguinação ()

Quetamina/xilazina ()

Beuthanasia/Euthanex ()

Pentobarbital sódico ()

Secobarbital ()

T61 ()

Cloreto de potássio ()

CO2 ()

Arma de fogo ()

Cervical dislocation ()

31. Amostras de tecidos coletadas:

Não ()

Sim ()

Cérebro ()

Fígado ()

Baço ()

Rins ()

Órgãos reprodutivos ()

Pulmões ()

Músculo ()

Coração ()

Olhos ou glândulas lacrimais ()

Intestino ()

Fetos ()

Outros: _____

ANEXO L (continuação)

Formulário de checagem de armadilhas para vertebrados:

1. Nomes dos manipuladores: _____
2. Data da checagem da armadilha: _____
3. Horário da checagem da armadilha: _____
4. São dados retrospectivos (dados de uma checagem anterior)?
Não () Sim () Data da coleta: ____/____/____
5. País:
Brasil () Colômbia () Peru ()
6. Sítios:
Cuiabá () Campo Grande () Outro: _____
7. Nome do local de coleta: _____
8. Área do local de coleta (m²): _____
9. Temperatura ambiental: _____
10. Clima
 - a) Chuvoso ()
 - b) Nublado ()
 - c) Parcialmente nublado ()
 - d) Ventando ()
 - e) Ensolarado ()
 - f) Noite ()

ANEXO L (continuação)

11. Umidade relativa: _____

12. Terreno

- a) Montanhas ()
- b) Vale ()
- c) Planalto ()
- d) Planície ()
- e) Outro: _____

13. Característica ambiental

- a) Urbano ()
- b) Peri-urbano ()
- c) Rural ()
- d) Área não habitada ()
- e) Parque florestal dentro da cidade ()
- f) Fazenda de turismo/agropecuária ()
- g) Área de restinga ()
- h) Outro: _____

14. Cobertura florestal

- a) Floresta de conífera ()
- b) Floresta decídua ()
- c) Floresta Semi-decídua ()
- d) Floresta tropical ()
- e) Área urbanizada ()
- f) Outro: _____

15. Aspecto de conservação da área

- a) Mata primária ()
- b) Mata secundária ()
- c) Pastagem ()
- d) Capinzal ()
- e) Beira de mata ()
- f) Outro: _____

ANEXO L (continuação)

16. Sinais de antropização

- a) Trilhas ()
- b) Estradas de terra ()
- c) Estradas pavimentadas ()
- d) Residências ()
- e) Área de construção ()
- f) Prédios comerciais ()
- g) Animais domésticos ()
- h) Lixo ()
- i) Sinais de queimada ()
- j) Nenhum ()
- k) Outro: _____

17. Localização das armadilhas

- a) Individual ()

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____
- Acurácia (m): _____

Residência? Endereço: _____

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____ Copa de árvore () altura aproximada: _____
- Acurácia (m): _____

ANEXO L (continuação)

Residência? Endereço: _____

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____ Copa de árvore () altura aproximada: _____
- Acurácia (m): _____

Residência? Endereço: _____

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____ Copa de árvore () altura aproximada: _____
- Acurácia (m): _____

Residência? Endereço: _____

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____ Copa de árvore () altura aproximada: _____
- Acurácia (m): _____

Residência? Endereço: _____

local: _____ # do CDC: _____

- Latitude: _____
- Longitude: _____
- Elevação: _____ Copa de árvore () altura aproximada: _____

ANEXO L (continuação)

- Acurácia (m): _____
18. Tipo de armadilha
- a) Sherman ()
 - b) Tomahawk ()
 - c) Mist net ()
 - d) Gaiola ou rede com isca em plataforma ()
 - e) Corvo para répteis ()
 - f) Manual ()
 - g) Outra: _____
19. Utilizada isca? Não () Sim () Qual? _____
20. Armadilha encontrada no mesmo local em que foi deixada?
- Sim ()
- Não () Onde foi encontrada? _____
21. Armadilha estava ainda armada?
- Sim ()
- Não () Qual problema? _____
22. Foto tirada da armadilha
- Sim () Número da foto: _____
- Não ()
23. Armadilha contém animais?
- Sim () Qual? _____
- Não ()

