



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AGENTES
INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS E
PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA SANDUÍCHE
INDIRETO PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM
HERBÍVOROS DOMÉSTICOS**

ALEXANDRE DO ROSÁRIO CASSEB

Belém-Pará
2010

ALEXANDRE DO ROSÁRIO CASSEB

**SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS E
PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA SANDUÍCHE
INDIRETO PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM
HERBÍVOROS DOMÉSTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará
como requisito final para obtenção do grau de Doutor em
Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.
Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa
Vasconcelos

Belém-Pará
2010

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Casseb, Alexandre do Rosário

Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste Elisa sanduíche indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos / Alexandre do Rosário Casseb; orientador, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos. – 2010.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2010.

1. Arbovírus. 2. Teste imunoenzimático. 3. Herbívoros. I. Título.

CDD – 20. ed. 576.6484

ALEXANDRE DO ROSÁRIO CASSEB

**SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS E
PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA SANDUÍCHE
INDIRETO PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM
HERBÍVOROS DOMÉSTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Instituto Evandro Chagas

Banca Examinadora: Prof^a. Dr^a. Conceição de Maria Almeida Vieira
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes
Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu

Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Instituto Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Lívia Carício Martins
Instituto Evandro Chagas

Suplentes: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa
Instituto Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Sueli Guerreiro Rodrigues
Instituto Evandro Chagas

Belém, 30 de Setembro de 2010.

EPÍGRAFE

*“Não tenhamos pressa, mas não
percamos tempo”*

José Saramago (1922-2010)

DEDICATÓRIA

Aos meus alunos, aos meus pais e irmãos, à minha esposa e filhos, dedico esta Tese.

AGRADECIMENTOS

À família Casseb: Paulo (*in memoriam*) e Nina (pais); Guilherme, Ana Maria, Emília, Franceuza, Nazaré, Akel, Adma e Jorge, que muito ajudou nas correções e idéias para a tese (irmãos); sobrinhos, principalmente ao Samir que auxiliou no desenvolvimento da técnica de ELISA; a Livia (esposa), que muito ajudou na formatação, análise estatística e incentivo para a realização da tese; Iago e Hugo (filhos).

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) na pessoa da diretora Dr^a. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos por gentilmente ceder as instalações e materiais utilizados neste estudo.

À universidade Federal do Pará (UFPA) por tornar por possível a realização dessa tese, assim como a todos os professores do Curso em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas, que muito colaboraram com a minha formação.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) na pessoa do reitor o Prof. Sueo Numazawa que sempre me incentivou.

Aos meus alunos que entenderam a minha ausência da UFRA durante a realização do trabalho prático dessa tese.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos que aceitou me orientar, e fez as devidas correções e recomendações durante todo o período desse estudo, e principalmente pela amizade que foi adquirida no decorrer da elaboração dessa tese.

Aos amigos da sorologia I e II, Dr^a. Lívia Carício, Dr^a. Jannifer Chiang, MsC. Daniele Henriques, Dr^a. Elizabeth Salbé, Dr^a Sueli Rodrigues, Dr. Márcio Nunes e aos técnicos: Basílio, Assis, Eupídia, Eliana e Maxwell, por todo o apoio nas horas que precisei de auxílio no laboratório, assim como sugestões para a realização das técnicas.

Aos Médicos Veterinários de campo que muito auxiliaram na coleta das amostras de soro em todo o estado do Pará, Alacid Nunes Filho, Ângela Clotilde Sousa de Jesus, Ângelo Carvalho, Camargo Júnior, Carlos Mota, Davi Araújo, Elisângela Borges, Márcio Nóvoa, Maurício Cordeiro, Mauro Viana, Rogério Souza, Sandro Patroca, Suiane Ribeiro, sem ajuda deles não seria possível a realização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora Professores Doutores Antônio Carlos Paes, Hélio Langoni (qualificação), Márcio Nunes, Conceição Vieira, Lívia Martins, Sueli Rodrigues e Elizabeth Salbé que aceitaram o convite para participarem da banca de avaliação que com certeza engrandeceram esse trabalho.

Aos servidores, contratados, estagiários, monitores do ISPA/UFRA e SAARB/IEC, pelo ambiente familiar e de confraternização que é mantido nesses ambientes de trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	pág.
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	14
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
1.2 ETIOLOGIA	23
1.3 ARBOVÍRUS ISOLADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	28
1.4 CICLOS DE MANUTENÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DOS ARBOVÍRUS.....	30
1.5 MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ E HERBÍVOROS DOMÉSTICOS	36
1.6 ARBOVÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	37
1.7 IMUNIDADE HUMORAL E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRETO E INDIRETO DOS ARBOVÍRUS	45
1.8 OBJETIVOS	49
1.8.1 Objetivo Geral	49
1.8.2 Objetivos Específicos	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	51
2.2 ANIMAIS E AMOSTRAS PARA AS PROVAS SOROLÓGICAS	52
2.3 LOCAIS DE COLETA.....	53

2.4	MÉTODOS SOROLÓGICOS.....	54
2.4.1	Detecção de Anticorpos IH.....	54
2.4.1.1	Princípio do Teste.....	55
2.4.1.2	Tratamento do Soro.....	56
2.4.1.3	Preparação dos Antígenos:.....	57
2.4.1.4	Reagentes e Preparação das Hemácias.....	59
2.4.1.5	Teste de IH.....	60
2.4.1.6	Leitura e Interpretação do Teste IH.....	61
2.4.2	Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG de Equinos, Bovinos, Bubalinos e Ovinos.....	62
2.4.2.1	Princípio do Teste.....	62
2.4.2.2	Anticorpos de Captura para Sensibilização das Microplacas e Bloqueio.....	64
2.4.2.3	Antígenos.....	64
2.4.2.4	Soros Controles.....	65
2.4.2.5	Validação e <i>Cut-off</i> do Teste.....	66
2.4.2.6	Anticorpos Conjugados.....	66
2.4.2.7	Revelação do Teste.....	67
2.4.2.8	Procedimento da Técnica para Padronização.....	67
2.4.2.9	Amostras Testadas para o Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG e Comparadas com os Resultados do Teste IH (Padrão Ouro).....	70
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
3	RESULTADOS.....	73

3.1	RESULTADOS DO TESTE DE IH PARA DEZENOVE ARBOVÍRUS EM HERBÍVOROS DOMÉSTICOS NAS SEIS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ.....	73
3.1.1	Prevalência Total de Anticorpos IH para Arbovírus em Herbívoros Domésticos no Estado do Pará.....	73
3.1.2	Análise por Mesorregião.....	75
3.1.2.1	Mesorregião Metropolitana de Belém.....	75
3.1.2.2	Mesorregião do Nordeste Paraense.....	77
3.1.2.3	Mesorregião do Sudeste Paraense.....	80
3.1.2.4	Mesorregião do Sudoeste Paraense.....	81
3.1.2.5	Mesorregião do Baixo Amazonas.....	84
3.1.2.6	Mesorregião do Marajó.....	85
3.1.3	Análise Comparativa nos Resultados Sorológicos do Teste IH em Soros dos Herbívoros Domésticos.....	87
3.1.4	Análise por Espécie de Herbívoro Doméstico Testado.....	88
3.1.4.1	Equinos.....	88
3.1.4.2	Bovinos.....	90
3.1.4.3	Bubalinos.....	92
3.1.4.4	Ovinos.....	93
3.1.5	Análise Comparativa Entre Famílias de Arbovírus e Espécies Animais Testadas por IH.....	95
3.1.5.1	Família <i>Bunyaviridae</i>	95
3.1.5.2	Família <i>Flaviviridae</i>	97
3.1.5.3	Família <i>Togaviridae</i>	99

3.1.5.4 Reações Monotípicas	101
3.2 RESULTADOS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA PARA DETECÇÃO DE IgG PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM SOROS DE EQUINOS, BOVINOS, BUBALINOS E OVINOS.....	105
3.2.1 Padronização do Teste para Todas as Espécies de Herbívoros Domésticos Analisados.....	105
3.2.2 Comparação dos Resultados do Teste Imunoenzimático Sanduíche Indireto para Detecção de IgG com o Teste de IH (Padrão Ouro)	106
3.2.3 Resultados do Teste de Correlação Linear de Pearson para as Amostras de Soro de Equinos, Bovinos e Ovinos Testados pelo Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG	107
4- DISCUSSÃO.....	111
5 CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
APÊNDICES	167
ANEXOS	177

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Organização genômica da família <i>Bunyaviridae</i>	26
Figura 2	Esquema de manutenção e transmissão de arbovírus em natureza.....	31
Figura 3	Esquema demonstrando a disseminação de infecção por arbovírus no hospedeiro.....	35
Figura 4	Hemorragias e hemotórax em feto causado por RVFV.....	41
Figura 5	Ovino com artrogripose (“Junta Torta”) que é uma malformação congênita que altera a postura e função dos membros em animais recém-nascidos e pode ser causada por arbovírus da família <i>Bunyaviridae</i>	41
Figura 6	Sinal neurológico encefálico em equino que apresenta andar atáxico, que pode ser percebido pelos membros torácicos afastados e pelo cruzamento dos membros pélvicos.....	44
Figura 7	Mapa do estado do Pará indicando os municípios de coleta de soro dos herbívoros domésticos.....	54
Figura 8	Esquema demonstrando o fundamento do teste de Hemaglutinação (HA) e IH e respectiva leitura na microplaca.....	55
Figura 9	Foto da microplaca demonstrando uma titulação do antígeno contendo 4 UHA (leitura da esquerda para direita).....	59

- Figura 10 Foto da microplaca demonstrando o teste de IH com diluição ao dobro do soro, iniciando pela diluição 1:20. Da esquerda para direita, observar a sedimentação das hemácias no fundo dos três primeiros poços até a diluição 1:80, que significa título de 80..... 62
- Figura 11 Demonstração esquemática do Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG..... 63
- Figura 12 Esquema demonstrando uma microplaca com 96 poços e devidas localizações e concentrações de antígenos virais, soros controle positivos e negativos e conjugados, assim como o Branco (local sem soro teste) para a padronização do Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG..... 69
- Figura 13 Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus testados contra soros de herbívoros domésticos no estado do Pará..... 74
- Figura 14 Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião Metropolitana de Belém em soros de herbívoros domésticos..... 76
- Figura 15 Prevalência de anticorpos para 19 tipos de arbovírus testados na mesorregião do Nordeste Paraense em soros de herbívoros domésticos..... 78

Figura 16	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Sudeste Paraense em soros de herbívoros domésticos.....	80
Figura 17	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Sudoeste Paraense em soros de herbívoros domésticos.....	82
Figura 18	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Baixo Amazonas em soros de herbívoros domésticos.....	84
Figura 19	Prevalência de anticorpos para 19 tipos de arbovírus testados na mesorregião do Marajó em soros de herbívoros domésticos.....	86
Figura 20	Comparação da média das prevalências de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus nos soros de herbívoros domésticos.....	88
Figura 21	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de equinos no estado do Pará.....	89
Figura 22	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de bovinos no estado do Pará.....	91
Figura 23	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de bubalinos no estado do Pará.....	93
Figura 24	Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de ovinos no estado do Pará.....	94

- Figura 25 Frequência relativa de anticorpos IH para 9 tipos de arbovírus da família *Bunyaviridae* nos soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará..... 96
- Figura 26 Frequência relativa de anticorpos IH para arbovírus da família *Flaviviridae* testados contra soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará..... 99
- Figura 27 Frequência relativa de anticorpos IH para arbovírus da família *Togaviridae* em soros de diferentes espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará..... 100
- Figura 28 Frequência relativa de reações monotípicas por testes IH para as diferentes famílias de arbovírus e espécies animais..... 102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
° C	Graus Celsius
<	Menor
≤	Menor ou Igual
≥	Maior ou igual
μL	Microlitro
ABTS	Substrato Enzimático (2,2-azino-di [3-ethybenthiiazoline sulfonate])
ACD	Ácido-Citrato- Dextrose
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
AHSV	<i>African horse sickness virus</i>
AINV	<i>Aino virus</i>
AKAV	<i>Akabane virus</i>
AN	Animal
AR	Artrópode
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN G	Ácido Ribonucleico do Segmento Grande
ARN M	Ácido Ribonucleico do Segmento Médio
ARN P	Ácido Ribonucleico do Segmento Pequeno
ASFV	<i>African swine fever virus</i>
AURV	<i>Aura virus</i>
Be	Belém

BEFV	<i>Bovine ephemeral fever virus</i>
BHAV	<i>Bhanja virus</i>
BLMV	<i>Belem virus</i>
BSQV	<i>Bussuquara virus</i>
BTV	<i>Bluetongue virus</i>
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>
CARV	<i>Caraparu virus</i>
CATUV	<i>Catu virus</i>
CCHFV	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CEPAN	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CEV	<i>California encephalitis virus</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CPCV	<i>Cacipacore virus</i>
CVV	<i>Cache Valley virus</i>
D.O	Densidade Óptica
DENV	<i>Dengue virus</i>
DGV	Dextrose- Gelatina-Veronal
DHF	Febre Hemorrágica do Dengue
DSS	Síndrome do choque do Dengue
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
ex.	Exemplo

FAI	Fluido Ascítico Imune
FC	Fixação do complemento
g	Gramma
Gc	Glicoproteína de Superfície C (Carboxi terminal)
GEV	<i>Getah virus</i>
GMAV	<i>Guama virus</i>
Gn	Glicoproteína de Superfície N (amino terminal)
GROV	<i>Guaroa virus</i>
H	Humano
HA	Hemaglutinação/Atividade hemaglutinante
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICOV	<i>Icoaraci virus</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgG	Imunoglobulina da Classe G
IgM	Imunoglobulina da Classe M
IGUV	<i>Iguape virus</i>
IH	Inibição da Hemaglutinação/Inibidores da Hemaglutinação
ILHV	<i>Ilheus virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
Km ²	Quilômetro Quadrado
KRIV	<i>Kairi virus</i>
LIV	<i>Louping ill virus</i>
MAGV	<i>Maguari virus</i>
MAYV	<i>Mayaro virus</i>

MDV	<i>Main Drain virus</i>
mL	Mililitro
M-PCR	<i>Multiplex polymerase chain reaction</i>
MUCV	<i>Mucambo virus</i>
MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i>
N	Proteína Estrutural de Nucleocapsídio/Nucleoproteína
NJLV	<i>Naranjal virus</i>
nm	Nanômetro
N-PCR	<i>Nested polymerase chain reaction</i>
NSDV	<i>Nairobi sheep disease virus</i>
NS _M	Proteína não estrutural _M
NS _S	Proteína não estrutural _S
ONNV	<i>O’Nyong-Nyong virus</i>
ORF	Matriz de Leitura Aberta
OROV	<i>Oropouche virus</i>
PA	Pará
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEAV	<i>Peaton virus</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIXV	<i>Pixuna virus</i>
POWV	<i>Powassan virus</i>
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas
RNP	Ribonucleocapsídio

ROCV	<i>Rocio virus</i>
rpm	Rotação por minuto
RRV	<i>Ross River virus</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SFSV	<i>Sandfly fever Sicilian virus</i>
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>
SN	Soroneutralização em camundongos
SP	São Paulo
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TCMV	<i>Tacaiuma virus</i>
TMEV	<i>Turkey meningo-encephalitis virus</i>
TRIV	<i>Triniti virus</i>
TROV	<i>Trocaria virus</i>
UHA	Unidade Hemaglutinante
UNAV	<i>Una virus</i>
UTIV	<i>Utinga virus</i>
VEEV	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
VRV	<i>Virgin River virus</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WEEV	<i>Western equine encephalitis virus</i>

WNV	<i>West Nile virus</i>
WSLV	<i>Wesselsbron virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
α	Alfa

RESUMO

A região Amazônica brasileira mantém a maior variedade de arbovírus e o estado do Pará corresponde a 26% desse território, o presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e a distribuição de anticorpos detectados por inibição de hemaglutinação (IH) para 19 arbovírus em herbívoros domésticos no estado do Pará e padronizar testes de ELISA sanduíche indireto em equinos, bovinos, bubalinos e ovinos. Em todas as espécies de animais estudadas e em todo estado do Pará ocorreu detecção de anticorpos para todos os arbovírus analisados dentre os quais os SLEV, ILHV, EEEV, MAGV e WEEV apresentaram maior prevalência de anticorpos IH, sendo o SLEV o mais prevalente. Na detecção de anticorpos para diferentes famílias de arbovírus o MAGV foi o mais prevalente da família *Bunyaviridae* em todas as espécies, o SLEV foi o mais prevalente da família *Flaviviridae* em todas as espécies, na família *Togaviridae* o EEEV foi mais prevalente em equinos. Ao analisar a prevalência de anticorpos IH por espécie animal foi observado que os equinos não apresentaram diferença significativa em relação aos bubalinos, porém, apresentaram diferença significativa maior em comparação aos bovinos e ovinos, não havendo diferença significativa entre as espécies de ruminantes. O uso de ELISA IgG sanduíche indireto apresentou grande frequência de reações sorológicas cruzadas entre as famílias de arbovírus estudadas.

Palavras-chave: Arbovírus. Herbívoros Domésticos. Soroprevalência de Anticorpos IH. Padronização ELISA.

ABSTRACT

The Brazilian Amazon region maintains the largest variety of arboviruses and the state of Pará is responsible for 26% of this territory, so the major goal of this work was to determine the prevalence and distribution of HI antibodies to 19 domestic *arbovirus* in domestic herbivores in the state of Pará and to standardize an indirect sandwich IgG ELISA test to serum samples of equines, cattle, buffaloes and sheep. In all species studied and throughout the State of Pará a large prevalence of HI antibodies to all *arbovirus* analyzed was observed and SLEV, ILHV, EEEV, MAGV and WEEV, showed higher prevalence, where the SLEV was the most prevalent. Regarding the virus families HI antibodies to MAGV was the most prevalent *Bunyaviridae* in all species, the most prevalent *Flaviviridae* was SLEV in all species and in the family *Togaviridae* the EEEV was more prevalent in horses. In order to analyze the prevalence of HI antibodies by animal species was observed that horses did not show significant differences compared to buffaloes, however, showed significant difference compared to cattle and sheep; there was not observed significant difference between the ruminant species. Using sandwich indirect IgG ELISA a large number of crossed reactions were found. This enzymatic test can be used to detect IgG antibodies among families of arboviruses studied.

Keywords: *Arbovirus*. Domestic Herbivores. Seroprevalence of IH antibodies. Standardization ELISA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVÍRUS

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) têm os seguintes requisitos para assim serem classificados: infectar vertebrados e invertebrados, iniciar uma viremia suficiente em um hospedeiro vertebrado por tempo e títulos suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado, e iniciar uma infecção produtiva, persistente da glândula salivar do invertebrado a fim de fornecer vírus para infecção de outros animais hospedeiros. Esses vírus possuem uma variação muito grande de hospedeiros, incluindo vertebrados (ex. mamíferos, aves, anfíbios, répteis) e invertebrados (ex. mosquitos, carrapatos) (Murray *et al.*, 2006).

Os arbovírus têm uma distribuição geográfica bastante ampla abrangendo todos os continentes, tanto nas regiões temperadas como nas tropicais com predominância nestas últimas, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano, ao passo que, nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

A floresta amazônica é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também à grande diversidade da fauna e flora, com abundante variedade de artrópodes

hematófagos e vertebrados silvestres, que constituem os elementos fundamentais para a manutenção desses vírus (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

O desequilíbrio desse ecossistema pode levar ao surgimento de um maior número de doenças que estão relacionadas com o inadequado manejo dos ecossistemas naturais, contribuindo para o aparecimento de diversos arbovírus, alguns deles responsáveis por importantes problemas de saúde pública regional e nacional (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Entre as principais ações do homem para o surgimento de maior ocorrência de arboviroses na Amazônia Brasileira, pode-se destacar: desmatamento para agricultura e construção de rodovias (Pinheiro *et al.*, 1996), construção de represas, como a de Tucuruí-PA (Vasconcelos, 1999), colonização e urbanização de áreas novas após construção de ferrovias (Le Duc & Pinheiro, 1988) e o uso da terra e subsolo, pela prática de mineração imprópria e uso inadequado da terra (Dégallier *et al.*, 1987; Dégallier *et al.*, 1992).

1.2 ETIOLOGIA

Em 1942 a expressão *arthropod-borne virus* foi introduzida para descrição do grupo de vírus de animais que se propagavam em artrópodes e eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Duas décadas depois, o Subcomitê Internacional para Nomenclatura Viral recomendou a adoção oficial do termo *arbovirus* (arbovírus) para designação dos vírus que

são mantidos em natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (Karabatsos, 1985).

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas. Na classificação sorológica os arbovírus estão distribuídos em grupos antigênicos, segundo critérios e observações estabelecidas por inúmeros pesquisadores e sistematizadas por Casals (1957).

De acordo com esse critério, quando dois ou mais vírus mostram cruzamento sorológico, passam a constituir um grupo antigênico. Os três primeiros grupos estabelecidos por Casals (1957) foram designados pelas letras A, B e C, e os demais receberam nomes do primeiro vírus isolado no respectivo grupo. Dentro de cada grupo antigênico, comumente existem membros que exibem relacionamento mais íntimo com certos vírus que com outros. Desta característica resultou a formação de subgrupos ou complexos (Calisher & Karabatsos, 1988).

Os arbovírus têm sido mais bem estudados com base em suas propriedades físico-químicas. Segundo esse critério, a maioria dos arbovírus atualmente registrados encontra-se distribuída dentro de seis famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae* e *Asfaviridae* (Pinheiro *et al.*, 1996). Os arbovírus possuem genoma constituído por ácido ribonucléico (ARN), exceto o *African swine fever virus* (ASFV), membro da família *Asfaviridae* que possui ácido desoxirribonucléico (ADN) (Fauquet *et al.*, 2005). O genoma ARN dos arbovírus pode ser segmentado ou não e, apresentar-se com uma ou duas fitas nucleotídicas. Os arbovírus com

genomas não segmentados estão incluídos nas famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty *et al.*, 1988).

A família *Bunyaviridae* constitui a maior família dos vírus de ARN, possuindo o maior número de arbovírus conhecidos, com aproximadamente 305 tipos distribuídos em cinco gêneros: *Orthobunyavirus* (172 entre espécies, subtipos, espécies tentativas e vírus não grupados), *Nairovirus* (34 entre espécies, sorogrupos e tipos), *Phlebovirus* (52 entre espécies, espécies tentativas, tipos e subtipos virais), *Tospovirus* (14 entre espécies e espécies tentativas) e *Hantavirus* (22 espécies), afora 41 espécies e grupos não classificados em gêneros na família *Bunyaviridae* e 23 sorotipos não classificados e não grupados; ressalta-se que os vírus do gênero *Tospovirus* são vírus de insetos e os vírus do gênero *Hantavirus* são vírus de roedores e não são considerados arbovírus (Fauquet *et al.*, 2005).

Na família *Bunyaviridae* estão incluídos patógenos virais de significativa importância humana e veterinária, tais como, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV), *Rift Valley fever virus* (RVFV), *Akabane virus* (AKAV), *Nairobi sheep disease virus* (NSDV), *Aino virus* (AINV) e *Peaton virus* (PEAV) (Karabatsos, 1985), assim como vírus já isolados na Amazônia Brasileira como: *Guaroa virus* (GROV), *Maguari virus* (MAGV), *Tacaiuma virus* (TCMV), *Guama virus* (GMAV), *Caraparu virus* (CARV), *Oropouche virus* (OROV), *Catu virus* (CATUV), *Icoaraci virus* (ICOV) e *Belem virus* (BLMV) (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

As partículas virais são esféricas, medindo entre 90 a 110 nm de diâmetro, sendo dotadas de um envoltório formado por lipoproteínas, que apresenta projeções protéicas de superfície. Possuem ARN de fita simples, polaridade negativa, de simetria helicoidal e constituída por três segmentos com diferentes tamanhos chamados ARN G (ácido ribonucléico do segmento grande), ARN M (ácido ribonucléico do segmento médio) e ARN P (ácido ribonucléico do segmento pequeno) (Fauquet *et al.*, 2005) (FIGURA 1).

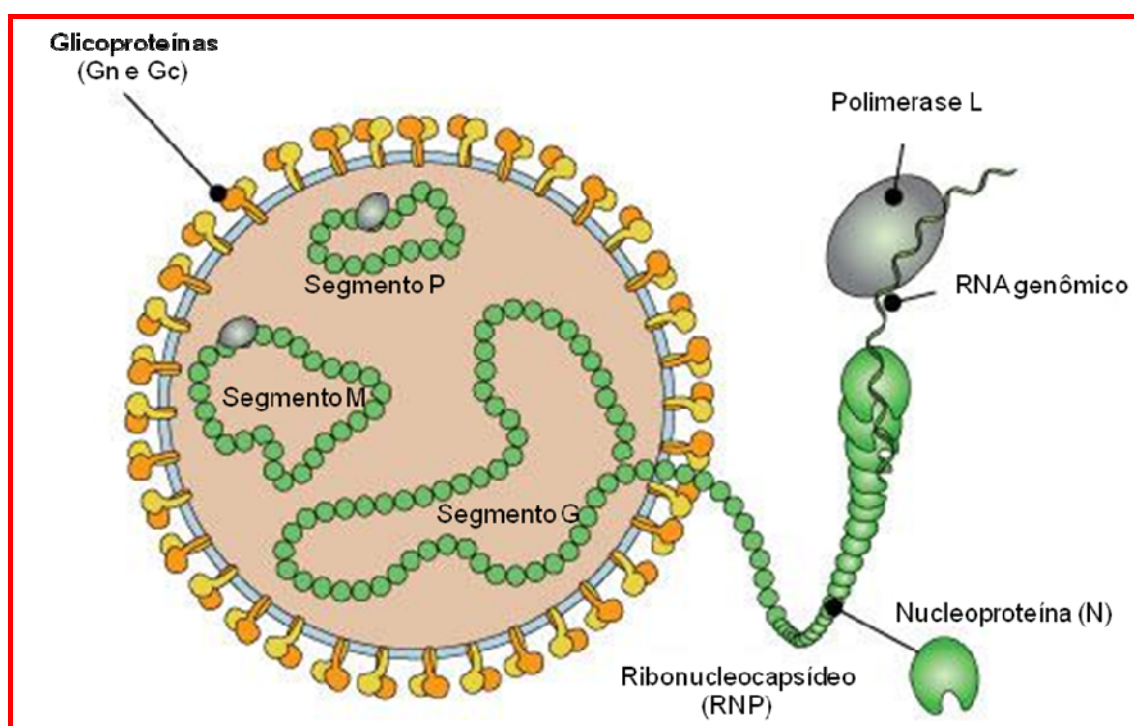


Figura 1-Organização genômica da família *Bunyaviridae*.

Fonte: Adaptado de Genomic Replication Strategies of Viruses, 2009.
<http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/bunya.gif>.

O segmento ARN G codifica uma proteína grande com atividade de ARN polimerase capaz de auxiliar a transcrição e replicação dos segmentos de ARN genômicos, o segmento ARN M codifica um precursor polipeptídico que origina as proteínas de superfície Gn e Gc, além de uma proteína não

estrutural denominada NS_M. Estudos moleculares e sequências nucleotídicas completas do segmento ARN P apresentam oito sorogrupos; em todos os casos o segmento ARN P codifica em duas matrizes de leitura aberta (ORF) que se superpõem a uma proteína estrutural de nucleocapsídeo (N) e uma proteína menor não estrutural denominada NSs (Elliott, 1990). A proteína NSs dos vírus do sorogrupo Bunyamwera e California têm um importante papel em inibir ações do ARN mensageiro das células do hospedeiro e síntese protéica, assim prevenindo a indução de *interferon* tipo I (Mohamed *et al.*, 2009).

A família *Flaviviridae* compreende os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). O gênero *Flavivirus* é o único que possui arbovírus, e corresponde aos vírus do grupo B da classificação antigênica (Karabatsos, 1985). Pode-se destacar dentre eles alguns vírus de grande importância médica, como os *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Ilheus virus* (ILHV), *Rocio virus* (ROCV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Louping ill virus* (LIV) e *Wesselsbron virus* (WSLV) (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

As partículas dos *Flavivirus* são esféricas, com diâmetro compreendido entre 45 e 60 nm. Possuem genoma constituído de ARN de fita simples de polaridade positiva e não segmentado. Sua replicação ocorre no citoplasma sendo comumente acompanhada por uma proliferação característica observada ao nível das membranas intracelulares. A grande maioria dos *Flavivirus* exibe atividade hemaglutinante dependente de pH, apresentando-se estáveis a uma faixa de pH entre seis e sete (Murphy, 1996).

A família *Togaviridae* compreende os gêneros *Alphavirus* e *Rubivirus*; o gênero *Alphavirus* é o único que possui importância para o estudo dos arbovírus e corresponde sorologicamente ao grupo A dos arbovírus segundo a classificação de Casals (1957) e possui 27 membros distribuídos em seis complexos. Os vírus da família *Togaviridae* possuem o virion com 60 a 70 nm de diâmetro, capsídeo é icosaédrico envolvido por um envelope, e o genoma é constituído de ARN de fita simples não segmentado de polaridade positiva. A replicação ocorre no citoplasma e o vírus brota da célula hospedeira (Westaway *et al.*, 1985).

Os *Alphavirus* infectam uma variedade de vertebrados, inclusive o homem. Onze tipos já foram associados com doença humana, e pelo menos oito tem sido responsáveis por epidemias: *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV), *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Mayaro virus* (MAYV), *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Ross River virus* (RRV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Getah virus* (GEV) (Calisher *et al.*, 1980).

1.3 ARBOVÍRUS ISOLADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

No Brasil já foram isolados pelo menos 200 tipos de arbovírus, dos quais 196 foram identificados inicialmente na Amazônia brasileira, e muitos deles inclusive jamais foram encontrados fora dessa região (Pinheiro *et al.*, 1996; Vasconcelos *et al.*, 1998). Das espécies encontradas nesta região, pelo menos 100 são comprovadamente novas para a ciência e 34 estão associados

com infecções humanas (Travassos da Rosa *et al.*, 1997, Vasconcelos *et al.*, 1991; 1997; 2001, Martins *et al.*, 2007).

A pan-Amazônia é considerada o maior reservatório de arbovírus do mundo e a região Amazônica brasileira mantém a maior variedade de arbovírus até hoje isolada no mundo. Embora a região Amazônica represente a maior fonte de infecção para vários arbovírus, as outras regiões do Brasil não são indenes aos arbovírus. De fato, epidemias em zonas urbanas ou rurais, na Amazônia e/ou em outras regiões brasileiras especialmente causadas pelos DENV, YFV, OROV, ROCV e MAYV, constituem um risco à saúde de uma parcela significativa da população (Travassos da Rosa *et al.*, 1997)

Estes são apenas cinco dos 34 arbovírus isolados no país e incriminados como causadores de doença humana. Alguns arbovírus constituem sérios problemas de saúde pública, por exemplo, OROV, ROCV, MAYV, DENV e YFV, pois, são responsáveis por elevada morbidade e/ou letalidade em seres humanos, na Amazônia e em outras regiões do Brasil e do exterior (Vasconcelos *et al.*, 1992; Pinheiro *et al.*, 1996). Os DENV e OROV estão associados com doença humana epidêmica em áreas urbanas, enquanto, ROCV, MAYV, e YFV, especialmente, em áreas rurais (Vasconcelos *et al.*, 1998).

O gênero *Orthobuynavirus* apresenta dez sorogrupos, com representantes isolados na Amazônia brasileira, que são: Grupo C (ex. CARV), Grupo Anopheles A (ex. TCMV), Grupo Bunyamwera (ex. MAGV), Grupo California (ex. GROV), Grupo Capim (ex. *Capim virus*), Grupo Gamboa (ex. *Gamboa virus*), Grupo Guama (ex. CATUV), Grupo Pacora, Grupo Simbu (ex.

OROV e *Utinga virus*-UTIV) e Grupo Turlock, assim como vários vírus não agrupados. O gênero *Phlebovirus* apresenta um único grupo denominado Phlebotomus Fever (ex. ICOV), com 22 tipos diferentes (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

Doze arbovírus do gênero *Flavivirus* que correspondem ao grupo B da classificação de Casals (1957) foram isolados no Brasil, são eles: *Bussuquara virus* (BSQV), *Cacipacore virus* (CPCV), DENV tipos 1, 2, 3 e 4, *Iguape virus* (IGUV), ILHV, *Naranjal virus* (NJLV), ROCV, SLEV e YFV. Nove já foram isolados na região Amazônica (BSQV, CPCV, YFV, ILHV, SLEV, DENV 1, VDEN 2, VDEN 3 e VDEN 4) (Travassos da Rosa *et al.*, 1998, Baleotti *et al.* 2003).

O gênero *Alphavirus* corresponde ao grupo A dos arbovírus na classificação sorológica e possui 27 membros distribuídos em seis complexos que foram isolados em todos os continentes, excetuando a Antártida (Shope & Sather, 1979). No Brasil, dez arbovírus da família *Togaviridae* já foram isolados, sendo nove pertencentes ao gênero *Alphavirus*: *Aura virus* (AURV), EEEV, MAYV, MUCV (subtipo III do complexo de Encefalite Equina Venezuela), *Pixuna virus* (PIXV), *Trocará virus* (TROV), *Una virus* (UNAV), VEEV (subtipo IF), WEEV e, o não classificado e não agrupado *Triniti virus* (TRIV) (Travassos da Rosa *et al.*, 1986; Travassos da Rosa *et al.*, 2001).

1.4 CICLOS DE MANUTENÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DOS ARBOVÍRUS

No Brasil, em particular na Amazônia brasileira, coabitam em número bastante elevado várias espécies de dípteros hematófagos (mosquito, flebotomíneo, maruim) e vertebrados silvestres. Esta diversidade de espécies e seu número elevado constituem um achado único no mundo e propiciam condições ambientais bastante favoráveis à manutenção de vírus, em particular dos arbovírus em natureza (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Com poucas exceções, os arbovírus são zoonoses, pois são mantidos em natureza em um ciclo de vertebrados não humanos e artrópodes (FIGURA 2); esses artrópodes são mosquitos, flebotomíneos, maruins, ou carrapatos.

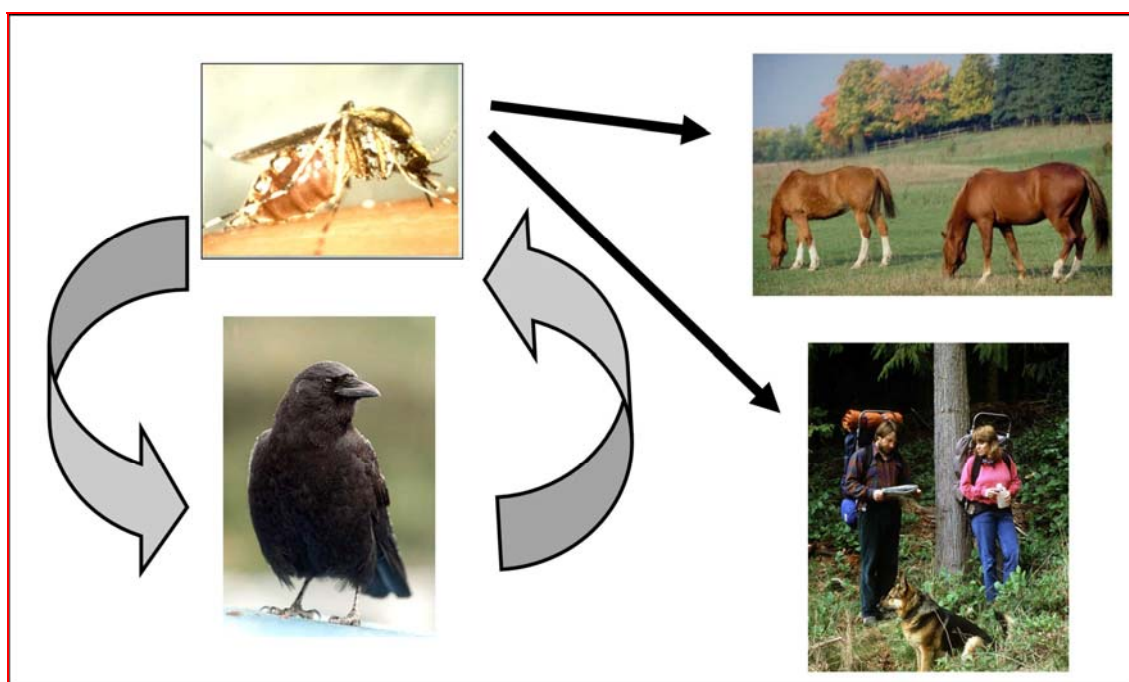


Figura 2- Esquema de manutenção e transmissão de arbovírus em natureza

Fonte: Adaptado de California Departamento of Food and Agriculture, 2010.
<http://www.cmmcp.org/arbovirus%20cycle2a.JPG>.

Alguns arbovírus utilizam mecanismo alternativo para sua multiplicação, sendo mantidos nos artrópodes por passagem viral através dos

ovos (transmissão transovariana) e estágios imaturos, e posteriormente os artrópodes podem transmitir esses vírus para humanos ou outros vertebrados quando fazem sua primeira alimentação (repasto sanguíneo). Uma vez infectado o artrópode permanece com o vírus por toda a vida (Shope, 1994).

Com exceção dos DENV e OROV que possuem ciclos de transmissão urbanos, todos os outros arbovírus envolvidos com doença humana na Amazônia brasileira, são mantidos em natureza através de ciclos silvestres, no qual diversas espécies de insetos hematófagos e vertebrados silvestres atuam como vetores e hospedeiros, respectivamente (Vasconcelos *et al.*, 1998).

Alguns arbovírus podem ser transmitidos pela mesma espécie de mosquito e também podem infectar diferentes espécies de vertebrados, incluindo humanos (Vasconcelos *et al.*, 2001). Também, um único arbovírus pode infectar e ser transmitido por diversas espécies de artrópodes hematófagos de diferentes gêneros (Travassos da Rosa *et al.*, 1986).

Humanos são geralmente hospedeiros acidentais e, normalmente, não importantes na manutenção dos arbovírus em natureza. O hospedeiro vertebrado silvestre geralmente não fica doente, ou seja, as infecções costumam ser inaparentes. As formas clínicas produzidas no homem variam conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção e também das condições biológicas do hospedeiro. A maioria provoca uma síndrome febril aguda com ou sem exantema, enquanto outros determinam quadro febril hemorrágico ou de encefalite, que em ambas as situações pode inclusive ser fatal (Pinheiro *et al.*, 1986). Gomes-Leal *et al.* (2006) demonstraram que alguns

arbovírus pertencentes à família *Rhabdoviridae* apresentam diferentes tropismos para diferentes regiões cerebrais de camundongos lactentes.

Dentre os arbovírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus, apenas oito são considerados como responsáveis por quadros de encefalite no continente Americano, os SLEV, EEEV, *California encephalitis virus* (CEV), WEEV, VEEV, ROCV, WNV e *Powassan virus* (POWV). Esses vírus constituem importante causa de morbidade e mortalidade equina e humana. Os sete primeiros são transmitidos ao homem e demais animais por picadas de mosquitos, enquanto o POWV é veiculado por picada de carrapatos (Karabatsos, 1985).

Os EEEV, WEEV, WNV e SLEV têm ciclos envolvendo mosquitos e aves na América do Norte e causam doença ocasional em humanos nesse continente; na Amazônia brasileira EEEV, WEEV e SLEV foram encontrados em aves, equinos e mosquitos em áreas ao redor de Belém-PA, mas nenhum caso de doença humana do tipo encefalite foi identificado nesta região por esses vírus (Woodall, 2004).

Segundo Vasconcelos *et al.* (1991) há uma elevada prevalência de anticorpos para o EEEV na população humana no município de Cametá, estado do Pará, sendo surpreendente a ausência de casos neurológicos naquela cidade e em outros municípios onde se tem diagnosticado infecções recentes não só pelo EEEV, como por demais arbovírus encefalitogênicos.

Em levantamento realizado sobre o papel das aves silvestres na distribuição dos vírus encefalitogênicos, bem como, na participação do ciclo silvestre de manutenção desses na Amazônia brasileira, foi demonstrado que

embora seja relativamente difícil de isolar esses agentes a partir do sangue e tecidos desses animais, um grande número de espécies parece ser susceptível aos mesmos (Degallier *et al.*, 1987).

A riqueza e diversidade de espécies e famílias de aves com anticorpos aos demais vírus foi surpreendente e confirmam a importância das mesmas como hospedeiros amplificadores dos EEEV, WEEV e SLEV e *Pixuna virus* (PIXV) dentre outros na Amazônia brasileira (Vasconcelos *et al.*, 1991). O ciclo de transmissão natural não está definido, mas há fortes evidências indicando que a maioria dos arbovírus encefalitogênicos circula entre mosquitos ornitofílicos e aves silvestres (Mitchell *et al.*, 1986).

Alguns arbovírus do gênero *Flavivirus* de ocorrência no Brasil são mantidos em natureza como zoonoses silvestres, no entanto, podem infectar o homem e animais domésticos quando entram em contato com o ecossistema aonde esses vírus têm ocorrência. Com exceção do DENV, todos os *Flavivirus* isolados no Brasil possuem um ciclo silvestre de manutenção (Figueiredo, 2000).

Os arbovírus após a transmissão pelo inseto ao hospedeiro se multiplicam no local da porta de entrada e, por via linfática, alcançam o linfonodo regional, onde sofrem nova replicação. Pelos vasos linfáticos eferentes chegam ao ducto torácico e à corrente circulatória. Na corrente circulatória realizam viremia (primária), e a partir desta se localizam nos tecidos, infectando preferencialmente as células endoteliais e as dos músculos estriados, que servem de fonte para um fluxo contínuo de vírus para a corrente circulatória (viremia secundária), e daí, dependendo do tropismo viral se

distribuem pelo organismo podendo alcançar, inclusive o sistema nervoso central (Correa & Correa, 1992). A FIGURA 3 sintetiza esse mecanismo.

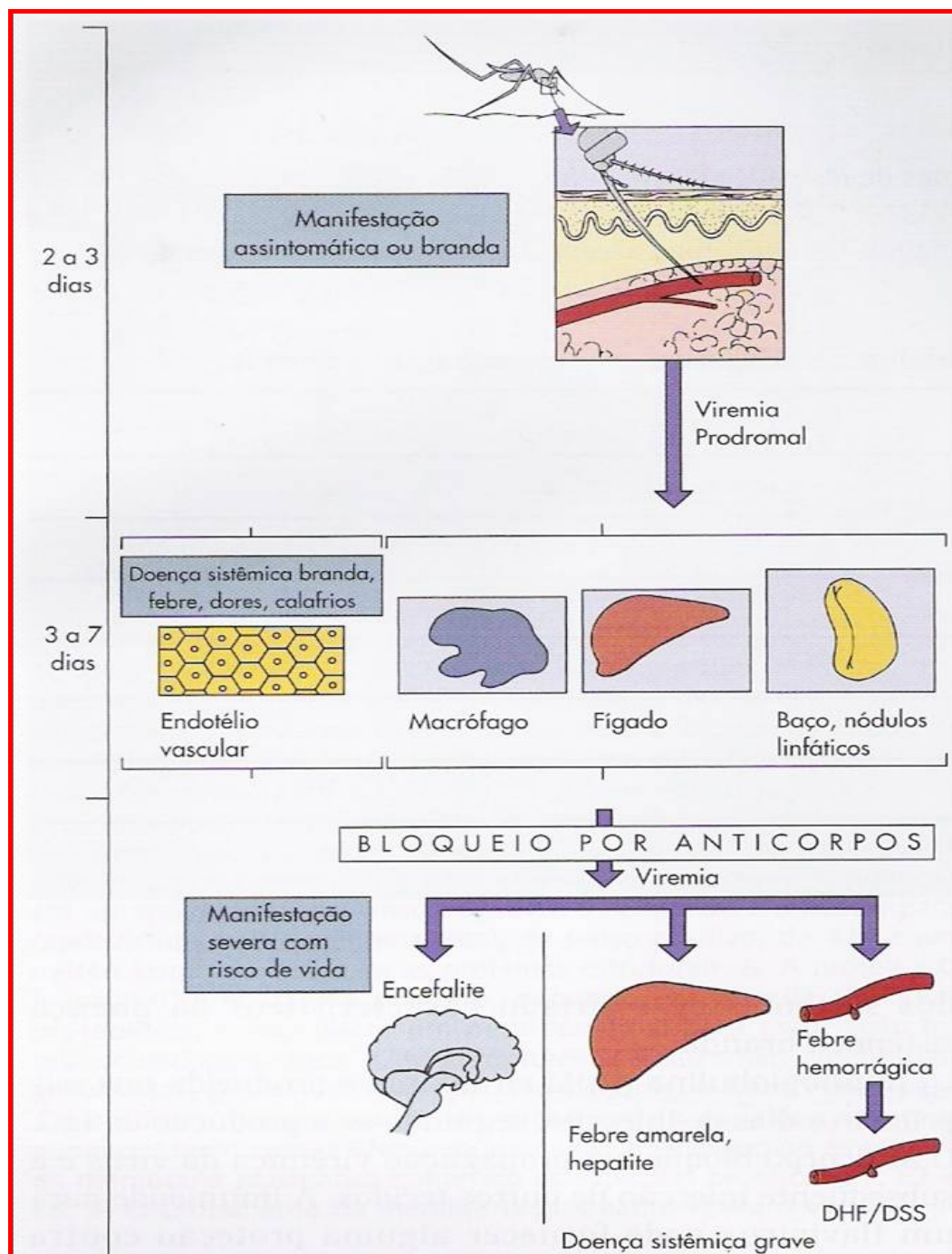


Figura 3- Esquema demonstrando a disseminação de infecção por arbovírus no hospedeiro.

Fonte: Adaptado de Murray *et al.* (2006)

1.5 MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ E HERBÍVOROS DOMÉSTICOS

O estado do Pará com 1.248.042 km² de extensão, representa 16,66% do território brasileiro e 26% da Amazônia. É cortado pela linha do Equador no seu extremo norte, sendo dividido em 144 municípios, onde vivem cerca de seis milhões de pessoas. Está dividido em seis mesorregiões que são: Mesorregião do Baixo Amazonas, Mesorregião do Marajó, Mesorregião Metropolitana de Belém, Mesorregião do Nordeste Paraense, Mesorregião do Sudoeste Paraense e Mesorregião do Sudeste Paraense (IBGE, 2006a).

Os animais herbívoros são definidos como aqueles que só se alimentam de plantas (Torres *et al.*, 1982). A classificação dos principais herbívoros domésticos pode ser realizada como segue: a família Bovidae, possui a subfamília Bovinae, que tem os gêneros *Bos* (bovinos domésticos) e *Bubalus* (bubalinos), a subfamília caprinae, que tem os gêneros *Capra* (caprinos) e *Ovis* (ovinos); a família Equidae possui o gênero *Equus*, que tem as espécies *Equus asinus* (asininos e muares) e *Equus caballus* (equinos) (Domingues, 1968). O QUADRO 1 demonstra a distribuição de herbívoros domésticos (Bovinos, Equinos, Bubalinos e Ovinos) por mesorregião do estado do Pará.

Quadro 1- Distribuição dos herbívoros domésticos por mesorregião do estado do Pará.

MESORREGIÕES	HERBÍVOROS DOMÉSTICOS			
	BOVINOS	EQUINOS	BUBALINOS	OVINOS
B.amazônas	1.027.929	43.218	139.120	34.942
Marajó	331.394	28.459	292.953	9.328
Met. Belém	90.232	4.745	1.570	4.041
Nordeste	1.181.425	29.761	18.499	24.876
Sudoeste	2.313.209	30.994	4.996	32.458
Sudeste	12.486.307	145.658	6.616	72.755

B.amazônas- Mesorregião do Baixo Amazonas; Marajó- Mesorregião do Marajó; Met. Belém- Mesorregião Metropolitana de Belém; Nordeste- Mesorregião do Nordeste Paraense; Sudoeste- Mesorregião do Sudoeste Paraense; Sudeste- Mesorregião do Sudeste Paraense; Fonte: Adaptado de IBGE (2006a)

1.6 ARBOVÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

O risco de infecção pelos arbovírus em animais depende da distribuição geográfica do vírus, pois essa distribuição pode ser limitada a um pequeno nicho ecológico ou se estender a uma região ou mesmo a diversas regiões geográficas (QUADRO 2); em geral, essa distribuição é determinada pela presença do vetor e hospedeiro envolvidos na transmissão (Brès, 1988). O QUADRO 3 demonstra os principais arbovírus que produzem sinais clínicos em animais domésticos no mundo.

Ovinos, caprinos e bovinos são geralmente hospedeiros acidentais dos arbovírus e são contaminados pela picada de insetos hematófagos, entretanto, em algumas situações os vírus são excretados no leite e, desse modo, animais recém-nascidos podem se infectar ao tomar o leite

contaminado. Por outro lado, o homem pode se contaminar principalmente pela picada do inseto hematófago ou excepcionalmente ao tomar o leite contaminado dessas espécies (White & Fenner, 1994).

Quadro 2- Distribuição geográfica dos principais arbovírus que produzem sinais clínicos em animais domésticos

Arbovírus	Distribuição Geográfica
AHSV, AKAV, BTV, CCHFV, NSDV, RVFV, SFV, WSLV, BEFV, WNV, AINV, PEAV	África e Oriente Médio
CVV, BTV, EEEV, VEEV, VSV, WEEV, MDV, WNV	América do Norte
ASFV, BTV, EEEV, VEEV, VSV, WEEV, KRIV, WNV	América do Sul e Central
ASFV, BTV, LIV, WNV	Europa e Continente Asiático
AKAV, BTV, CHFV, JEV, BEFV, GEV	Índia e Sudeste Asiático, incluindo China e Japão
AKAV, BTV, GEV, BEFV	Oceania

EEEV-*Eastern equine encephalitis virus*, VEEV-*Venezuelan equine encephalitis virus*, WEEV-*Western equine encephalitis virus*, JEV-*Japanese encephalitis virus*, LIV-*Louping ill virus*, WSLV-*Wesselsbron virus*, WNV-*West Nile virus*, AKAV- *Akabane virus*, AINV-*Aino virus*, PEAV-*Peaton virus*, CCHF-*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, NSDV-*Nairobi sheep disease virus*, RVFV-*Rift Valley fever virus*, CVV-*Cache Valley virus*, KRIV-*Kairi virus*, MDV-*Main Drain virus*, AHSV-*African horse sickness virus*, BTV-*Bluetongue virus*, BEFV-*Bovine ephemeral fever virus*, VSV-*Vesicular stomatitis virus*, ASFV-*African swine fever virus*.

Fonte: Adaptado de Brès, 1988, Schmalijohn & Nichol, 2007, Elliot, 2008

Quadro 3- Principais sinais clínicos em animais domésticos causadas por Arbovírus no mundo.

Família e Vírus	Animais	Sinais Clínicos
<i>Togaviridae</i>		
EEEV	E	Encefalites
GEV	E	Febre, erupção
SFV	E	Encefalite
VEEV	E	Febre, Encefalite
WEEV	E	Encefalite
<i>Flaviviridae</i>		
JEV	S	Abortamento
LIV	O	Febre, Encefalite
WSLV	O	Febre Hemorrágica
WNV	E	Encefalite
<i>Bunyaviridae</i>		
AKAV, AINV e PEAV	B, O, C	Anomalias congênitas,
CCHFV	B, O, C	Doença branda
NSDV	O,C	Gastrenterite e abortamento
RVFV	O,C,B	Diarréia sanguinolenta, abortamento
CVV	B, O, C	Anomalias congênitas
KRIV	E	Febre
MDV	E, O	Encefalite, anomalias congênitas
<i>Reoviridae</i>		
AHSV	E	Doença febril, pulmonar e cardíaca
BTV	O	Hemorragias, edemas e laminite
<i>Rhabdoviridae</i>		
BEFV	B	Febre e respiratória
VSV	B, E, O, S	Vesículas na boca e patas
<i>Asfaviridae</i>		
ASFV	S	Diarreia, pneumonia e hemorragias

EEEV-Eastern equine encephalitis virus, VGE-Getah virus, SFV-Semliki virus, VEEV-Venezuelan equine encephalitis virus, WEEV-Western equine encephalitis virus, JEV-Japanese encephalitis virus, LIV-Louping ill virus, WSLV-Wesselsbron virus, WNV-West Nile virus, AKAV-Akabane virus, AINV-Aino virus, PEAV-Peaton virus, CCHF-Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, NSDV-Nairobi sheep disease virus, RVFV-Rift Valley fever virus, CVV-Cache Valley virus, KRIV-Kairi virus, MDV-Main Drain virus, AHSV-African horse sickness virus, BTV-Bluetongue virus, BEFV-Bovine ephemeral fever virus, VSV-Vesicular stomatitis virus, ASFV-African swine fever virus, E-Equino, S-Suíno, O-Ovino, B-Bovino, C-Caprino

Fonte: Adaptado de Brès, 1988, Schmalijohn & Nichol, 2007, Elliot, 2008

Os vírus da família *Bunyaviridae* de importância veterinária que causam enfermidades importantes em animais são:

O NSDV é um *Nairovirus* que ocorre em ovinos e caprinos e é transmitido por carrapatos, causa doença grave e fatal, e está presente nas regiões central e leste da África e Oriente Médio (Quinn *et al.*, 2005). O *Cache Valley virus* (CVV) pertence ao sorogrupo Bunyamwera e está associado a defeitos congênitos de ovinos em rebanhos na América do Norte (Quinn *et al.*, 2005). O RVFV é causa importante de doença humana e apresenta importância considerável na mortalidade de animais recém-nascidos, e é também causa de abortos em animais domésticos (FIGURA 4) em especial ovinos, bovinos e bubalinos ocorrendo como endemia no sul e leste da África. Os hospedeiros vertebrados do vírus incluem bovinos e humanos e os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* são os principais vetores (Billecocq *et al.*, 2000).

Os AKAV, AINV e PEAV acometem bovinos e ovinos, pertencem ao sorogrupo Simbu, presente em regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo, e estão associados a defeitos congênitos (FIGURA 5) e abortos (St George *et al.*, 1980). Inoculação experimental com AKAV obtido de um feto naturalmente infectado pelo vírus induziu infecção intra-uterina em vacas prenhes soronegativas produzindo anomalias congênitas fetais. Portanto, o AKAV é um importante agente etiológico de abortos epizooticos de bovinos (Hurogi *et al.*, 1977). Também, foi descrito que anomalias congênitas semelhantes em fetos de ovinos e caprinos podem ser causadas pelo mesmo vírus (Parsonson *et al.*, 1977).

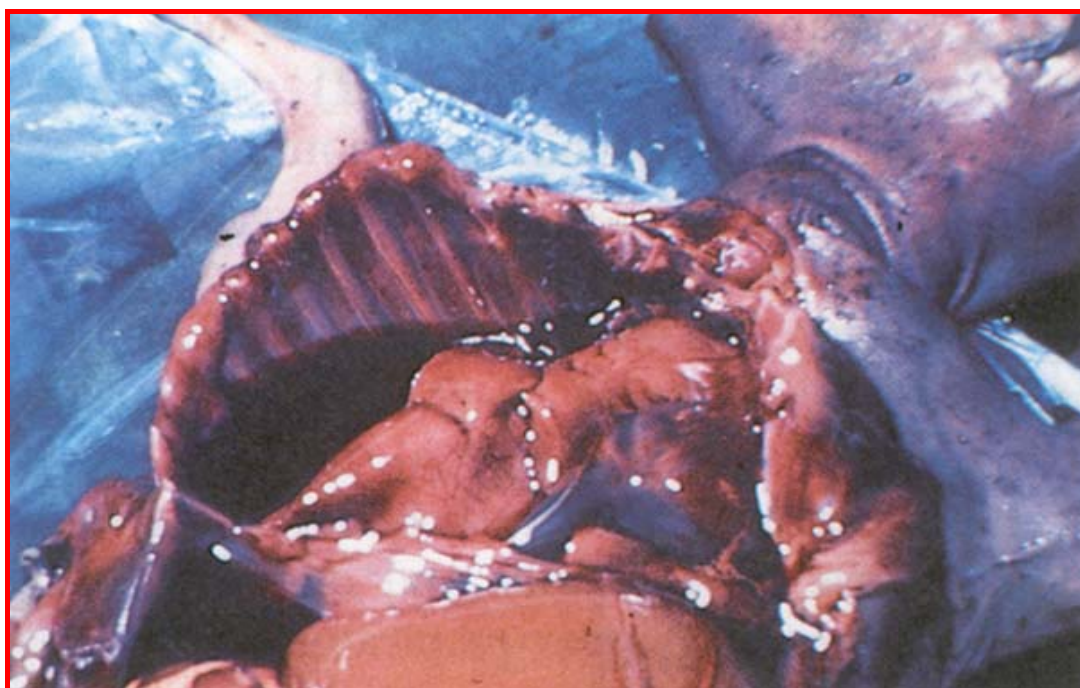


Figura 4- Hemorragias e hemotórax em feto causado por RVFV

Fonte: Herenda, 2000. www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E06.htm.



Figura 5- Ovino com artrogripose (‘Junta Torta’) que é uma malformação congênita que altera a postura e função dos membros em animais recém-nascidos e pode ser causada por arbovírus da família *Bunyaviridae*.

Fonte: Daneke Club Lambs and Livstock, 2010. <http://www.danekeclublambs.com/cachevalley.jpg>.

Anticorpos neutralizantes para o AKAV foram encontrados em bovinos, búfalos, camelos, equinos e ovinos na Austrália durante 1975 e 1976. O *Culicoides brevitarsis* foi detectado em todas as áreas onde foi demonstrada a presença do vírus, sugerindo que atue como principal transmissor (Cybinski *et al.*, 1978). O AKAV, entretanto, não é encontrado no continente Americano (Kirkland, 2002). Um estudo sorológico, realizado na Austrália mostrou anticorpos para outro arbovírus chamado AINV, mas a prevalência foi menor do que a obtida para o AKAV. Esses anticorpos foram encontrados em búfalos e ovinos (Cybinski & St George, 1978).

Anticorpos neutralizantes no soro contra o PEAV foram detectados em ovinos, equinos, búfalos, caprinos e suínos, mas não foram detectados anticorpos em camelos, cães, gatos e seres humanos, e nem em marsupiais, répteis ou pássaros selvagens; a patogenicidade do PEAV não foi ainda determinada e a unidade de pesquisa de arbovírus da Universidade Yale e o *Centers for Disease Control* (CDC), Fort Collins, nos Estados Unidos da América (EUA) determinaram que o PEAV fosse diferente de todos os outros vírus do grupo Simbu constituindo-se em um novo vírus (St George *et al.*, 1980).

A incidência de anticorpos no soro, contra nove sorotipos de arbovírus em ovinos, bovinos e humanos na parte oriental da Sicília foram analisados e uma alta incidência de anticorpos foi encontrada especialmente contra o *Bhanja virus* (BHAV) em todos os soros, e contra o *Sandfly fever Sicilian virus* (SFSV) em ovinos. A incidência foi maior que a relatada em

trabalhos de 1971 na parte ocidental da Sicília, e esses achados sugeriram um aumento na circulação desses arbovírus nessa área (Castro *et al.*, 1976).

A família *Flaviviridae* tem importância em medicina veterinária, mas apenas no gênero *Flavivirus* são encontrados arbovírus. As seguintes doenças ocorrem em animais domésticos:

O LIV acomete ovinos, bovinos, equinos e humanos em determinadas regiões da Europa e produz um quadro de encefalite; o JEV acomete aves aquáticas, suínos, equinos e humanos estando presente na Ásia, a infecção em suínos resulta em aborto e mortalidade neonatal; o WSLV acomete os ovinos e é prevalente em parte da África, produzindo infecção generalizada, hepatite e aborto (Stott, 2003).

O *Turkey meningo-encephalitis virus* (TMEV) acomete perus em Israel e África do Sul tendo sinais de paresia e paralisia progressiva (Lanconescu, 1976); o WNV acomete, principalmente, aves, humanos e equinos; as aves silvestres são hospedeiras naturais desse vírus, que provoca, esporadicamente, doença do sistema nervoso central em humanos e equinos (Morales *et al.*, 2006).

Os humanos e os animais domésticos são considerados hospedeiros finais para a maioria dos arbovírus do gênero *Alphavirus*, porque podem não desenvolver um título viral suficientemente alto para agirem como hospedeiros primários, isto é, raramente servem de fonte de infecção para novos vetores. Várias doenças de equinos são causadas por *Alphavirus*, como as encefalites (FIGURA 6) causadas pelos EEEV, WEEV e VEEV que ocorrem nas Américas e são denominadas encefalomielite equina. Já o *Getah virus*

(GEV) ocorre principalmente no sudeste da Ásia e na Austrália (Quinn *et al.*, 2005).



Figura 6- Sinal neurológico encefálico em equino que apresenta andar atáxico, que pode ser percebido pelos membros torácicos afastados e pelo cruzamento dos membros pélvicos.

Fonte: Rodrigues *et al.*, 2005.

O ciclo de transmissão epidêmica do VEEV envolve equinos que servem como a principal fonte do vírus, porque diferentemente dos EEEV e WEEV, o vírus se reproduz em altos títulos durante a fase de viremia nessa espécie animal, servindo assim de fonte de infecção para novos mosquitos hematófagos. Já a infecção de seres humanos é um evento final, enquanto bovinos e suínos quando infectados desenvolvem infecções inaparentes, mas podem servir como fonte potencial de infecção para mosquitos hematófagos (Stott, 2003).

O EEEV foi um dos primeiros arbovírus do gênero *Alphavirus* a se manifestar em humanos e equinos, já foi isolado e identificado em equinos no Brasil, nos estados da Bahia (Alice, 1951), Pernambuco (Cunha, 1954), Pará (Causey *et al.*, 1962), São Paulo (Nilson & Sugay, 1962), Minas Gerais e Rio de Janeiro (Correa & Correa, 1992), Mato Grosso (Iversson *et al.*, 1993), e recentemente foram notificadas epizootias em equinos no Estado da Paraíba (Araújo, 2008, dados não publicados¹)

1.7 IMUNIDADE HUMORAL E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRETO E INDIRETO DOS ARBOVÍRUS

A infecção primária ocasionada pelos arbovírus ativa o sistema imunológico que produz IgM, essas podem ser detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo o pico máximo em torno do sétimo ao oitavo dia e declinam lentamente, até não serem mais detectáveis, depois de dois a três meses (Innis, 1997). As imunoglobulinas da classe G (IgG) são detectáveis em níveis baixos, mas a partir do quarto dia após início dos sintomas, aumentam o título gradualmente, atingindo valores elevados em duas semanas e mantêm-se por vários anos, o que confere imunidade contra o sorotipo infectante provavelmente por toda a vida, apresentando títulos menores ou iguais a 640 pelo teste de IH (Gubler, 1996). A resposta

¹ ARAÚJO, Francisco Anilton Alves, do Grupo Técnico do Programa Nacional de Controle das Arboviroses. Notificação de quatro epizootias em equinos por Encefalite Equina do Leste na Paraíba. Nota divulgada por e-mail à Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses (COVEV) e Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) em 26/05/2008 e retransmitida aos centros colaboradores, pelo Grupo Técnico do Programa de Vigilância, Controle e Profilaxia da Raiva, parte de seu conteúdo encontra-se disponível no site <http://www.crmvsp.org.br/site/noticia_ver.php?id_noticia=893>

secundária apresenta baixos títulos de IgM e elevados títulos de IgG (Murray *et al.*, 2006).

Os métodos de diagnóstico específicos são baseados principalmente nos resultados dos testes de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), e soroneutralização em camundongos (SN) (Shope & Sather, 1979, De Paula & Fonseca, 2004). Esses testes conhecidos como de primeira geração ou testes convencionais têm grande utilidade na classificação de novos arbovírus (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

Amostras de sangue e vísceras de humanos, de animais silvestres e *pool* de artrópodes são inoculados por via intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços de 2 a 3 dias que ainda constituem o mais sensível método para isolamento da maioria dos arbovírus. Cérebro ou fígado, ou ambos, de animais doentes são usados para a identificação do agente e/ou quando necessário, para novas passagens (Travassos da Rosa *et al.*, 1986).

Todos os arbovírus isolados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) são patogênicos para camundongos albinos suíços recém-nascidos, causando principalmente quadros de encefalites. O fígado, depois do sistema nervoso central é o órgão alvo mais frequente de agressão desses vírus nos referidos animais (Araújo, 1980; Dias, 1986).

Outros métodos têm sido aplicados para a identificação de novos arbovírus, entre os quais se destacam o teste imunoenzimático *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para detecção de antígenos virais (Silva-Nunes *et al.*, 2006); e os métodos de biologia molecular, em especial os métodos de

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), seguido de sequenciamento nucleotídico e o de microscopia eletrônica (Philip Samuel & Tyagi, 2006).

A identificação viral pelo RT-PCR é um ensaio rápido e sensível que potencialmente minimiza diversos problemas frequentemente associados com o isolamento do vírus, incluindo a perda da viabilidade do mesmo devido à presença de anticorpos neutralizantes, pois a identificação por esta técnica em soros contendo imunoglobulinas da classe M (IgM) podem ser até três vezes maiores do que por isolamento viral, mas tem o inconveniente de não ter o vírus íntegro para estudos posteriores de patogenicidade (Vorndam & Kuno, 1997).

Um novo método foi desenvolvido para rápida identificação dos arbovírus dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* que circulam no Brasil, tal metodologia envolve a identificação específica dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* por um método de RT-PCR, seguido por *multiplex polymerase chain reaction* (M-PCR) ou *nested polymerase chain reaction* (N-PCR) para a identificação das espécies (Bronzoni *et al.*, 2005).

Durante mais de duas décadas, estudo sorológico das arboviroses restringiu-se ao emprego de técnicas clássicas como IH, FC e SN. Desses, o teste de IH em microplacas é recomendado para sorologia de rotina. Trata-se um teste sensível, de fácil execução e que requer equipamento muito simples, pois muitos arbovírus podem aglutinar hemácias de gansos; o teste IH se baseia na propriedade dos anticorpos contra um arbovírus específico inibirem a hemaglutinação. A técnica foi descrita por Clarke & Casals (1958) e

adaptada para um procedimento de microtitulação por Shope (1963), sendo utilizada até os dias atuais em laboratórios especializados para detecção de anticorpos contra diversos arbovírus (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

O teste de FC embora menos sensível que o teste IH é mais específico e pode ser usado seletivamente, assim como, o teste de SN que é também altamente específico (Shope & Sather, 1979). O método de ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico sorológico por ser bastante sensível, de fácil manipulação e padronização, podendo assim reforçar algumas técnicas clássicas. A técnica de MAC ELISA, que permite o diagnóstico por detectar IgM, representa a técnica mais aceita para diagnosticar infecções recentes (Kuno *et al.*, 1987).

Por outro lado, a sensibilidade e praticidade dos sistemas de ELISA são também evidentes nos testes de detecção de IgG, pois muitos soros podem ser testados em um único dia em pequenas quantidades e sem tratamento prévio das amostras. Duas variações do teste ELISA IgG têm sido descritas na espécie humana, Chungue *et al.* (1989) usaram um ensaio de captura para mensurar anticorpos IgG semelhante ao sistema utilizado para detecção de IgM; outro sistema mais sensível foi desenvolvido por Kuno *et al.* (1991) onde o antígeno é adsorvido diretamente na placa, sempre usando um anticorpo de captura.

Dentre os diversos tipos de ELISA, destaca-se o ELISA sanduíche indireto. Nesse método, o anticorpo referente e contra um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido nos orifícios da microplaca. Depois, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo. Finalmente, um segundo e diferente

anticorpo ligado à enzima é adicionado (anticorpo da amostra); quanto ao método de revelação à enzima reveladora apresenta-se ligada a um antianticorpo (Kuno *et al.*, 1991).

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência e a distribuição de anticorpos para arbovírus em herbívoros domésticos no estado do Pará e padronizar testes de ELISA IgG sanduíche indireto para 19 arbovirus em quatro espécies animais: equino, bovino, bubalino e ovino.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Determinar a presença de anticorpos IH em herbívoros domésticos (equinos, bovinos, bubalinos e ovinos), para 19 diferentes tipos de arbovírus no estado do Pará, que circulam em vertebrados silvestres e no homem na região Amazônica.
- Padronizar a técnica de ELISA IgG do tipo sanduíche indireto para 19 diferentes tipos de arbovírus nas espécies de herbívoros domésticos: equinos, bovinos, bubalinos e ovinos.

- Comparar os resultados da técnica ELISA IgG sanduíche indireto com a técnica de IH (teste padrão ouro) através do Teste de Triagem (*screening test*) e assim poder determinar valores de sensibilidade, especificidade, assim como acurácia, padrões de falso-positivo, falso-negativo, prevalência, valor preditivo do teste positivo, valor preditivo do teste negativo, *Likelihood ratio* positivo e *Likelihood ratio* negativo do teste.
- Verificar a Força de Correlação dos resultados da técnica de ELISA IgG sanduíche indireto para os 19 arbovírus analisados nas diferentes espécies animais através do Teste de Correlação Linear de Pearson.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todo o procedimento, envolvendo camundongos albinos suíços recém-nascidos (2-3 dias de idade), camundongos jovens (21 dias de vida) e animais domésticos, foi conduzido com o máximo rigor para evitar sofrimento e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN) do IEC, o qual deu parecer favorável à condução deste experimento (ANEXO A).

Os camundongos albinos suíços recém nascidos foram cedidos pelo biotério do IEC de Ananindeua e distribuídos em número de seis animais em caixas (gaiolas) de polipropileno com tampa de aço cromado com fornecimento de ração balanceada e também água à vontade; eles ficaram mantidos no biotério para animais inoculados em ambiente refrigerado, temperatura aproximada de 25° C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).

Para inoculação os camundongos suíços albinos recém-nascidos foram contidos fisicamente, sendo, seguros pela cabeça com auxílio dos dedos indicador e polegar, tendo o resto do corpo apoiado nos outros dedos e foram observados diariamente e, quando apresentaram sinais de doença foram retirados das respectivas gaiolas; tendo sido realizada a eutanásia por método físico “deslocamento cervical” conforme recomendação do Manual Para Técnicos em Bioterismo (COBEA) (DE LUCA, 1996).

Para contenção física dos camundongos jovens os animais foram levantados pela base da cauda, sendo estes apoiados rapidamente sobre a grade (tampa) da gaiola de forma que pudessem se agarrar. Em seguida foram imobilizados sendo seguros pela pele da nuca com os dedos polegar e o indicador. Posteriormente, a cauda foi fixada entre os outros dedos e a palma da mão de maneira que tivessem seus movimentos limitados (Mezadri *et al.*, 2004).

Os camundongos jovens foram mantidos no biotério para animais inoculados segundo o que foi citado anteriormente. Ao final, os animais sofreram eutanásia, e para esse fim foram submetidos à anestesia por inalação com éter (Massone, 2003) em que o animal foi colocado em uma caixa anestésica de plástico contendo algodão com éter em quantidade suficiente para umedecê-lo. Após a eutanásia todos os animais foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos à temperatura de -20° C até serem incinerados.

2.2 ANIMAIS E AMOSTRAS PARA AS PROVAS SOROLÓGICAS

Foram coletados soros de animais com idade superior a dois anos, independente de sexo ou raça dos seguintes herbívoros domésticos: equinos (*Equus caballus*), bovinos (*Bos taurus*), bubalinos (*Bubalus bubalis*) e ovinos (*Ovis aries*). Os equinos não eram vacinados para nenhum dos arbovírus causadores de encefalomielite equina. Após a adequada contenção

do animal e assepsia local, foi realizada a punção da veia jugular por meio de sistema a vácuo sem uso de anticoagulante.

O sangue colhido, por volta de 5 mL, foi deixado em repouso para a coagulação e separação do soro e, em seguida, submetido à centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos. O soro separado foi transportado em gelo e posteriormente armazenado a -70°C até a realização dos testes sorológicos de IH e ELISA IgG sanduíche indireto na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC, em Ananindeua-PA. O número de amostras de soros foi de 2191 sendo 385 amostras de ovinos, 399 amostras de bovinos, 654 amostras de bubalinos e 753 amostras de equinos em todas as mesorregiões do estado do Pará.

2.3 LOCAIS DE COLETA

Foram coletadas amostras de soro de animais oriundos de municípios das seis mesorregiões do estado do Pará, como segue: Mesorregião do Baixo Amazonas (N=402), nos municípios de Santarém, Prainha e Alenquer; Mesorregião do Marajó (N=439), nos municípios de Salvaterra e Soure; Mesorregião Metropolitana de Belém (N=335), nos municípios de Belém, Castanhal e Bujaru; Mesorregião do Sudoeste Paraense (N=310) nos municípios de Altamira, Brasil Novo e Vitória do Xingu; Mesorregião do Sudeste Paraense (N=277), nos municípios de Redenção, Paragominas, Tucuruí e Xinguara; e Mesorregião do Nordeste Paraense

(N=428), nos municípios de Nova Timboteua, Capitão Poço, Capanema, Tailândia, Tomé-Açu, Peixe Boi, Bragança e Ipixuna do Pará (FIGURA 7).

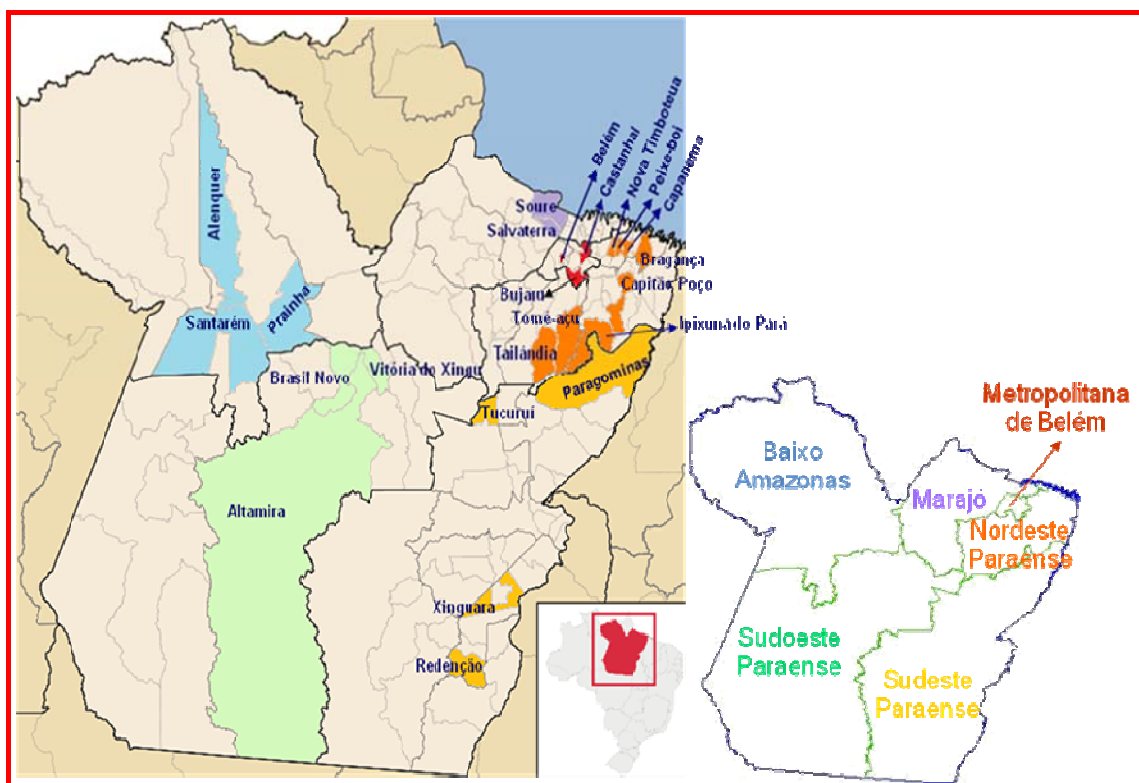


Figura 7- Mapa do estado do Pará indicando os municípios de coleta de soro dos herbívoros domésticos.

Fonte: Adaptado de IBGE (2006b).

2.4 MÉTODOS SOROLÓGICOS

2.4.1 Detecção de Anticorpos IH

2.4.1.1 Princípio do Teste

O teste de IH foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Shope (1963). Esse teste se baseia na capacidade que a maioria dos arbovírus possui de aglutinar hemácias de ganso (*Anser cinereus*), portanto é possível inibir essa hemaglutinação usando soro com anticorpos específicos (FIGURA 8).

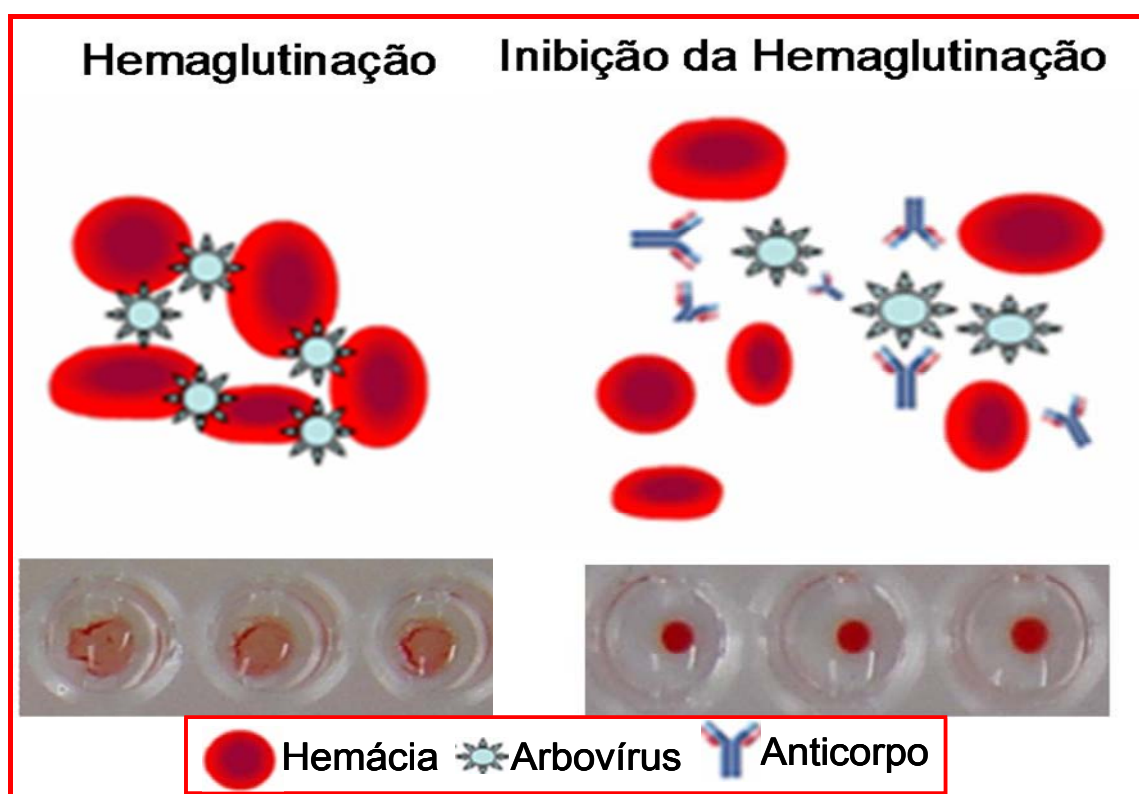


Figura 8- Esquema demonstrando o fundamento do teste de Hemaglutinação (HA) e IH e respectiva leitura na microplaca.

Fonte: Adaptado de Animal Health Trust (www.aht.org.uk/images/flu5.gif)

2.4.1.2 Tratamento do Soro

Os soros dos herbívoros domésticos analisados foram pré-tratados por acetona (Clarke & Casals, 1958) e adsorvidos com hemácias de ganso (Travassos da Rosa *et al.*, 1994) para a remoção de possíveis proteínas inespecíficas que possam inibir a aglutinação das hemácias, causando desta forma, resultado falso positivo, segundo o procedimento a seguir:

Identificar os tubos com o número de registro das amostras e colocar 50 μ L do soro e 450 μ L de cloreto de sódio 0,85%; acrescentar 6 mL de acetona; fechar os tubos com rolhas de borracha e agitar; deixar a 4°C por 5 minutos; centrifugar o material a 1500 rpm por 1 minuto; desprezar o sobrenadante; acrescentar novamente 6 mL de acetona; tampar os tubos com rolhas de borracha e agitar vigorosamente; deixar a 4°C por no mínimo 1 hora; centrifugar o material a 1500 rpm por 5 minutos; desprezar novamente o sobrenadante; colocar os tubos para secar em bomba de vácuo por 1 hora; hidratar o material com 500 μ L de solução tampão pH 9,0; deixar a 4°C para hidratar. Em seguida realizar a adsorção com hemácias de ganso- colocando 600 μ L da suspensão 1: 6 de glóbulos de ganso (ver tratamento das hemácias) deixar por 20 minutos agitando ocasionalmente; centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada; transferir o sobrenadante para tubos limpos 12x75mm. O soro assim tratado apresenta a diluição final de 1: 20.

2.4.1.3 Preparação dos Antígenos:

O teste de IH foi realizado usando-se antígenos de arbovírus isolados no Brasil, em um painel constituído de 19 tipos diferentes de arbovírus, distribuídos como segue: gênero *Alphavirus*- EEEV (Be AN 7526), WEEV (Be AN 70100), MAYV (Be AR 20290) e MUCV (Be AN 10967); gênero *Flavivirus*- BSQV (Be AN 4116), CPCV (Be AN 327600), ILHV (Be H 7445), SLEV (Be AR 23379), ROCV (Sp H 34675) e YFV (Be H 111); gênero *Orthobuynavirus*- TCMV (Be AN 73), MAGV (Be AR 7272), CARV (Be AN 3994), GROV (Be H 22063), CATUV (Be H 151), OROV (Be AN 19991), UTIV (Be AN 84785) e BLMV (Be AN 141106) e gênero *Phlebovirus*- ICOV (Be AN 24262), pertencentes ao acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC.

Esses antígenos foram preparados a partir de cérebros, fígados ou soros infectados de camundongos recém-nascidos, pela técnica de extração por sucrose-acetona e sorovírus (ANEXO B) (Casals & Brown, 1954; Clarke & Casals, 1958).

O procedimento para verificação do título hemaglutinante do antígeno foi o seguinte: Colocou-se 25 µL de albumina bovina a 0,4% em pH 9,0 em cada orifício da microplaca a partir do 1º orifício de cada fila; adicionou-se 25 µL do antígeno puro, fazendo diluições seriadas do 1º ao 12º espote da placa; adicionou-se 50 µL da suspensão de hemácias no pH adequado (ANEXO C) em cada orifício e agitou-se (agitador mecânico); e incubou-se por 30-60 minutos a 37° C ou temperatura ambiente (ANEXO C).

Após a leitura do teste foi determinado o título hemaglutinante para cada antígeno. O título hemaglutinante, equivalente a uma unidade hemaglutinante (1 UHA), foi a mais alta diluição na qual ocorreu completa aglutinação das hemácias. No teste de IH para os arbovírus selecionados foram utilizados 4 UHA (25 µL do antígeno). A diluição para obter 4 UHA/25 µL no teste de IH foi determinada iniciando a contagem a partir do título hemaglutinante (1 UHA) até a quarta diluição que aglutinou as hemácias. O QUADRO 4 mostra as diluições de todos os antígenos virais utilizados nesse estudo para obter 4 UHA no teste de IH.

Quadro 4- Diluição dos antígenos virais para 19 tipos de arbovírus para obter a realização do teste de inibição de hemaglutinação

Gêneros	Antígenos Virais	4 UHA
<i>Alphavirus</i>	EEEV	1: 500
	WEEV	1: 400
	MAYV	1: 200
	MUCV	1: 200
<i>Flavivirus</i>	YFV	1: 1.000
	ILHV	1: 2.000
	SLEV	1: 500
	CPCV	1: 20
	BSQV	1: 40
	ROCV	1: 1.000
<i>Orthobunyavirus</i>	GROV	1: 10
	MAGV	1: 20
	TCMV	1: 10
	UTIV	1: 10
	BLMV	1: 5
	CARV	1: 10
	OROV	1: 10
	CATUV	1: 10
<i>Phlebovirus</i>	ICOV	1: 80

UHA- Unidades Hemaglutinantes; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

Antes de cada teste foi realizado o controle dos títulos hemaglutinantes dos antígenos, conforme o protocolo a seguir: 25 μ L de antígeno nos dois primeiros poços; 25 μ L de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 do 2º ao 6º orifício da microplaca; transferiu-se 25 μ L do 2º ao 6º orifício da microplaca; 25 μ L de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 em todos os orifícios; 50 μ L de hemácias de ganso em DGV (Dextrose-Gelatina-Veronal) 1: 5 diluída em pH apropriado (faixa de 6,0 a 7,0) (ANEXO C); agitou-se a microplaca e foi observado a aglutinação das hemácias (não sedimentação das hemácias). Para a leitura do título hemaglutinante quando os três primeiros orifícios apresentavam aglutinação das hemácias o antígeno apresentava 4 UHA (FIGURA 9).



Figura 9- Foto da microplaca demonstrando uma titulação do antígeno contendo 4 UHA (leitura da esquerda para direita).

2.4.1.4 Reagentes e Preparação das Hemácias

Os reagentes utilizados no teste foram soluções de ACD (Ácido-Citrato-Dextrose), DGV, hemácias de ganso, soluções de estoque A, B, C, D, E, borato salina pH 9,0, albumina bovina 4% em solução borato salina pH 9,0, albumina bovina 0,4% em solução borato salina pH 9,0, soluções para pH na

faixa de 6,0 a 7,0, bem como antígenos (sucrose-acetona e sorovírus) e soros controles, cujas preparações desses reagentes estão descritas no ANEXO D .

Obteve-se assepticamente da veia jugular ou da veia da asa de ganso doméstico (*Anser cinereus*) adulto, a quantidade de sangue necessária para prover glóbulos para 1-2 semanas. O sangue foi diluído em solução ACD a 1:18 e centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e os glóbulos foram lavados por quatro vezes, por 15 minutos em 2000 rpm, em solução DGV a 1:3; e em seguida suspensas a 1:5 em DGV e estocadas a 4° C. Antes do uso na adsorção de hemaglutininas inespecíficas, os glóbulos de ganso foram lavados três vezes em albumina bovina 0,4% em pH 9,0 e suspensos 1:6, nessa solução.

2.4.1.5 Teste de IH

O teste foi realizado em duas etapas, na primeira onde foi feita a triagem dos soros, diluídos 1:20 após o tratamento; e na segunda etapa, os soros que apresentaram anticorpos para qualquer um ou mais dos arbovírus testados foram então titulados até a diluição 1: 640 e testados para obter o título final de anticorpos para cada antígeno.

Os procedimentos da triagem do soro foram: 25 µL do soro tratado (diluído 1: 20); 25 µL do antígeno diluído contendo 4 UHA; incubou-se a 4°C por 12 horas; adicionou-se 50 µL de suspensão de hemácias de ganso em solução DGV 1:5 diluída em pH apropriado para cada arbovírus (faixa de 6,0 a

7,0) (ANEXO C); agitou-se a microplaca e incubou-se por 30 minutos em temperatura apropriada (a 37° C ou temperatura ambiente a depender do vírus) (ANEXO C). Foi feita a leitura do teste, sendo positivos os soros que provocaram a sedimentação das hemácias de ganso, uma vez que os anticorpos específicos presentes no soro testado estavam inibindo a atividade aglutinante dos vírus.

Os procedimentos da titulação do soro foram: adicionou-se no 1° orifício da microplaca 50 µL do soro tratado positivo no teste de triagem (diluição 1:20); acrescentou-se 25 µL de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 do 2° ao 6° orifício da microplaca; transferiu-se 25 µL do 1° ao 6° orifício da microplaca; fazendo assim diluições ao dobro; acrescentou-se 25 µL do antígeno diluído com 4 UHA, incubou-se a 4°C por 12 horas; foi adicionado 50 µL de hemácias de ganso em DGV 1:5 diluída em pH apropriado (faixa de 6,0 a 7,0) (ANEXO C); agitou-se a microplaca e incubou-se por 30 minutos em temperatura apropriada de acordo com o vírus (a 37° °C e temperatura ambiente) (ANEXO C).

2.4.1.6 Leitura e Interpretação do Teste IH

A leitura foi realizada observando a sedimentação das hemácias de ganso até onde ocorreu a última sedimentação, cuja diluição foi considerada como o título do soro (FIGURA 10). Foram consideradas reações positivas toda reação com título igual ou maior que 20.

As reações monotípicas foram aquelas que apresentaram reações positivas somente para um tipo de arbovírus na família analisada e reações heterotípicas aquelas que apresentaram reações positivas para mais de um tipo de arbovírus dentro de uma mesma família.



Figura 10- Foto da microplaca demonstrando o teste de IH com diluição ao dobro do soro, iniciando pela diluição 1:20. Da esquerda para direita, observar a sedimentação das hemácias no fundo dos três primeiros poços até a diluição 1:80, que significa título de 80.

2.4.2 Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG de Equinos, Bovinos, Bubalinos e Ovinos.

2.4.2.1 Princípio do Teste

A técnica foi padronizada para cada um dos 19 tipos de arbovírus usados no teste de IH para as diferentes espécies de herbívoros domésticos analisados, adaptando o roteiro determinado por Chungue *et al.* (1989) e Kuno *et al.* (1991) para o DENV para os arbovírus testados nesta tese.

As placas foram sensibilizadas com anticorpos policlonais para os vírus estudados, depois o antígeno foi adsorvido e, em seguida, foi utilizado o

soro teste (anticorpo); posteriormente foi adicionado o conjugado; seguiu-se com a adição de substrato revelador; foi feita a leitura do produto colorimétrico em espectrofotômetro para microplaca ao comprimento de onda adequado para a cor produzida (FIGURA 11).

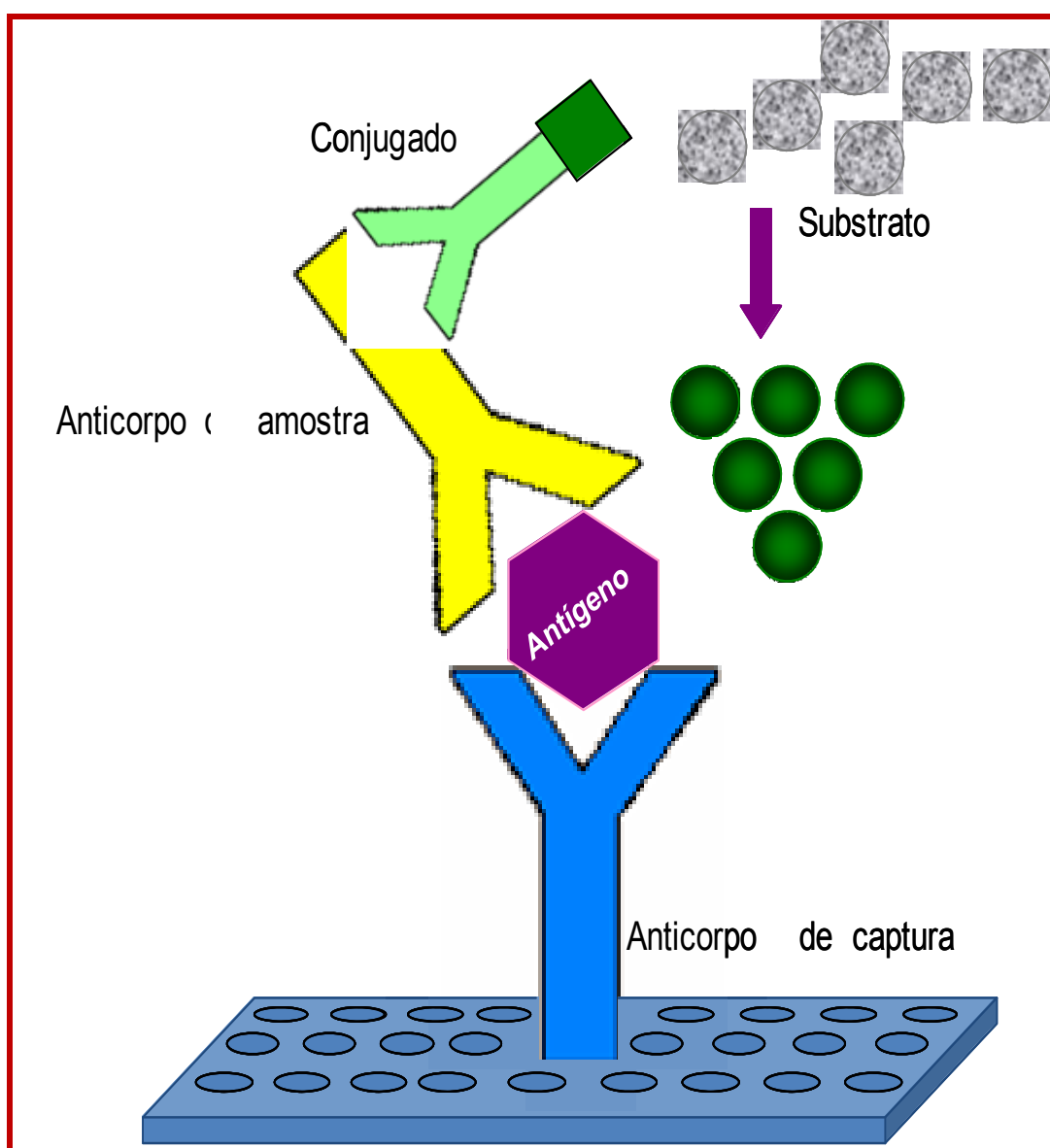


Figura 11- Demonstração esquemática do Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para detecção de IgG

2.4.2.2 Anticorpos de Captura para Sensibilização das Microplacas e Bloqueio

Inicialmente as microplacas foram sensibilizadas com anticorpos policlonais usando FAI homólogos aos vírus em estudo (ANEXO E). Foram utilizadas microplacas de polivinil, fundo em U, com 96 poços e identificadas com letras e números (*Thermolabsystems*). Os FAI foram diluídos a 1:300 em tampão de carbonato-bicarbonato pH 9.6; as microplacas em duplicatas foram incubadas *overnight* a 4° C em câmara úmida e por 2 horas em estufa bacteriológica (37° C), também, em câmara úmida. A substância bloqueadora foi testada usando leite desnatado (*fat free*) a 5% em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 com tween 20 0,05% (ANEXO F) e analisou-se o melhor período de tempo (15, 30 e 60 minutos) para esse bloqueio.

2.4.2.3 Antígenos

Os antígenos foram preparados de modo semelhante ao descrito para uso na técnica de IH (ANEXO B); esses antígenos foram testados nas concentrações de 4, 16 e 32 UHA diluídos em solução de leite *fat free* 5% com tween-20 0.05%. O QUADRO 5 mostra a diluição dos antígenos virais para cada um dos 19 tipos de arbovírus examinados.

Quadro 5- Diluição dos antígenos virais para 19 tipos de arbovírus testados para a padronização e realização do Teste ELISA Sanduíche Indireto para detecção de IgG em herbívoros domésticos

Famílias de Arbovírus	Antígenos Virais	Diluição do Antígeno		
		4 UHA	16 UHA	32 UHA
<i>Togaviridae</i>	EEEV	1: 500	1: 125	1: 62,5
	WEEV	1: 400	1: 100	1: 50
	MAYV	1: 200	1: 50	1: 25
	MUCV	1: 200	1: 50	1: 25
<i>Flaviviridae</i>	YFV	1: 1.000	1: 250	1: 125
	ILHV	1: 2.000	1: 500	1: 250
	SLEV	1: 500	1: 125	1: 62,5
	CPCV	1: 20	1: 5	1: 2,5
	BSQV	1: 40	1: 12,5	1: 5
	ROCV	1: 1.000	1: 250	1: 125
<i>Bunyaviridae</i>	GROV	1: 10	1: 2,5	1: 1,25
	MAGV	1: 20	1: 5	1: 2,5
	TCMV	1: 10	1: 2,5	1: 1,5
	ICOV	1: 80	1: 20	1: 10
	UTIV	1: 10	1: 2,5	1: 1,5
	BLMV	1: 5	1: 1,25	1: 0,625
	CARV	1: 10	1: 2,5	1: 1,25
	VORO	1: 10	1: 2,5	1: 1,25
	CATUV	1: 10	1: 2,5	1: 1,25

UHA- Unidade Hemaglutinante; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

2.4.2.4 Soros Controles

Os soros controles positivos foram aqueles que obtiverem títulos maiores ou iguais a 20 no teste de IH de preferência com reações monotípicas. As amostras controles negativas foram negativas para os testes de IH (títulos

menores que 20 para todos os 19 vírus do estudo). Esse procedimento foi realizado para cada espécie animal analisada.

2.4.2.5 Validação e *Cut-off* do Teste

Para validação do teste foi utilizado o critério de razão entre a média aritmética das densidades ópticas (D.O) dos controles positivos em relação à média aritmética das D.O dos controles negativos, esta razão, portanto resultou em valor \geq a dois. O *cut-off* foi determinado pela média das D.O dos controles negativos mais três desvios padrões, obtendo-se assim confiança de 99,8%; desta forma foram consideradas positivas as amostras que resultaram em D.O \geq ao *cut-off*, enquanto todas as amostras que apresentaram D.O $<$ que o *cut-off* foram consideradas negativas.

2.4.2.6 Anticorpos Conjugados

Foram utilizados anticorpos conjugados específicos para cada espécie animal, com exceção do anticorpo conjugado para bubalinos, pois para esta espécie foi utilizado o conjugado para bovinos, já que não existe disponível no comércio conjugado para bubalinos. Para ovinos: *Peroxidase-conjugated AffinityPure Rabbit Anti-Sheep IgG*; para bovinos e bubalinos: *Peroxidase-conjugated AffinityPure Goat Anti-Bovine IgG*; e para equinos:

Peroxidase-conjugated AffinityPure Rabbit Anti-equine IgG), procurando a melhor concentração do mesmo para cada espécie animal analisada, e seguindo as orientações descritas pelo fabricante (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, inc.*).

2.4.2.7 Revelação do Teste

A revelação foi realizada mediante a adição de substrato enzimático-Sistema ABTS (*ABTS Peroxidase Substrate System- 2 Components-KPL*). Os dois componentes desse sistema desenvolvem uma cor verde quando reage com a peroxidase presente no conjugado. Os dois componentes são chamados de solução A (2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) na concentração de 0,3 g/L em tampão ácido e solução B (H₂O₂ na concentração de 0,02% em um tampão apropriado). Procurando encontrar o melhor tempo de leitura em D.O, foi utilizado o filtro de 405 nm.

2.4.2.8 Procedimento da Técnica para Padronização

Lavou-se as microplacas uma vez com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 tween-20 0,1%) (ANEXO F) e assim foram sensibilizadas com 100 µL por orifício de uma mistura de FAI diluídos (ANEXO E) 1:300 em tampão de

carbonato-bicarbonato pH 9,6 (ANEXO F). Foram utilizadas placas em duplicata e incubadas *overnight* a 4° C e 2 horas a 37° C em câmara úmida.

Após a incubação, lavou-se as placas três vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 tween-20 0,1%) e bloqueou-se com 160 µL por orifício de uma solução de leite desnatado (*fat free*) 5% em tween-20 0,05% (ANEXO F), durante 15, 30 e 60 minutos a 37° C em câmara úmida.

Lavaram-se as placas três vezes e adicionou-se 75 µL da solução de antígenos (4, 16 e 32 UHA) diluídos em solução de leite desnatado (*fat free*) 5% em tween-20 0,05% nos orifícios das fileiras de um a quatro (4 UHA), cinco a oito (16 UHA) e nove a doze (32 UHA) da microplaca (FIGURA 12). Incubou-se a 37° C por 1 hora em câmara úmida.

As microplacas foram lavadas três vezes e foi adicionado 150 µL das amostras controles positivas nas fileiras um, cinco e nove de A a D das microplacas e controles negativas nas fileiras de um, cinco e nove de E a G da microplaca, diluídas a 1:50 em leite *fat free* 3% em tween-20 0,05%; acrescentou-se 75 µL de leite desnatado (*fat free*) 5% em tween-20 0,05% nas fileiras dois, tres, quatro, seis, sete, oito, dez, onze e doze da microplaca. A partir das fileiras um, cinco e nove das microplacas transferiu-se 75 µL para os demais poços fazendo diluições ao dobro até a diluição de 1:400. A fileira H não teve soro teste e serviu como branco (FIGURA 12).

Lavaram-se as microplacas três vezes e adicionou-se por orifício da placa 40 µL de anticorpo anti IgG da espécie analisada (conjugado) diluído em leite desnatado (*fat free*) 5% em tween-20 0,05%, nas seguintes diluições: fileira A 1: 1.000, fileira B 1: 5.000, fileira C 1:10.000, fileira D 1:12.000, Fileira

E 1:1.000, fileira F 1:5.000, fileira G 1:10.000, fileira H 1:10.000 (FIGURA 12) e incubou-se por 1 hora a 37° C em câmara úmida. Para os bubalinos o conjugado foi iniciado na diluição de 1: 100.

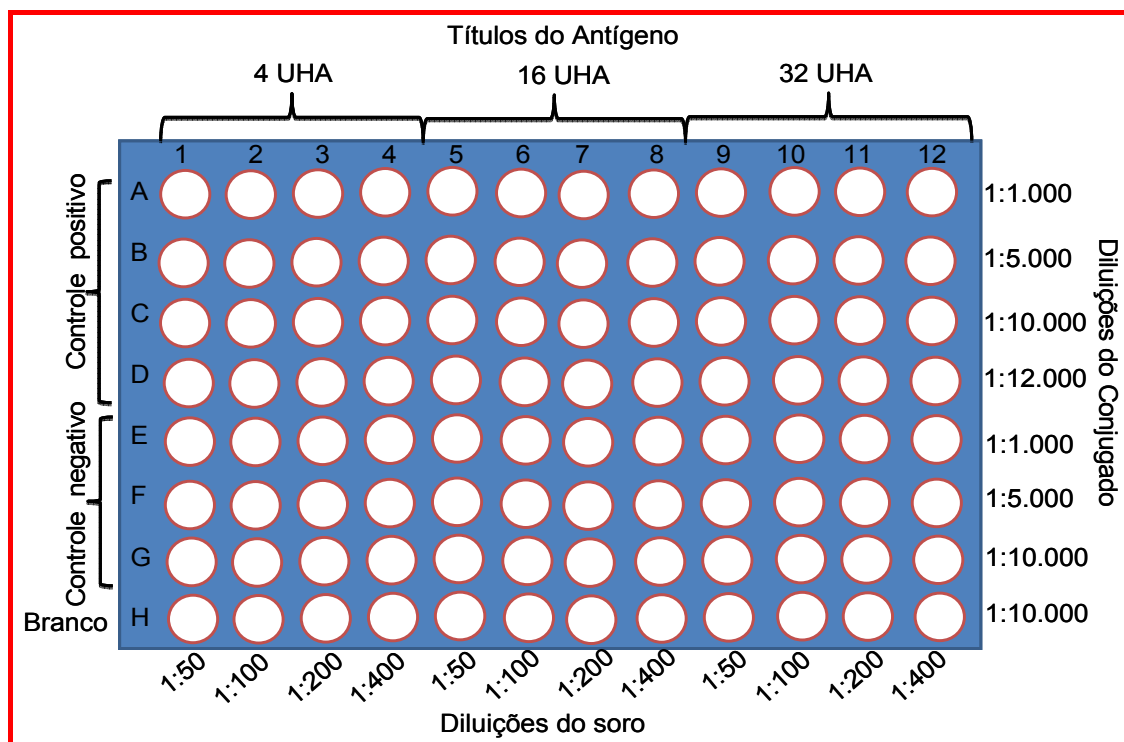


Figura 12- Esquema demonstrando uma microplaca com 96 poços e devidas localizações e concentrações de antígenos virais, soros controle positivos e negativos e conjugado, assim como o Branco (local sem soro teste) para a padronização do Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para detecção de IgG.

Lavarou-se as microplacas seis vezes e adicionaram-se 100 µL da solução substrato (Solução A mais Solução B) misturadas em iguais proporções. Incubou-se por 15, 30 e 45 minutos a 37° C e fez-se a leitura da placa em espectrofotômetro com filtro de D.O 405 nm.

2.4.2.9 Amostras Testadas para o Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG e Comparadas com os Resultados do Teste IH (Padrão Ouro)

Após a padronização da técnica foram testadas amostras de soros de equinos, bovinos e ovinos escolhidas aleatoriamente utilizando o por meio do teste de amostragem sistemática e utilizando para cálculo amostral o *software* BioEstat 5.0, admitindo nível alfa de 0,05, poder o teste de 0,95 e valor de qui-quadrado estimado de 20, contudo a amostragem foi fixada em 65 amostras (Ayres *et al.*, 2007); a quantidade de amostras testadas, porém seguiu-se por conveniência até o esgotamento dos conjugados, sendo de 30,8% do total de amostras de equinos, 37,6% dos bovinos e 41% dos ovinos. Foram testadas 540 amostras de soro de herbívoros domésticos, distribuídos como segue: (a) 232 amostras de soro de equinos para cada um dos 19 tipos de arbovírus analisados; (b) 150 amostras de soro de bovinos sendo 70 amostras para cada um dos dez tipos de arbovírus das famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae*, e 80 amostras para cada um dos nove tipos de arbovírus da família *Bunyaviridae* analisados; (c) 158 amostras de soro de ovinos para cada um dos 19 tipos de arbovírus analisados.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo da soroprevalência de anticorpos para os 19 tipos de arbovírus de amostras de soros de herbívoros domésticos das seis mesorregiões do estado do Pará através da técnica de IH os resultados foram tabulados e confrontados pelo teste do Qui-quadrado de aderência, cujos escores amostrais foram mensurados admitindo-se nível de significância (α) de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade ($p \leq \alpha$) implementado pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

Os resultados do Teste Imunoenzimático - ELISA sanduíche Indireto para detecção de IgG foram comparados com os resultados do teste de IH pela distribuição de probabilidade condicional pelo uso do Teste Crivo (*Screening Test*) para determinar valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, padrões de falso-positivo, falso-negativo, prevalência, valor preditivo do teste positivo, valor preditivo do teste negativo, *Likelihood ratio* positivo e *Likelihood ratio* negativo implementado pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

Para verificar a força de correlação entre os valores de absorvância obtidos no Teste Imunoenzimático, ou seja, a possibilidade de reações cruzadas entre anticorpos para vírus da mesma família foi utilizado o Teste de Correlação Linear de Pearson admitindo valores de correlação (r) variando entre menos um e um ($-1 \leq r \leq 1$), implementado pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). O QUADRO 6 mostra os valores de r , correlação, sentido e força.

Quadro 6- Demonstrativo dos valores de r, força e sentido de correlação linear

r	Correlação	Sentido	Força
-1,0	Presente	Negativo	Perfeita
-0,99 a -0,61	Presente	Negativo	Forte
-0,60 a -0,31	Presente	Negativo	Moderada
-0,30 a -0,01	Presente	Negativo	Fraca
0	Ausente		
0,01 a 0,30	Presente	Positivo	Fraca
0,31 a 0,60	Presente	Positivo	Moderada
0,61 a 0,99	Presente	Positivo	Forte
1,00	Presente	Positivo	Perfeita

3 RESULTADOS

3.1 RESULTADOS DO TESTE DE IH PARA DEZENOVE ARBOVÍRUS EM HERBÍVOROS DOMÉSTICOS NAS SEIS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ

3.1.1 Prevalência Total de Anticorpos IH para Arbovírus em Herbívoros Domésticos no Estado do Pará

Somente em soros dos herbívoros domésticos da mesorregião do Baixo Amazonas do estado do Pará apresentaram prevalência de anticorpos IH para todos os dezenove arbovírus testados. Por outro lado, na mesorregião Metropolitana de Belém não houve ocorrência de anticorpos para o ICOV e OROV; a mesorregião do Nordeste Paraense não apresentou anticorpos para o OROV; a mesorregião do Sudeste Paraense não apresentou anticorpos para o CARV; as mesorregiões do Sudoeste Paraense e do Marajó não apresentaram anticorpos para o BLMV. Os resultados totais absolutos e relativos de prevalência de anticorpos IH para os 19 tipos de arbovírus testados estão no APÊNDICE A.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na prevalência total de anticorpos IH para os 19 tipos de arbovírus testados entre as mesorregiões ($p>0,05$). Os vírus com maior prevalência em herbívoros

domésticos no estado do Pará foram: SLEV (28,39%), ILHV (17,11%), EEEV (13,05%), MAGV (12,00%) e WEEV (11,73%); e os de menor prevalência foram: BLMV (0,22%), CARV (0,87%), ICOV (1,00%), OROV (1,37%), UTIV (2,19%), MAYV (2,46%), BSQV (2,60%) e CATUV (2,60%) (FIGURA 13).

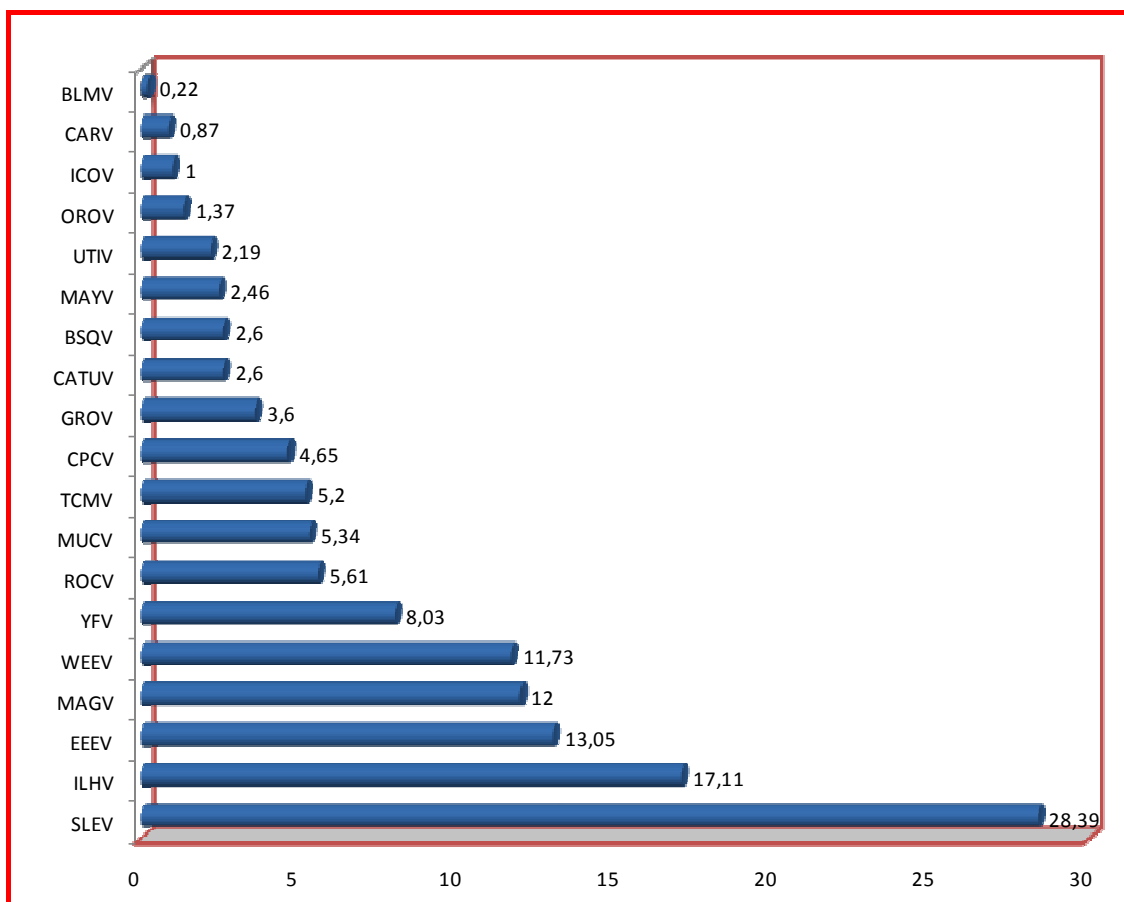


Figura 13- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus testados contra soros de herbívoros domésticos no estado do Pará.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

A diferença entre a prevalência de anticorpos IH para os 19 tipos de arbovírus testados e as mesorregiões do estado do Pará revelou, também, que o SLEV foi o arbovírus que apresentou maior prevalência de anticorpos IH

e, com ampla circulação em comparação com todos os demais arbovírus estudados ($p < 0,05$), exceto para o ILHV ($p = 0,1275$). O ILHV, também, apresentou diferença estatisticamente significativa para a maioria dos vírus testados ($p < 0,05$), com exceção dos vírus EEEV, MAGV, WEEV e YFV, para os quais não houve diferença significativa ($p > 0,05$), o EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em prevalência de anticorpos IH em comparação com os MAGV, WEEV, YFV, ROCV, MUCV, TCMV e CPCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais arbovírus ($p < 0,05$).

Os MAGV e WEEV não apresentaram diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação aos YFV, ROCV, MUCV, TCMV, CPCV e GROV ($p > 0,05$); porém apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência dos demais vírus ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) com todas as demais possíveis combinações.

3.1.2 Análise por Mesorregião

3.1.2.1 Mesorregião Metropolitana de Belém

Os arbovírus com maior prevalência de anticorpos IH foram os ILHV (18,21%), SLEV (15,22%), WEEV (13,43%), MAGV (10,14%) e EEEV

(9,85%), e os de menor prevalência foram os BLMV (0,30%), CARV (0,30%), MAYV (0,6%) e MUCV (0,89%), e não houve circulação de anticorpos IH para os OROV e ICOV (FIGURA 14).

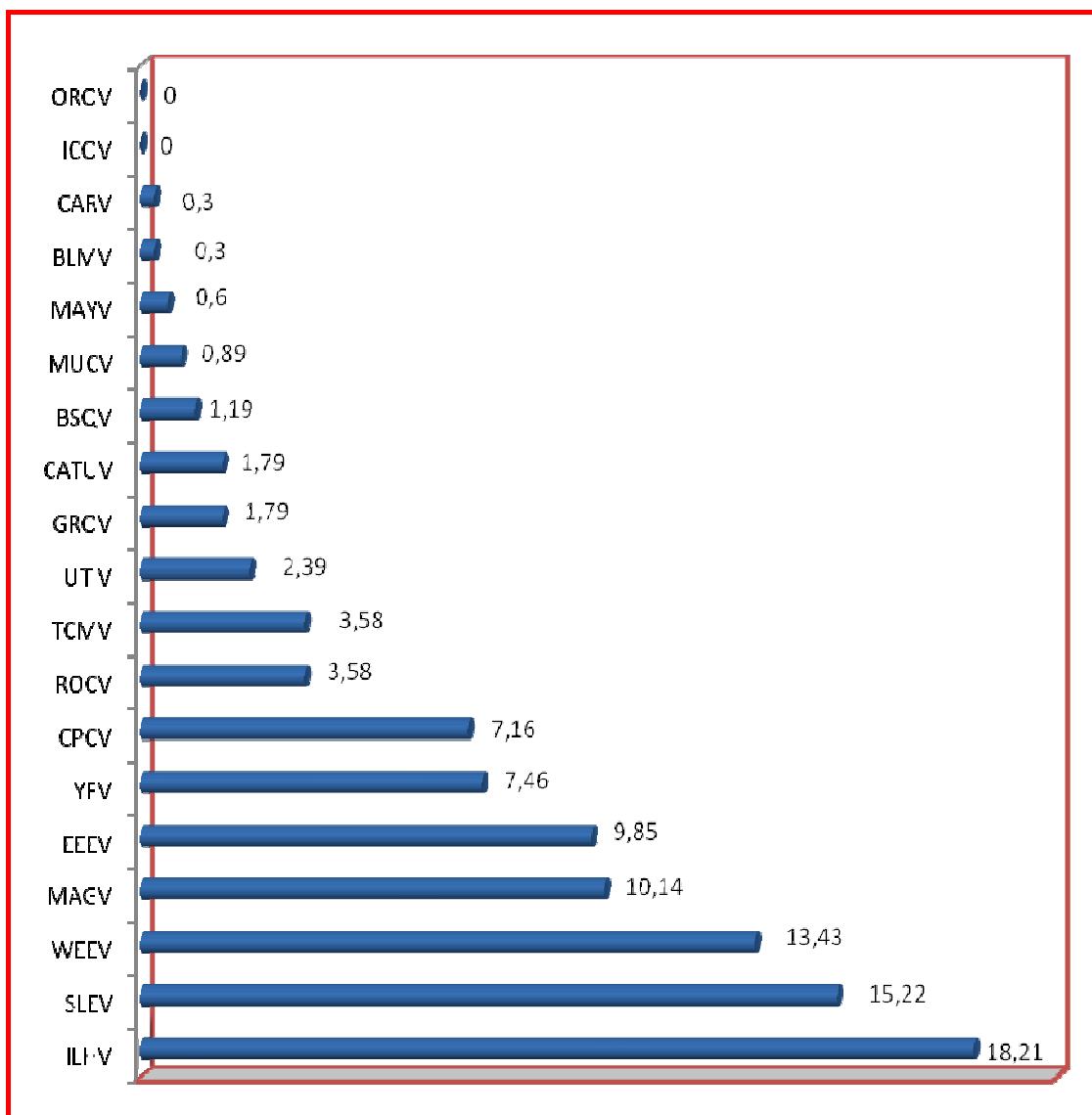


Figura 14- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião Metropolitana de Belém em soros de herbívoros domésticos

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

A prevalência de anticorpos IH para o ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à dos SLEV, WEEV, MAGV, EEEV e YFV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais vírus ($p<0,05$). O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos WEEV, MAGV, EEEV, YFV e CPCV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais vírus ($p<0,05$). O WEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos MAGV, EEEV, YFV e CPCV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais arbovírus estudados ($p<0,05$).

O MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência de anticorpos IH dos EEEV, YFV, CPCV, ROCV, TCMV e UTIV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus testados ($p<0,05$). O EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência de anticorpos IH relativa aos YFV, CPCV, ROCV, TCMV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais vírus ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) com todas as demais possíveis combinações.

3.1.2.2 Mesorregião do Nordeste Paraense

Os arbovírus com maior prevalência global de anticorpos IH foram os SLEV (36,21%), EEEV (17,75%), ILHV (17,52%), WEEV (16,82%), MAGV

(14,49%), YFV (10,51%) e TCMV (9,58%) e os de menor prevalência foram os BLMV (0,23%), CARV (0,93%) e MAYV (0,93%), não houve prevalência de anticorpos IH para o OROV (FIGURA 15).

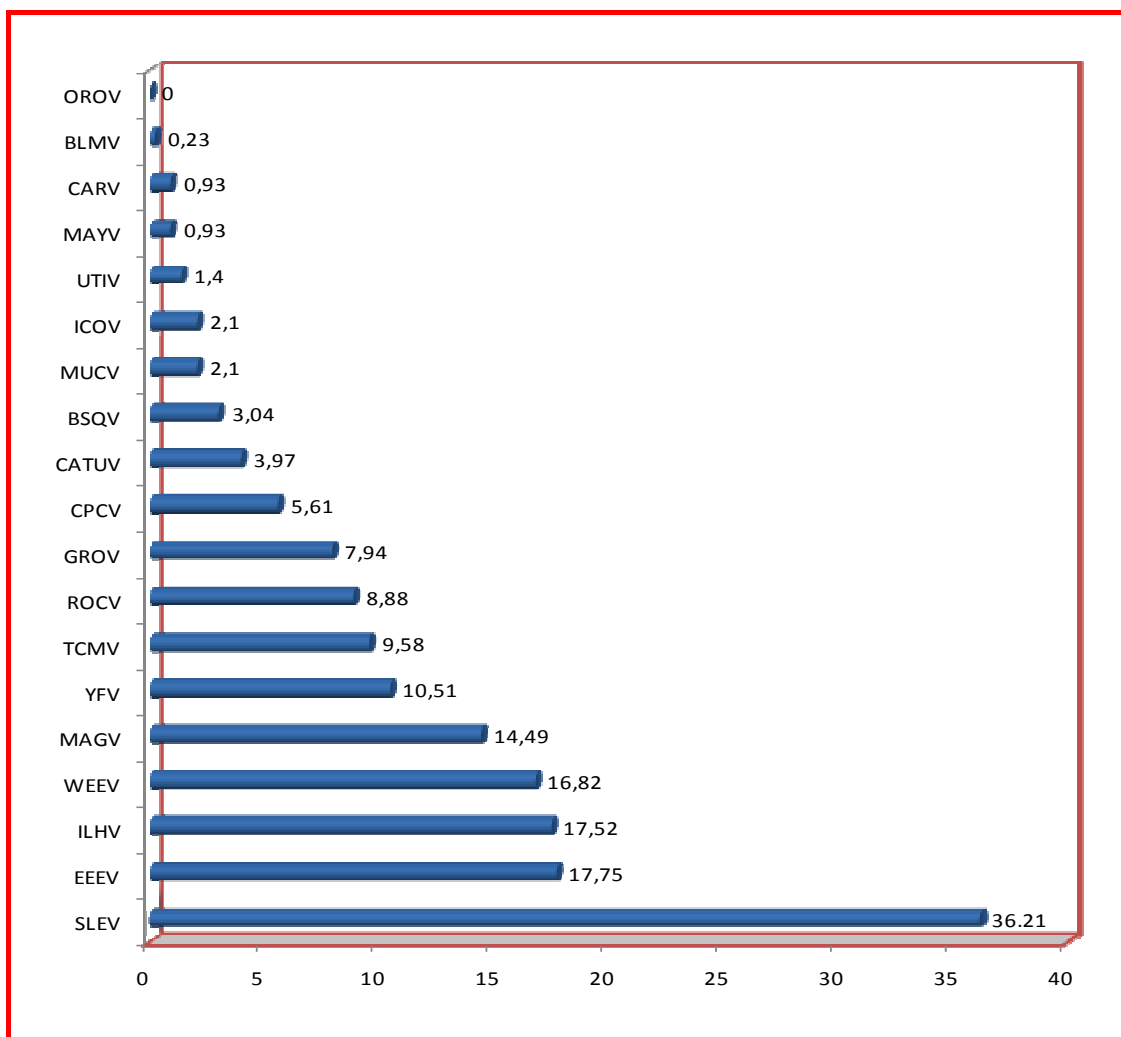


Figura 15- Prevalência de anticorpos para 19 tipos de arbovírus testados na mesorregião do Nordeste Paraense em soros de herbívoros domésticos.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O SLEV apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os arbovírus testados ($p < 0,05$). O EEEV não apresentou

diferença significativa na taxa de positividade em relação aos ILHV, WEEV, MAGV, YFV, ROCV e GROV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais vírus ($p<0,05$).

O ILHV não apresentou diferença significativa na positividade para anticorpos IH em relação aos MAGV, YFV, ROCV e GROV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em relação aos demais vírus ($p<0,05$). O WEEV não apresentou diferença significativa na taxa de soros positivos em relação aos MAGV, YFV, ROCV e GROV ($p>0,05$), porém diferença estatisticamente significativa foi observada em relação aos demais arbovírus testados ($p<0,05$).

O MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos em relação aos YFV, TCMV, ROCV, GROV e CPCV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a prevalência dos demais arbovírus testados ($p<0,05$). O YFV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos TCMV, ROCV, GROV, CPCV, CATUV e BSQV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus testados ($p<0,05$).

O TCMV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação aos ROCV, GROV, CPCV, CATUV, BSQV, MUCV e ICOV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus testados ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) com todas as demais possíveis combinações entre os arbovírus testados.

3.1.2.3 Mesorregião do Sudeste Paraense

Os arbovírus com maior prevalência de anticorpos IH em soros de herbívoros domésticos foram os SLEV (28,88%), CPCV (12,27%), EEEV (11,91%) e MAGV (9,75%) e os de menor prevalência foram os CATUV (0,36%), BLMV (0,36%), ICOV (0,36%), UTIV (0,72%), GROV (0,72%), OROV (1,08%) e TCMV (1,08%). Não houve registro de prevalência de anticorpos para CARV (FIGURA 16).

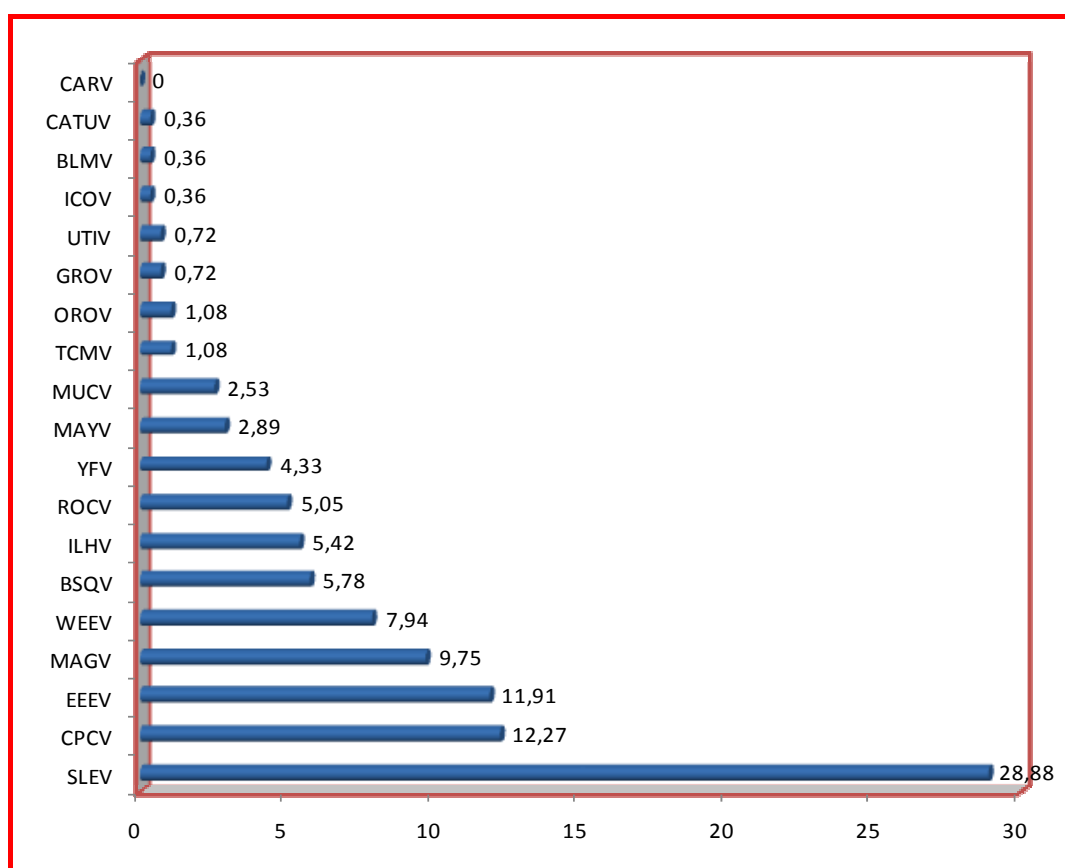


Figura 16- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Sudeste Paraense em soros de herbívoros domésticos

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O SLEV apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade em relação a todos os arbovírus examinados ($p < 0,05$). Por outro lado, o CPCV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos em relação à prevalência dos EEEV, MAGV, WEEV, BSQV, ILHV, ROCV e YFV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à dos demais arbovírus testados ($p < 0,05$).

O EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação à dos MAGV, WEEV, BSQV, ILHV, ROCV e YFV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a prevalência dos demais arbovírus testados ($p < 0,05$). Já o MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação à dos WEEV, BSQV, ILHV, ROCV, YFV, MAYV, MUCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a prevalência dos demais vírus ($p < 0,05$). Finalmente, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) com todas as demais possíveis combinações.

3.1.2.4 Mesorregião do Sudoeste Paraense

Os arbovírus com maior prevalência de anticorpos IH foram SLEV (28,39%), ILHV (22,9%), MAGV (21,29%), EEEV (18,39%), YFV (12,58%), MUCV (10,64%) e TCMV (10,64%) e os de menor prevalência foram os OROV

(0,32%), ICOV (0,64%) e CARV (0,97%). Ressalta-se que não houve positividade de anticorpos IH para o BLMV (FIGURA 17).

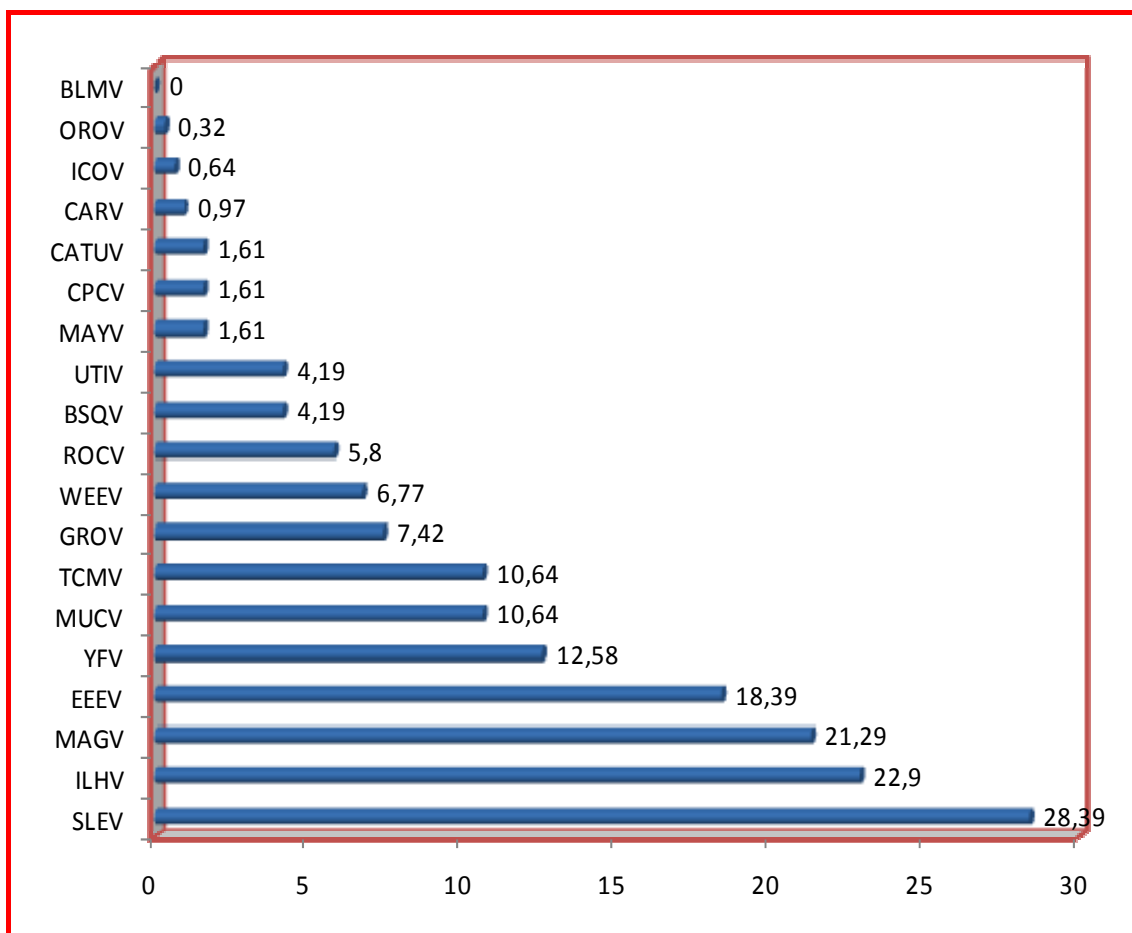


Figura 17- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Sudoeste Paraense em soros de herbívoros domésticos.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

Na mesorregião do Sudoeste Paraense o SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade em relação aos vírus ILHV, MAGV e EEEV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente

significativa em relação à prevalência dos demais arbovírus testados ($p < 0,05$). O ILHV não apresentou diferença estatística na taxa de anticorpos IH significativa em relação aos MAGV, EEEV, YFV, TCMV e MUCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus testados ($p < 0,05$).

O MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa de positividade por IH em relação à prevalência de anticorpos IH dos EEEV, YFV, TCMV e MUCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus testados ($p < 0,05$). O EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa de positividade em relação aos MAGV, EEEV, YFV, TCMV e MUCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus examinados ($p < 0,05$). O YFV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos TCMV, MUCV, GROV, WEEV, ROCV, UTIV e BSQV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais vírus ($p < 0,05$).

Os TCMV e MUCV não apresentaram diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação aos GROV, WEEV, ROCV, UTIV e BSQV ($p > 0,05$), porém apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus examinados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística de positividade significativa ($p > 0,05$) em relação a prevalência de anticorpos IH das demais possíveis combinações.

3.1.2.5 Mesorregião do Baixo Amazonas

Os arbovírus com maior prevalência de anticorpos IH foram os SLEV (23, 13%), WEEV (18,65%), MUCV (13,68%), EEEV (11,44%), MAYV (8,3%), YFV (7,96%), MAGV (7,46%) e os de menor prevalência foram os BLMV (0,50%), CARV (1,49), GROV (1,49%), OROV (1,74%), ICOV (1,74%), CPCV (1,99%), CATUV (2,24%) e BSQV (2,24%) (FIGURA 18).

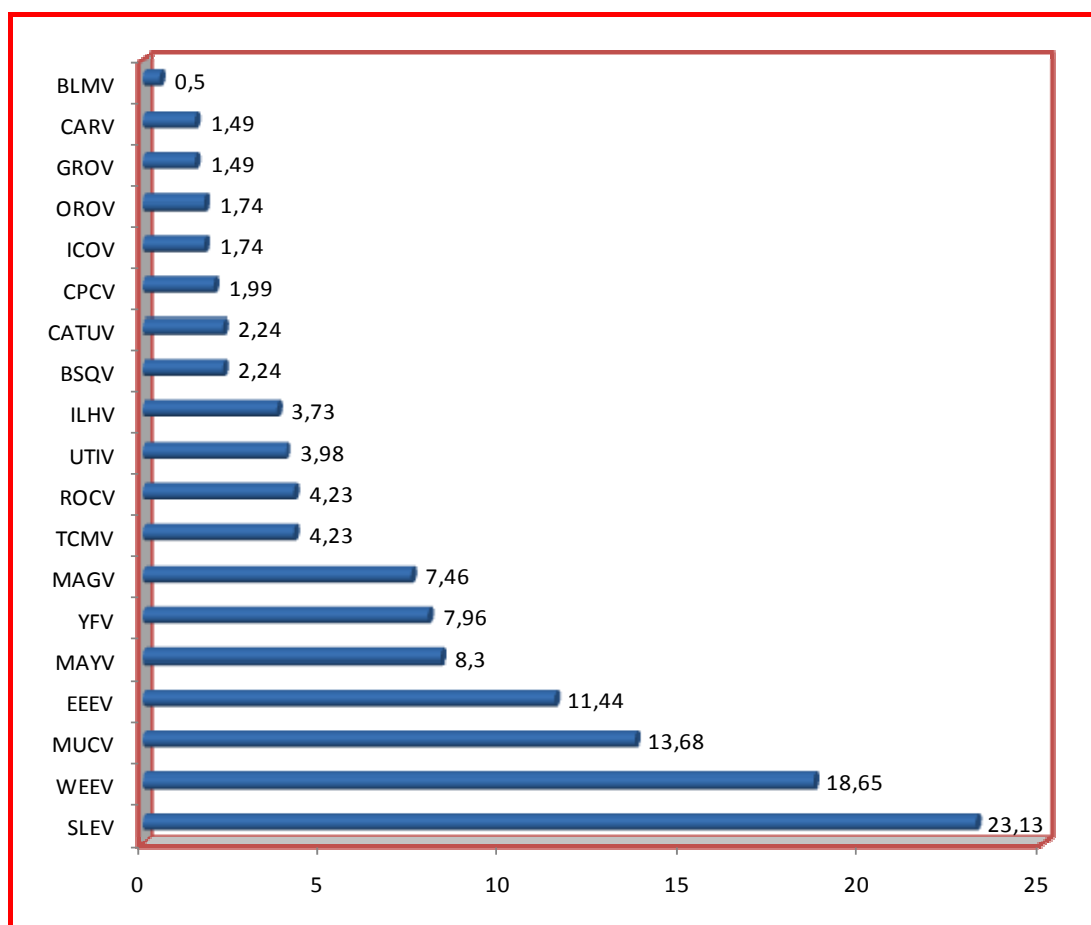


Figura 18- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus na mesorregião do Baixo Amazonas em soros de herbívoros domésticos

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade em relação aos vírus WEEV, MUCV, EEEV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência dos demais arbovírus testados ($p<0,05$). Já o WEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação à dos MUCV, EEEV, MAYV, YFV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à observada para os demais arbovírus examinados ($p<0,05$). O MUCV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de soros positivos em relação àquela dos EEEV, MAYV, YFV, MAGV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais arbovírus examinados ($p<0,05$).

3.1.2.6 Mesorregião do Marajó

Os arbovírus com maior prevalência de anticorpos IH foram os SLEV (35,31%), ILHV (31,43%), MAGV (10,02%) e EEEV (9,34%); e os de menor prevalência foram os BSQV (0,45%), MAYV (0,45%), UTIV (0,68%), ICOV (0,68%), CARV (1,14%), CPCV (1,59%), TCMV (1,82%), GROV (1,82%) e MUCV (2,28%). Não foi encontrado soro reativo para o BLMV (FIGURA 19).

A prevalência de anticorpos IH para SLEV e ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa entre si ($p=0,7244$), porém ambos os vírus mostraram diferença estatística altamente significativa na taxa de

anticorpos IH em comparação com os demais arbovírus testados ($p < 0,001$). O MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos IH em relação aos EEEV, ROCV, YFV, WEEV, OROV, CATUV e MUCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aquela obtida para os demais arbovírus examinados ($p < 0,05$).

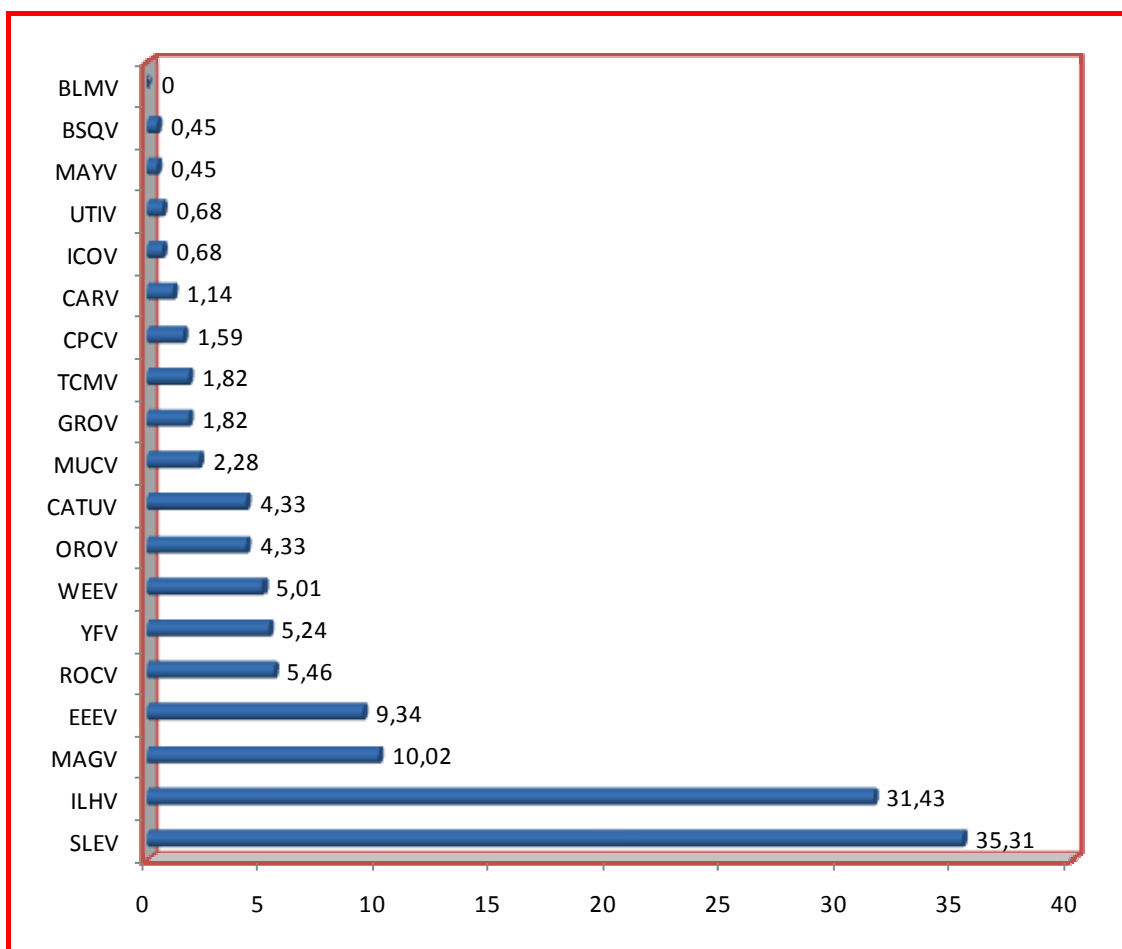


Figura 19- Prevalência de anticorpos para 19 tipos de arbovírus testados na mesorregião do Marajó em soros de herbívoros domésticos

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação à dos ROCV, YFV, WEEV, CATUV,

OROV, MUCV, TCMV e GROV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aquela dos demais arbovírus analisados ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) na positividade com todas as demais possíveis combinações.

3.1.3 Análise Comparativa nos Resultados Sorológicos do Teste IH em Soros dos Herbívoros Domésticos

Quando foi comparada a prevalência de anticorpos IH para arbovírus entre às espécies animais estudadas, observou-se que os equinos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos bubalinos ($p>0,05$), porém apresentaram diferença estatisticamente significativa para bovinos ($p=0,023$) e altamente significativa quando comparado com os ovinos ($p=0,0043$). A comparação entre todas as espécies de ruminantes testados não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (FIGURA 20).

Os equinos apresentaram prevalência de anticorpos IH para os 19 arbovírus estudados e as demais espécies (ruminantes) não apresentaram anticorpos para o BLMV. Anticorpos para os GROV e OROV não foram determinados em bovinos, assim como anticorpos para os MAYV, CPCV e CARV em ovinos.

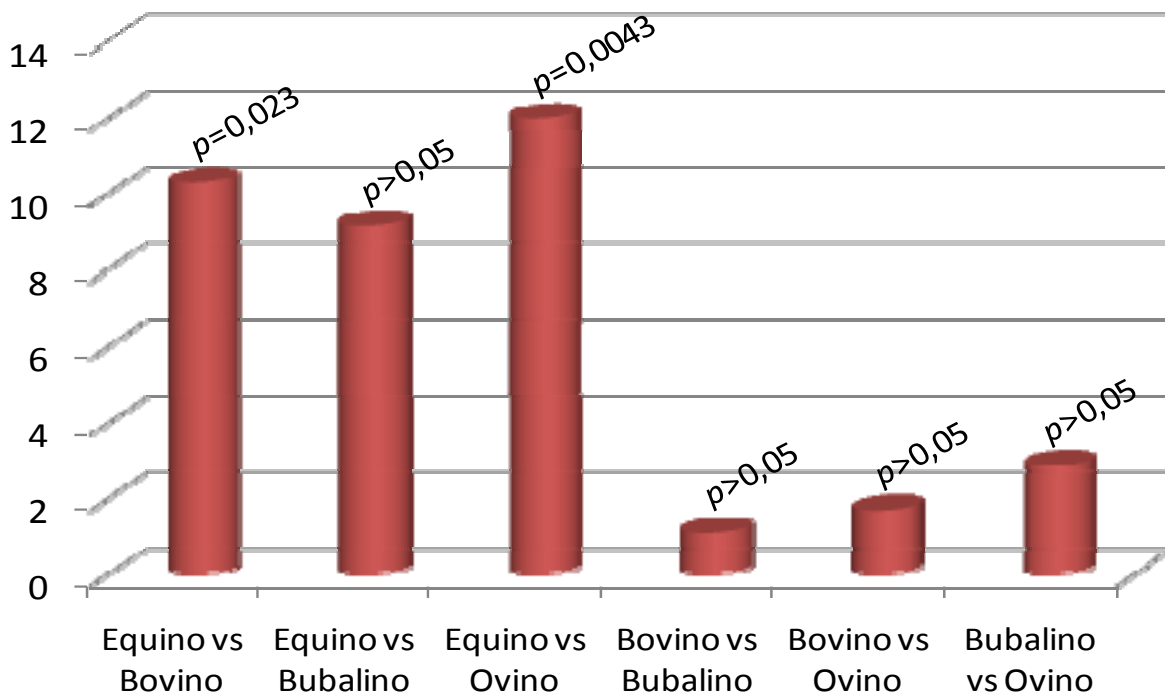


Figura 20- Comparação da média das prevalências de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus nos soros de herbívoros domésticos

Vs: *versus*, *p*: valor de significância estatística

3.1.4 Análise por Espécie de Herbívoro Doméstico Testado

3.1.4.1 Equinos

Os soros obtidos de equinos apresentaram maior prevalência de anticorpos IH para SLEV (48,10%), ILHV (34,34%), EEEV (29,75%), WEEV (22,54%), MAGV (21,89%) e YFV (13,76%) e menor prevalência para ICOV (0,26%), BLMV (0,66%), CARV (1,44%) e OROV (3,15%) (FIGURA 21). Os resultados totais de valores absolutos e relativos e a taxa de positividade para

os antígenos testados por IH de arbovírus em soros de herbívoros domésticos estão no APÊNDICE B.

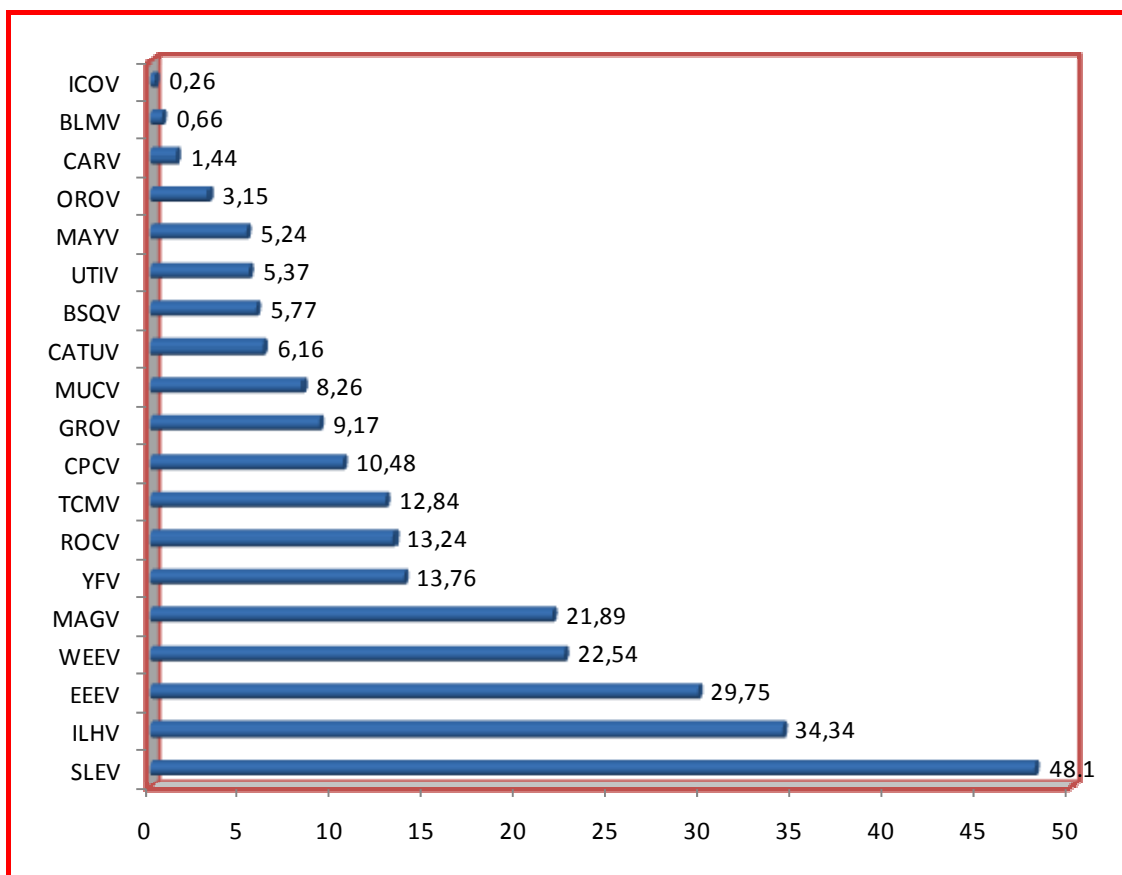


Figura 21- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de equinos no estado do Pará.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de anticorpos IH em relação ILHV ($p=0,1568$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa para os demais vírus ($p<0,05$), enquanto que o ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH para os EEEV, WEEV e MAGV ($p>0,05$), porém

apresentou diferença estatisticamente significativa para os demais arbovírus analisados ($p < 0,05$); o EEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao WEEV ($p = 0,3867$) e MAGV ($p = 0,3352$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência em comparação com os demais arbovírus testados ($p < 0,05$).

O WEEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência por IH em relação aos MAGV, YFV, ROCV, TCMV e CPCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência dos demais arbovírus testados ($p < 0,05$); o MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos em comparação aos YFV, ROCV, TCMV e CPCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa para os demais vírus ($p < 0,05$), o YFV apresentou diferença estatisticamente significativa em prevalência de anticorpos IH em relação à dos ICOV, BLMV, CARV e OROV ($p < 0,001$).

3.1.4.2 Bovinos

Os soros de bovinos apresentaram maior prevalência de anticorpos IH para SLEV (17,54%), YFV (11,28%) e ILHV (9,52%) e baixa prevalência para CATUV (0,25%), BSQV (0,25%) e MAYV (0,25%), e não houve prevalência de anticorpos IH para BLMV, OROV e GROV (FIGURA 22).

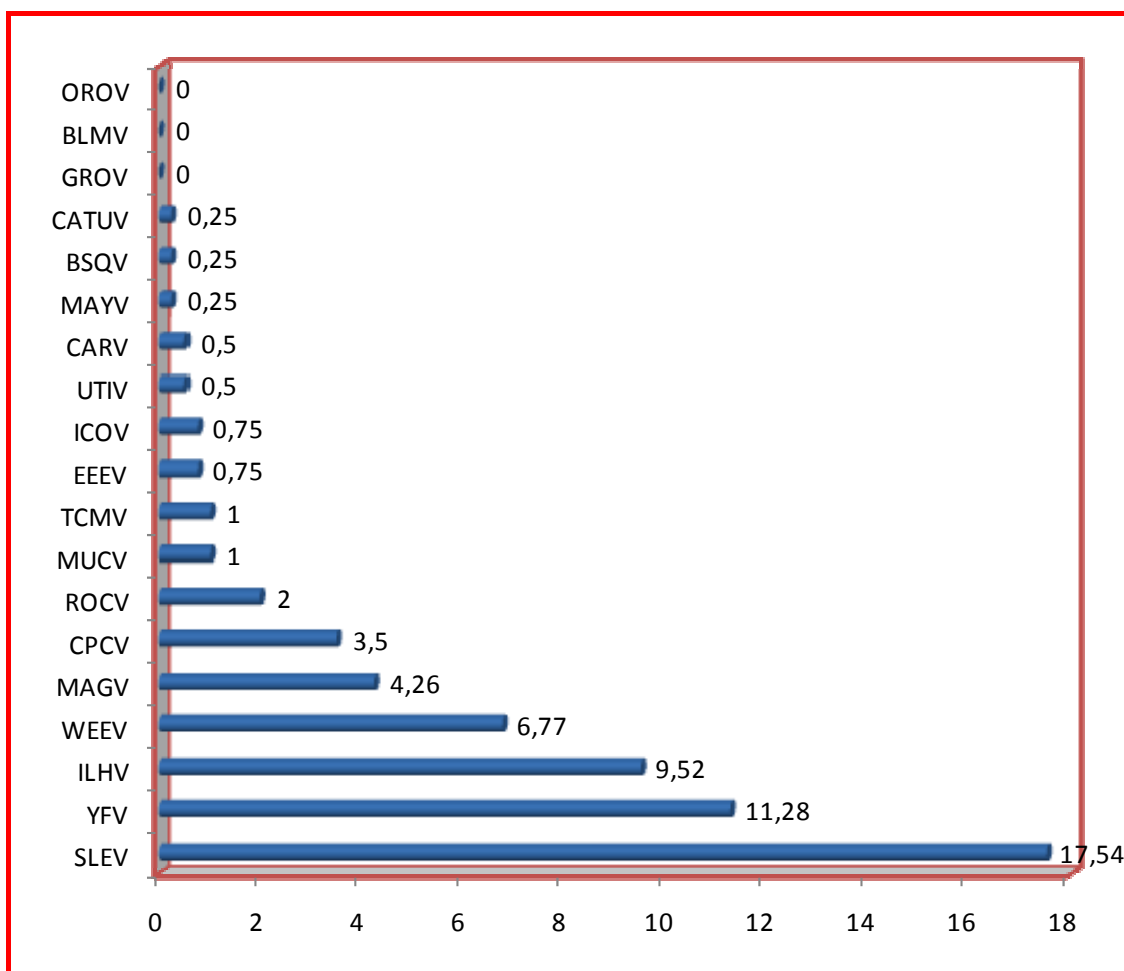


Figura 22- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de bovinos no estado do Pará.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos YFV ($p=0,3272$) e ILHV ($p=0,1772$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa maior para os demais arbovírus analisados ($p<0,05$), o YFV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade em comparação aquela obtida para ILHV, WEEV, MAGV e CPCV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa para

os demais arbovírus testados ($p < 0.05$); o ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH para WEEV, MAGV, CPCV e ROCV, porém apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado às prevalências dos demais arbovírus examinados ($p < 0,05$);

3.1.4.3 Bubalinos

Os soros de bubalinos apresentaram a maior prevalência de anticorpos para os SLEV (22,48%), ILHV (11,16%), EEEV (8,10%), WEEV (7,80%), MUCV (7,49%) e MAGV (7,34%) e menor prevalência para UTIV (0,46%), OROV (0,46%), CARV (0,92%), BSQV (0,92%), GROV (1,07%) e CATUV (1,07%), não havendo positividade para o BLMV (FIGURA 23).

O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos IH em relação ao ILHV ($p > 0.05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa para os demais arbovírus testados ($p < 0,05$), o ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade para EEEV, WEEV, MUCV, MAGV e YFV, porém apresentou diferença estatisticamente significativa para os demais arbovírus examinados ($p < 0.05$).

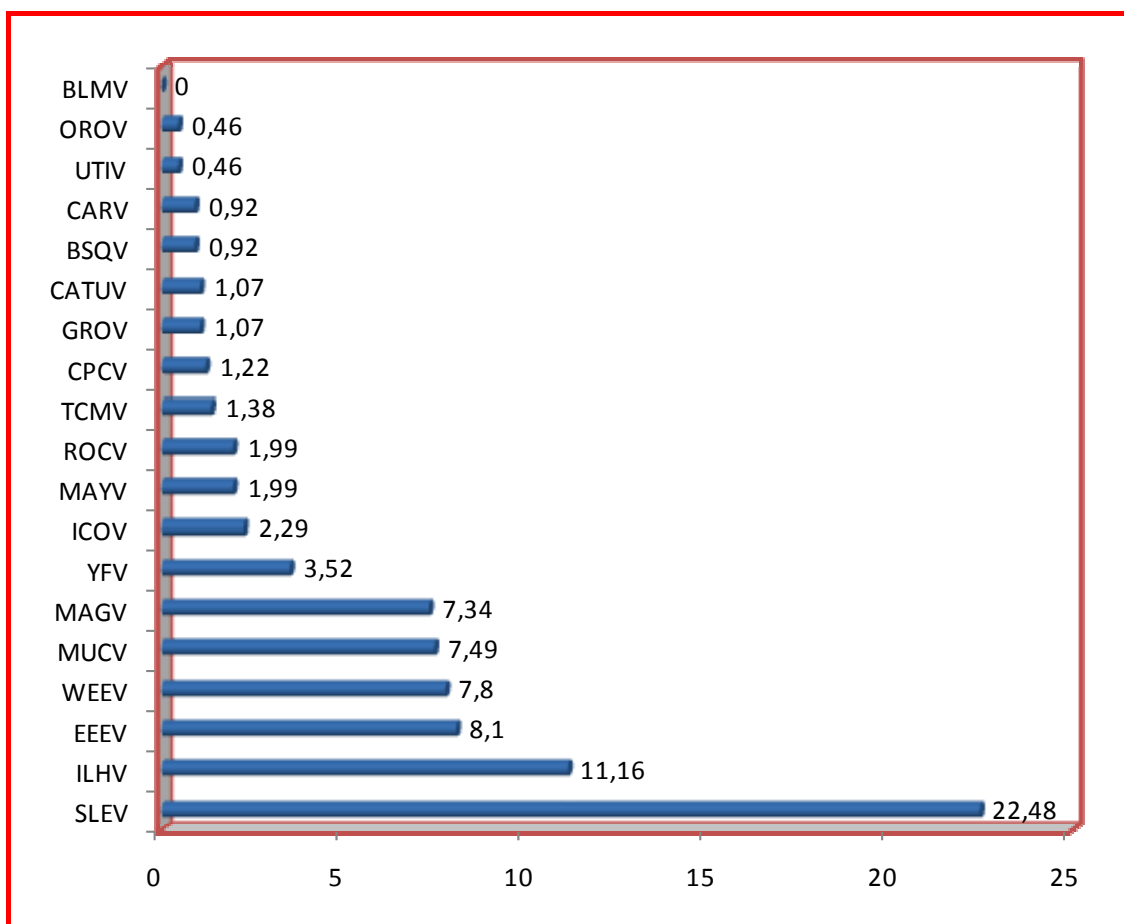


Figura 23- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de bubalinos no estado do Pará.

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

3.1.4.4 Ovinos

Os soros de ovinos apresentaram maior prevalência de anticorpos IH para SLEV (9,87%) e MAGV (8,05%) e menor prevalência para os MUCV (0,26%), ROCV (0,26%) e UTIV (0,26%); não havendo positividade para os MAYV, CPCV, BLMV e CARV (FIGURA 24). O SLEV não apresentou diferença

estatisticamente significativa na taxa de positividade para MAGV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa para a dos demais arbovírus testados por IH ($p<0,05$).

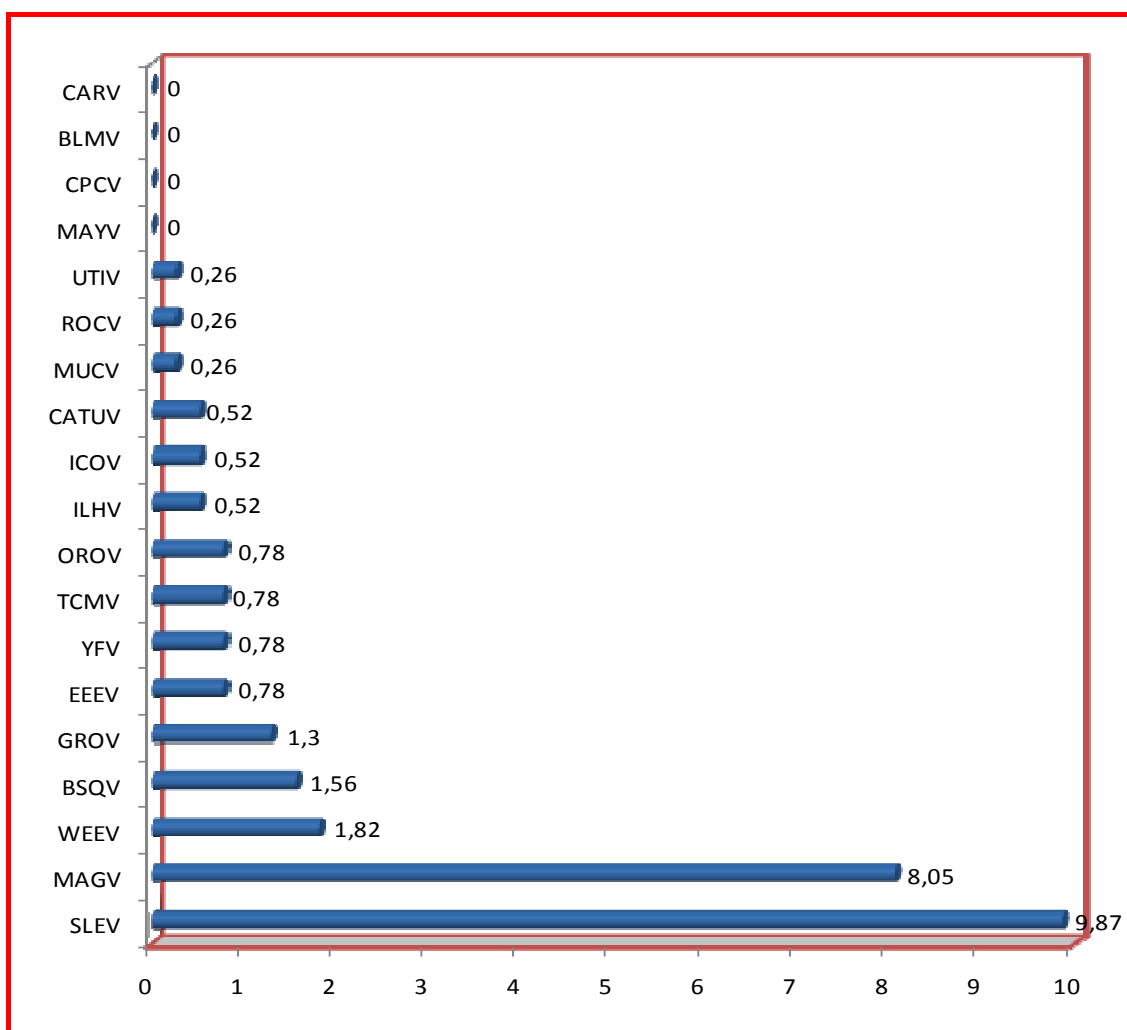


Figura 24- Prevalência de anticorpos IH para 19 tipos de arbovírus em soros de ovinos no estado do Pará

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

3.1.5 Análise Comparativa Entre Famílias de Arbovírus e Espécies Animais Testadas por IH

3.1.5.1 Família *Bunyaviridae*

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Bunyaviridae* em equinos foi distribuída pelos seguintes bunyavírus: MAGV (22,17%), TCMV (13,01%), GROV (9,26%), CATUV (6,24%), UTIV (5,44%), OROV (3,19%), CARV (1,46%), BLMV (0,66%) e ICOV (0,26%). O MAGV não apresentou diferença estatisticamente significativa na análise de positividade em relação ao TCMV ($p=0,1689$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais bunyavírus testados ($p<0,05$).

O TCMV não apresentou diferença significativa na taxa de positividade de anticorpos IH em comparação aos GROV, CATUV e UTIV ($p>0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais bunyavírus examinados ($p<0,05$); o GROV não apresentou diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade em relação aos CATUV, UTIV e OROV ($p>0,05$), porém apresentou diferença significativa em comparação aos demais bunyavírus examinados ($p<0,05$).

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Bunyaviridae* em soro de bovinos foi distribuída pelos seguintes bunyavírus: MAGV (4,26%), TCMV (1,00%), ICOV (0,75%), UTIV (0,50%), CARV (0,50%) e

CATUV (0,25%), não houve diferença estatisticamente significativa entre os vírus ($p>0,05$). Não houve positividade para GROV, BLMV e OROV.

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Bunyaviridae* em soro de búfalos foi distribuída pelos seguintes bunyavírus: MAGV (7,34%), ICOV (2,29%), TCMV (1,38%), CATUV (1,07%), GROV (1,07%), CARV (0,92%), OROV (0,46%) e UTIV (0,46%); não sendo registrada positividade para o BLMV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os vírus ($p>0,05$). A FIGURA 25 mostra a frequência relativa de anticorpos para 9 tipos de arbovírus da família *Bunyaviridae* nos soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará.

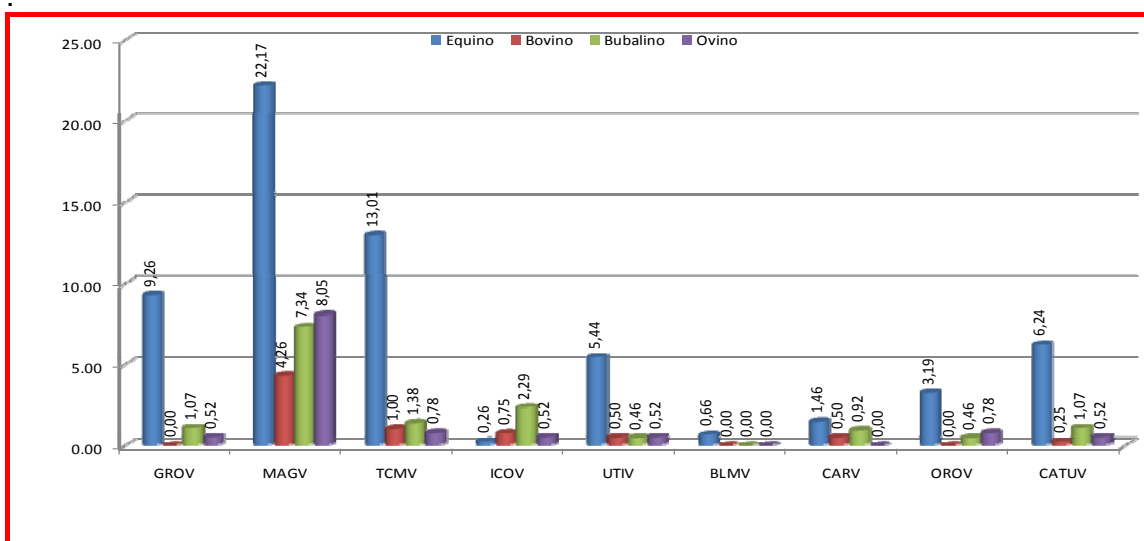


Figura 25- Frequência relativa de anticorpos IH para 9 tipos de arbovírus da família *Bunyaviridae* nos soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará.

GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Bunyaviridae* em soro de ovinos foi distribuído pelos seguintes vírus: MAGV

(8,05%), TCMV (0,78%), OROV (0,78%), GROV (0,52%), ICOV (0,52%), CATUV (0,52%) e UTIV (0,52%); não houve positividade para BLMV e CARV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os bunyavírus testados ($p>0,05$).

3.1.5.2 Família *Flaviviridae*

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Flaviviridae* em soros de equinos foi distribuída pelos seguintes flavivírus: SLEV (48,73%), ILHV (34,79%), YFV (13,94%), ROCV (13,41%), CPCV (10,62%) e BSQV (5,84%). O SLEV apresentou diferença estatística altamente significativa na prevalência de anticorpos IH em relação aos demais flavivírus testados ($p<0,0001$). O ILHV, também, apresentou diferença estatística altamente significativa em relação aos demais flavivírus examinados ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre e para os demais arbovírus.

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Flaviviridae* em soros de búfalos foi distribuída pelos seguintes flavivírus: SLEV (22,48%), ILHV (11,16%), YFV (3,52%), ROCV (1,99%), CPCV (1,22%) e BSQV (0,92%) (FIGURA 26). A prevalência de anticorpos IH para o SLEV apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais flavivírus examinados ($p<0,05$).

O ILHV não apresentou diferença estatisticamente significativa na positividade em relação ao YFV ($p>0,05$), porém apresentou diferença

estatisticamente significativa para os demais flavivírus testados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de anticorpos IH entre os demais flavivírus examinados.

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Flaviviridae* em soros de bovinos foi distribuída pelos seguintes flavivírus: SLEV (17,54%), YFV (11,28%), ILHV (9,52%), CPCV (3,51%), ROCV (2,01%) e BSQV (0,25%) (FIGURA 26). O SLEV não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência dos YFV e ILHV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à dos CPCV, ROCV e BSQV ($p < 0,05$).

O YFV não apresentou diferença estatisticamente significativa na prevalência quando comparado às do ILHV e CPCV ($p > 0,05$), porém apresentou diferença estatisticamente significativa para os ROCV e BSQV ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa para os demais flavivírus examinados.

A frequência de anticorpos para os vírus da família *Flaviviridae* em soros de ovinos foi distribuída pelos seguintes flavivírus: SLEV (9,87%), BSQV (1,56%), YFV (0,78%), ILHV (0,52%) e ROCV (0,26%); não houve positividade para o CPCV. O SLEV apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais flavivírus examinados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre às prevalências dos demais flavivírus testados ($p > 0,05$). A FIGURA 26 mostra a frequência relativa de anticorpos para 6 tipos de arbovírus da família *Flaviviridae* nos soros de espécies de herbívoros domésticos no Estado do Pará.

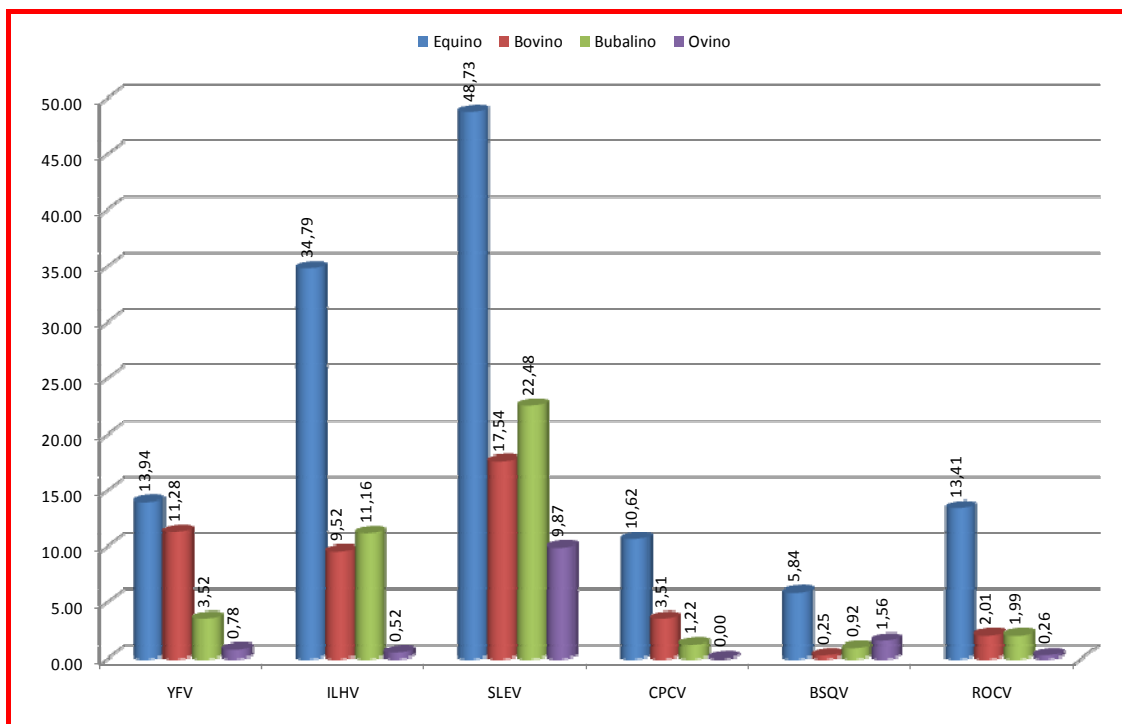


Figura 26- Frequência relativa de anticorpos IH para arbovírus da família *Flaviviridae* testados contra soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará.

YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*

3.1.5.3 Família *Togaviridae*

Para os vírus da família *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) a frequência de anticorpos IH em soros de equinos foi distribuída como segue: EEEV (30,14%), WEEV (22,84%), MUCV (8,36%) e MAYV (5,31%). O EEEV apresentou diferença estatisticamente significativa na frequência de anticorpos em relação aos demais alfavírus testados ($p < 0,01$). O WEEV apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos MUCV e MAYV

($p < 0,01$). Os MUCV e MAYV não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p = 0,6269$).

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Togaviridae* em soros de búfalos foi distribuída pelos seguintes alfavírus: EEEV (8,10%), WEEV (7,80%), MUCV (7,49%) e MAYV (1,99%). Não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de positividade entre os vírus testados ($p > 0,05$). A FIGURA 27 mostra a frequência relativa de anticorpos para 4 tipos de arbovírus da família *Togaviridae* nos soros de espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará.

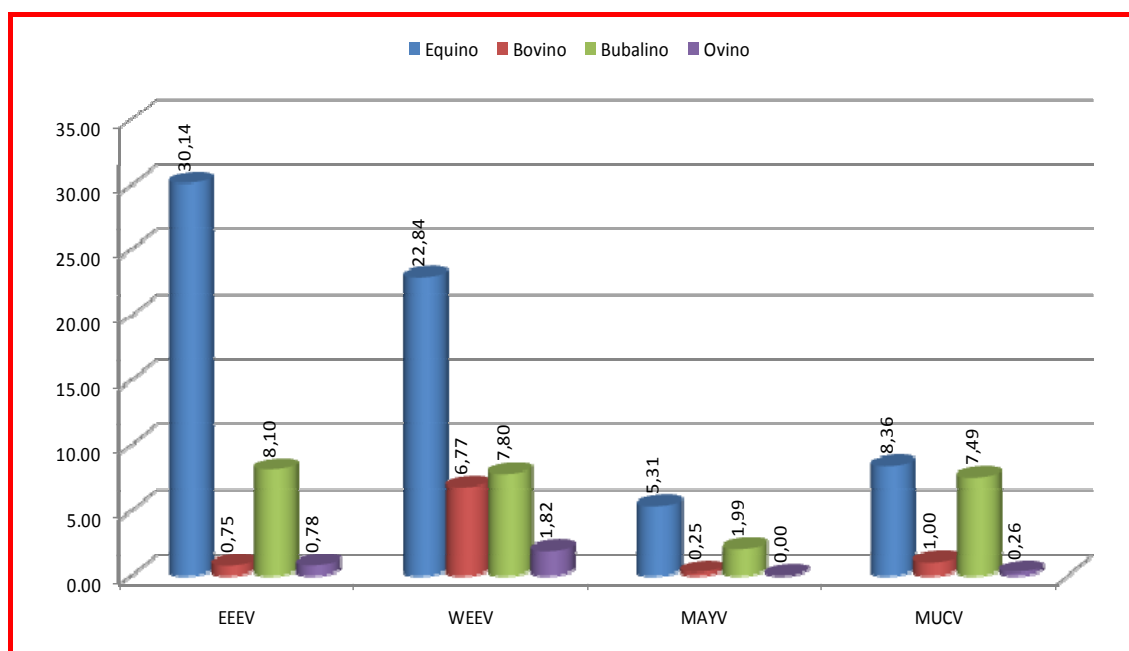


Figura 27- Frequência relativa de anticorpos IH para arbovírus da família *Togaviridae* em soros de diferentes espécies de herbívoros domésticos no estado do Pará

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Togaviridae* em soros de bovinos foi distribuída pelos seguintes alfavírus: WEEV (6,77%),

MUCV (1,00%), EEEV (0,75%) e MAYV (0,25%). Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência entre os vírus examinados ($p>0,05$).

A frequência de anticorpos IH para os vírus da família *Togaviridae* em ovinos foi distribuída pelos seguintes alfavírus: WEEV (1,82%), EEEV (0,78%) e MUCV (0,26%). Não houve positividade para o MAYV; igualmente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os vírus testados ($p>0,05$).

3.1.5.4 Reações Monotípicas

As reações monotípicas representaram 34% do total de reações positivas, e foram distribuídas como segue: família *Bunyaviridae* prevalência em bubalinos de 89,80%; em bovinos de 82,76%; em ovinos de 71,11%; e em equinos de 23,23%. Família *Flaviviridae* prevalência em ovinos de 86,00%; em bubalinos 45,19%; em bovinos 32,39% e em equinos 18,67%. Família *Togaviridae* prevalência em ovinos de 90,91%; em bovinos 88,57%; em bubalinos 57,83% e em equinos 22,11% (FIGURA 28). O APÊNDICE C mostra os valores absolutos e relativos globais das frequências de reações monotípicas por vírus e espécie de herbívoro doméstico.

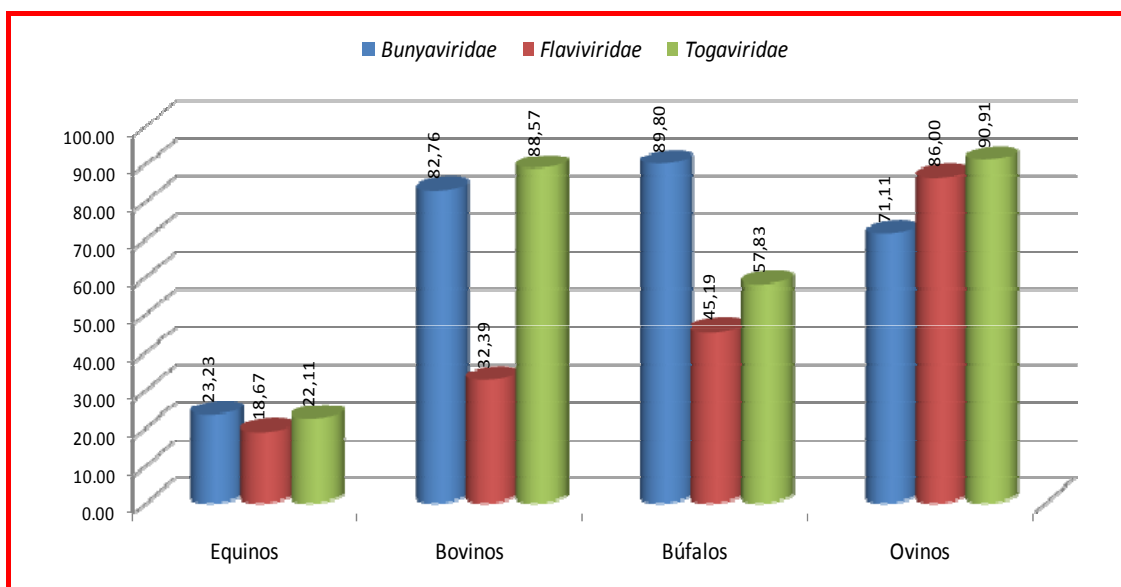


Figura 28- Frequência relativa de reações monotípicas por testes IH para as diferentes famílias de arbovírus e espécies animais.

A comparação entre as reações monotípicas nas diferentes famílias de arbovírus e espécies animais, mostrou que para os arbovírus testados das famílias *Bunyaviridae* e *Togaviridae* em todas as espécies de ruminantes, a frequência de anticorpos foi estatisticamente significativa e maiores em termos de reações monotípicas que as obtidas em equinos ($p < 0,0001$).

Na família *Flaviviridae* apenas a comparação das frequências de reações monotípicas em soros de bovinos e equinos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), sendo que as demais correlações entre equinos e bubalinos, e equinos e ovinos apresentaram diferença estatística altamente significativa de reações monotípicas para os ruminantes examinados ($p < 0,0001$).

A comparação da taxa de positividade de reações monotípicas entre os ruminantes para arbovírus da família *Bunyaviridae* não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$); a família *Flaviviridae* apresentou diferença estatística altamente significativa nas reações monotípicas para ovinos e demais espécies de ruminantes ($p<0,0001$), mas não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre bovinos e bubalinos.

Na família *Togaviridae* houve diferença estatística altamente significativa na frequência de reações monotípicas para bovinos em relação aos bubalinos ($p=0,014$) e, também, para ovinos em relação aos bubalinos ($p=0,0085$), mas não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre bovinos e ovinos ($p>0,05$).

As reações monotípicas nas espécies animais para os vírus da família *Bunyaviridae* foram como segue: em equinos ocorreram reações monotípicas para o MAGV (40,72%), BLMV (40,00%), TCMV (19,39%), OROV (16,67%), GROV (14,28%), CATUV (6,38%) e UTIV (4,88%), e ausência de reações monotípicas para os ICOV e CARV.

Em bovinos ocorreram reações monotípicas para MAGV (88,24%), TCMV (100%), ICOV (66,67%), CATUV (100%), CARV (50,00%) e UTIV (50,00%), os BLMV, GROV e OROV não apresentaram reações de anticorpos nessa espécie animal; em búfalos ocorreram reações monotípicas para MAGV (89,58%), ICOV (100%), TCMV (88,89%), GROV (85,71%), CATUV (85,71%), CARV (100%), UTIV (100%) e OROV (33,33%), o BLMV não apresentou reações de anticorpos nessa espécie animal; em ovinos ocorreram

reações monotípicas para MAGV (87,10%), TCMV (100%), ICOV (50,00%) e GROV (50,00%); não houve reações monotípicas para CATUV, UTIV e OROV, e os BLMV e CARV não apresentaram reações de anticorpos IH nessa espécie animal.

As reações monotípicas nas espécies animais para os vírus da família *Flaviviridae* foram como segue: em equinos ocorreram reações monotípicas para SLEV (33,24%), ILHV (18,32%), BSQV (6,82%), CPCV (3,75%), YFV (2,86%), não houve reações monotípicas para o ROCV.

Em bubalinos ocorreram reações monotípicas para SLEV (55,78%), ILHV (34,25%), YFV (39,13%), BSQV (66,67%), ROCV (15,38%), não houve reações monotípicas para o CPCV; em bovinos ocorreram reações monotípicas para SLEV (34,29%), YFV (40,00%), ILHV (26,32%), CPCV (28,57%), ROCV (12,50%), não houve reações monotípicas para o BSQV; em ovinos ocorreram reações monotípicas para SLEV (94,74%), BSQV (83,33%), ILHV (50,00%), YFV (33,33%), não houve reações monotípicas para o ROCV; o CPCV não apresentou reações positivas de anticorpos IH nessa espécie animal.

As reações monotípicas para os vírus da família *Togaviridae* foram como segue: em equinos ocorreram reações monotípicas para EEEV (32,60%), MUCV (14,29%), WEEV (13,95%) e MAYV (10,00%); em búfalos ocorreram reações monotípicas para EEEV (71,70%), WEEV (60,78%), MUCV (46,94%) e MAYV (30,77%); em bovinos ocorreram reações monotípicas para MAYV (100%), WEEV (92,59%), MUCV (75,00%) e EEEV (66,67%); em ovinos ocorreram reações monotípicas para WEEV (100%), EEEV (66,67%), MUCV

(100%), não houve reação positiva de anticorpos IH para o MAYV nessa espécie animal.

3.2 RESULTADOS DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA PARA DETECÇÃO DE IgG PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM SOROS DE EQUINOS, BOVINOS, BUBALINOS E OVINOS

3.2.1 Padronização do Teste para Todas as Espécies de Herbívoros Domésticos Analisados

Não houve diferença nos resultados com relação à sensibilização das microplacas com anticorpos de captura quando a incubação foi realizada *overnight* a 4° C ou 2 horas a 37° C em câmara úmida. O bloqueio que se mostrou mais eficiente foi obtido quando se utilizou o leite desnatado (*fat free*) a 5% em tween-20 0,05% por uma hora em câmara úmida a 37° C. A utilização do antígeno pode variar de 4 UHA, 16 UHA e 32 UHA diluído em leite *fat free* 5% em tween-20 0,05% sem alterar a resposta do teste. A leitura em espectrofotômetro, entretanto, tem que ser realizada após 30 minutos da colocação do substrato.

A diluição do soro para equinos variou com a família do vírus utilizada, sendo de 1: 100 para os vírus da família *Togaviridae* e 1: 200 para os vírus da família *Bunyaviridae* e *Flaviviridae*. Para os ruminantes a diluição do

soro foi de 1: 100 para todos os vírus estudados diluídas em leite *fat free* 5% com tween-20 0,05%.

O conjugado foi usado 1: 10.000 em equinos, 1: 100 para os bubalinos; 1: 1.000 para os bovinos e 1: 10.000 para os ovinos diluídos em leite *fat free* 5% com tween-20 0,05%. A recomendação da técnica para os herbívoros domésticos está no APÊNDICE D.

3.2.2 Comparação dos Resultados do Teste Imunoenzimático Sanduíche Indireto para Detecção de IgG com o Teste de IH (Padrão Ouro)

Em equinos a sensibilidade variou de 40,85% (ILHV) a 100% (ICOV e BLMV), a especificidade foi baixa e variou de 39,71% (ROCV) a 67,0% (MAYV), a acurácia variou de 41% (ILHV) a 65,52% (MAYV) e padrões de Falso-positivo, Falso-negativo, Prevalência, Valor preditivo do teste positivo, Valor preditivo do teste negativo, *Likelihood ratio* positivo e *Likelihood ratio* negativo estão representados para todos os vírus estudados no APÊNDICE E.

Em bovinos a sensibilidade variou de 0,00% (EEEV, YFV, ILHV, CPCV, ROCV, BSQV, MAGV e CATUV) a 50% (WEEV, MAYV, MUCV, TCMV, GROV, CARV, OROV, UTIV, BLMV e ICOV), a especificidade variou de 74,29% (UTIV e BLMV) a 95,65% (EEEV), a acurácia variou de 75,71% (SLEV) a 94,29% (EEEV e WEEV) e padrões de Falso-positivo, Falso-negativo, Prevalência, Valor preditivo do teste positivo, Valor preditivo do teste negativo,

Likelihood ratio positivo e *Likelihood ratio* negativo estão representados para todos os vírus estudados no APÊNDICE F.

Em ovinos a sensibilidade variou de 0,00% (YFV, ILHV, ROCV, CATUV, TCMV e OROV) a 50% (EEEV, MAYV, MUCV, BSQV, CPCV, GROV, CARV, UTIV, BLMV e ICOV), a especificidade variou de 51,90% (EEEV) a 89,24% (CARV), a acurácia variou de 51,88% (EEEV) a 89,24% (CARV) e os padrões de Falso-positivo, Falso-negativo, Prevalência, Valor preditivo do teste positivo, Valor preditivo do teste negativo, *Likelihood ratio* positivo e *Likelihood ratio* negativo estão representados para todos os vírus estudados no APÊNDICE G.

3.2.3 Resultados do Teste de Correlação Linear de Pearson para as Amostras de Soro de Equinos, Bovinos e Ovinos Testados pelo Teste Imunoenzimático - ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG

Em todas as espécies animais houve um elevado grau de correlação entre as amostras testadas que variou de uma força moderada a grande maioria que apresentou de forte a perfeita.

Em equinos o teste de correlação linear de Pearson mostrou um índice r (pearson) para a famílias *Flaviviridae* que variou de 0,78 entre CPCV e VSLE a 0,95 entre CPCV e BSQV, e na família *Togaviridae* variou de 0,89 entre EEEV e MUCV a 0,96 entre EEEV e WEEV (TABELA 1). A família

Bunyaviridae mostrou um índice *r* que variou de 0,71 entre GROV e UTIV e 0,96 entre MAGV e TCMV (TABELA 2).

Tabela 1- Resultados do índice de correlação linear para as famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* analisados pelo Teste ELISA Sanduíche Indireto para Detecção de IgG em soros de ovinos, bovinos e equinos ($p < 0,0001$).

Família de Arbovírus	Comparações	Ovinos		Bovinos		Equinos	
		<i>r</i>	R2	<i>r</i>	R2	R	R2
<i>Flaviviridae</i>	YFV e ILHV	0,87	0,75	0,96	0,92	0,87	0,76
	YFV e CPCV	0,58	0,34	0,96	0,92	0,93	0,86
	YFV e SLEV	0,84	0,70	0,95	0,91	0,90	0,82
	YFV e ROCV	0,85	0,73	0,97	0,94	0,90	0,81
	YFV e BSQV	0,91	0,83	0,96	0,92	0,94	0,88
	ILHV e CPCV	0,54	0,29	1,00	0,99	0,88	0,77
	ILHV e SLEV	0,92	0,85	1,00	0,99	0,79	0,63
	ILHV e ROCV	0,74	0,55	1,00	0,99	0,83	0,69
	ILHV e BSQV	0,87	0,75	1,00	1,00	0,90	0,80
	CPCV e SLEV	0,51	0,26	1,00	0,99	0,78	0,60
	CPCV e ROCV	0,62	0,38	0,99	0,99	0,83	0,69
	CPCV e BSQV	0,68	0,46	1,00	0,99	0,95	0,91
	SLEV e ROCV	0,72	0,51	0,99	0,99	0,93	0,87
	SLEV e BSQV	0,83	0,69	0,99	0,99	0,83	0,69
	ROCV e BSQV	0,90	0,80	1,00	0,99	0,87	0,75
<i>Togaviridae</i>	EEEV e WEEV	0,85	0,72	0,99	0,98	0,96	0,92
	EEEV e MAYV	0,85	0,73	0,98	0,96	0,89	0,80
	EEEV e MUCV	0,79	0,63	0,98	0,96	0,89	0,79
	WEEV e MAYV	0,82	0,67	0,99	0,98	0,91	0,84
	WEEV e MUCV	0,77	0,60	0,99	0,97	0,93	0,87
	MAYV e MUCV	0,84	0,70	0,99	0,98	0,93	0,86

r- valor da correlação de *Pearson*; *p*-valor: valor de *p* de significância estatística; R2: valor de determinação; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*, MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*.

Tabela 2- Resultados do índice de correlação linear para a família *Bunyaviridae* analisados pelo Teste Imunoenzimático Sanduíche Indireto para Detecção de IgG em soros de ovinos, bovinos e equinos ($p < 0,0001$)

Antígeno	Comparações	Ovinos		Bovinos		Equinos	
		r	R2	r	R2	r	R2
Viral	MAGV e CATUV	0.82	0.67	0.98	0.97	0.93	0.86
	MAGV e TCMV	0.96	0.92	0.98	0.96	0.96	0.92
	MAGV e GROV	0.85	0.72	0.97	0.94	0.77	0.59
	MAGV e CARV	0.63	0.40	0.81	0.65	0.95	0.91
	MAGV e OROV	0.76	0.57	0.94	0.88	0.90	0.82
	MAGV e UTIV	0.79	0.62	0.97	0.95	0.93	0.87
	MAGV e BLMV	0.79	0.62	0.97	0.94	0.94	0.87
	MAGV e BSQV	0.71	0.51	0.97	0.94	0.93	0.87
	CATUV e TCMV	0.77	0.59	0.99	0.98	0.91	0.83
	CATUV e GROV	0.95	0.90	0.99	0.98	0.77	0.60
	CATUV e CARV	0.74	0.55	0.80	0.64	0.95	0.90
	CATUV e OROV	0.91	0.84	0.96	0.92	0.94	0.89
	CATUV e UTIV	0.96	0.91	0.98	0.96	0.92	0.84
	CATUV e BLMV	0.88	0.78	0.98	0.96	0.95	0.89
	CATUV e ICOV	0.75	0.56	0.98	0.96	0.92	0.84
	TCMV e GROV	0.81	0.66	0.98	0.95	0.79	0.62
	TCMV e CARV	0.61	0.38	0.81	0.65	0.94	0.89
	TCMV e OROV	0.70	0.49	0.95	0.90	0.90	0.82
	TCMV e UTIV	0.72	0.51	0.97	0.95	0.92	0.84
	TCMV e BLMV	0.74	0.54	0.98	0.95	0.93	0.86
	TCMV e ICOV	0.69	0.48	0.97	0.95	0.94	0.89
	GROV e CARV	0.74	0.55	0.81	0.66	0.80	0.63
	GROV e OROV	0.89	0.78	0.97	0.93	0.79	0.63
	GROV e UTIV	0.94	0.88	0.98	0.96	0.71	0.50
	GROV e BLMV	0.84	0.71	0.98	0.97	0.72	0.52
	GROV e ICOV	0.73	0.53	0.98	0.97	0.77	0.59
	CARV e OROV	0.70	0.49	0.80	0.65	0.94	0.89
	CARV e UTIV	0.74	0.55	0.82	0.67	0.91	0.83
	CARV e BLMV	0.65	0.43	0.83	0.68	0.95	0.90
	CARV e ICOV	0.58	0.34	0.83	0.69	0.92	0.85
	OROV e UTIV	0.90	0.81	0.96	0.93	0.91	0.83
	OROV e BLMV	0.87	0.75	0.97	0.94	0.94	0.88
	OROV e ICOV	0.70	0.49	0.97	0.94	0.93	0.87
UTIV e BLMV	0.86	0.74	0.99	0.98	0.94	0.89	
UTIV e ICOV	0.71	0.50	0.99	0.98	0.95	0.89	
BLMV e ICOV	0.77	0.60	1.00	0.99	0.94	0.89	

r: valor da correlação de Pearson; p: valor de p de significância estatística; R2: valor de determinação; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

Em bovinos o teste de correlação linear de Pearson mostrou um índice r para a família *Flaviviridae* que variou de 0,95 entre YFV e SLEV a 1,00 entre ILHV e BSQV; e na família *Togaviridae* que variou de 0,98 entre WEEV e MUCV, EEEV e MAYV a 0,99 entre EEEV e WEEV, WEEV e MAYV; MAYV e MUCV (TABELA 1). Na família *Bunyaviridae* variou de 0,80 entre CATUV e CARV a 1,00 entre BLMV e ICOV (TABELA 2).

Em ovinos o teste de correlação linear de Pearson mostrou um índice r para a família *Flaviviridae* que variou de 0,51 entre CPCV e SLEV a 0,92 entre ILHV e SLEV; e na família *Togaviridae* variou de 0,77 entre WEEV e MUCV a 0,85 entre EEEV e MAYV (TABELA 1). Na família *Bunyaviridae* variou de 0,58 entre CARV e ICOV a 0,96 entre MAGV e TCMV (TABELA 2).

4- DISCUSSÃO

A Amazônia se localiza ao norte da América do Sul, é formada principalmente, pelas bacias dos rios Amazonas e Orinoco; está recoberta pela maior floresta equatorial do mundo e tem mata de terra firme, mata de várzea e mata de igapó abrangendo parte do território de nove países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, República da Guiana, Suriname e Venezuela (Koogan & Houaiss, 2000). A Amazônia brasileira abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo uma área de 5.033.072 Km², ou seja, 61% do território brasileiro e o Estado do Pará têm uma área de 1.248.042 km² de extensão, que representa 17% do território brasileiro e 26% da Amazônia (IBGE, 2006a).

A pan-Amazônia é considerada o maior reservatório de arbovírus do mundo e a região Amazônica brasileira mantém a maior variedade de arbovírus até hoje isolada. No Brasil, em particular, na Amazônia brasileira, coabitam em número bastante elevado várias espécies de dípteros hematófagos e vertebrados silvestres. Esta diversidade de espécies e seu elevado contingente populacional constituem um achado único no mundo e propiciam condições ambientais bastante favoráveis à manutenção de vírus, em particular dos arbovírus em natureza (Vasconcelos *et al.*, 1992, Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

O desequilíbrio desse ecossistema por fatores variados como desmatamento, construção de rodovias e represas (Pinheiro *et al.*, 1996; Vasconcelos, 1999), colonização e urbanização de áreas novas após construção de ferrovias (Le Duc & Pinheiro, 1988) e o uso inadequado da terra e subsolo (Dégallier *et al.*, 1987; Dégallier *et al.*, 1992, Vasconcelos *et al.*, 2001) podem causar o surgimento de novas enfermidades causadas por arbovírus. Fatores esses observados em todos os locais onde viviam os animais testados neste estudo em todas as mesorregiões do Estado do Pará.

O risco de infecção por arbovírus depende da distribuição geográfica e em geral, essa distribuição depende da presença do vetor e do hospedeiro envolvidos na transmissão, por isso vírus transmitidos por carrapatos ou que apresentam pequenos vertebrados terrestres como hospedeiros tendem a ter distribuição mais restrita que aqueles transmitidos por insetos alados ou que tem aves migratórias como hospedeiros (Travassos da Rosa *et al.*, 1994).

Alguns arbovírus podem ser transmitidos pela mesma espécie de mosquito e também podem infectar diferentes espécies de vertebrados, incluindo humanos (Vasconcelos *et al.*, 2001). Também, um único arbovírus pode infectar e ser transmitido por diversas espécies de artrópodes hematófagos de diferentes gêneros (Travassos da Rosa *et al.*, 1986).

No Brasil já foram isolados pelo menos 200 tipos de arbovírus, dos quais 196 foram identificados na Amazônia brasileira, e muitos deles jamais foram encontrados fora dessa região (Pinheiro *et al.*, 1986, Pinheiro *et al.*, 1996; Vasconcelos *et al.*, 1998). O IEC tem um acervo de cerca de 11.000

isolamentos de arbovírus e de outros vírus de vertebrados e dos arbovírus encontrados nesta região, pelo menos 100 são comprovadamente novos para a ciência e 34 estão associados com infecções humanas (Travassos da Rosa *et al.*, 1997, Vasconcelos *et al.*, 1991; 1997; 2001).

No presente estudo foi determinada a prevalência de anticorpos IH para arbovírus em quatro espécies de herbívoros domésticos procedentes de todas as mesorregiões do estado do Pará, observando-se que ocorreu à circulação dos 19 arbovírus analisados. A detecção de reações heterotípicas e monotípicas para os vírus estudados comprovaram a grande circulação dos arbovírus pertencentes a diferentes famílias, em todo estado do Pará em herbívoros domésticos, o que era esperado devido aos arbovírus encontrarem fatores favoráveis a sua manutenção em natureza na região Amazônica (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). É interessante notar, também, que nas espécies animais os anticorpos IH estavam presente muitas vezes para diferentes arbovírus das diferentes famílias analisadas (*Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*) em um mesmo soro animal, sugerindo que um mesmo animal se infectou por mais de um arbovírus.

Com exceção da Febre do Dengue, todas as enfermidades causadas por arbovírus no Brasil circulam entre animais selvagens, e muitas causam doença após intensa transmissão para humanos e animais domésticos de fazenda. Em animais domésticos, assim como no homem, são comuns as infecções inaparentes por arbovírus e podem ocorrer casos isolados ou esporádicos que pouco é percebido. Por outro lado durante epizootias, essas viroses são mais comumente diagnosticadas (Brès, 1988).

As infecções por arbovírus em herbívoros domésticos consistem de síndromes sistêmicas, encefálicas ou hemorrágicas, sendo que a forma encefálica é mais comum em equinos que são mais acometidos pelos arbovírus EEEV, WEEV, JEV e WNV (Weaver & Reisen, 2010). Dos 19 arbovírus analisados, que já foram isolados de artrópodes e/ou vertebrados silvestres no Brasil, apenas os arbovírus EEEV, WEEV e VEEV são comprovadamente causadores de enfermidades em herbívoros domésticos (equinos), sendo que os demais não se têm, ainda, comprovação de doença em animais domésticos.

Os arbovírus do gênero *Alphavirus* podem causar duas síndromes clínicas distintas, encefalite com ou sem desmielinização como as causadas por EEEV, WEEV e VEEV, que produzem uma enfermidade chamada de encefalomielite equina, e doença febril com persistente artralgia como enfermidade causada pelos *Chikungunya virus* (CHIKV), RRV, ONNV, MAYV e UNAV (Weaver *et al.*, 2005) em humanos. O GEV em equinos provoca uma doença branda, autolimitada, caracterizada por febre, edema com rigidez de membros, edema de linfonodos submandibulares, dor abdominal, icterícia e edema escrotal (Brown & Timoney, 1998).

A encefalomielite equina causada por EEEV, WEEV e VEEV está restrita às Américas: EUA, Canadá, México, Colômbia, Venezuela, Brasil e Argentina, todos registraram sua ocorrência e os EEEV e WEEV têm ciclos mosquito-ave na América do Norte e causam doença ocasional em equinos e humanos nesse continente. Na costa leste do continente americano do norte a sul, só tem sido encontrado o EEEV, ao passo que, na costa oeste, em geral só

é isolado o vírus WEEV; a existência do WEEV, na Argentina, talvez seja uma resultante do caminho migratório dos pássaros pela costa do Pacífico (Blood & Radostits, 1991).

No Brasil foram isolados ou detectados sorologicamente alguns representantes do gênero *Alphavirus* que tem grande importância epidemiológica e que está amplamente distribuído no continente Americano (Correa & Correa, 1992). Entre os anos 1993 e 1994, foram efetuados inquéritos sorológicos em equinos e aves silvestres do Pantanal brasileiro e da Mata Atlântica (Estado de São Paulo) e, em considerável percentagem dos soros testados, foram detectados anticorpos neutralizantes para o EEEV (Ferreira *et al.*, 1994). Na Amazônia brasileira os EEEV e WEEV foram isolados de aves, equinos e mosquitos em áreas ao redor de Belém-PA e uma baixa percentagem de mamíferos silvestres com anticorpos para esses arbovírus (Shope *et al.*, 1966).

Monath *et al.* (1985) observaram que a prevalência de anticorpos neutralizantes em equinos na Argentina nos anos de 1977 a 1988 para o EEEV foi de 11% e se mostrou estatisticamente significativa em relação ao WEEV que foi de apenas 2%. Iversson *et al.* (1993) analisando o soro de 432 equinos provenientes da região do pantanal brasileiro, encontraram anticorpos neutralizantes para o EEEV (7%) e WEEV (1%).

Fernández *et al.* (2000) encontraram anticorpos IH e neutralizantes para o vírus EEEV em equinos com quadro de encefalite, procedentes de diferentes regiões no Paraná no período de 1996 a 1999. Ao contrário do presente estudo, que mostrou uma alta prevalência de anticorpos

IH para o EEEV em equinos (30%) e não apresentou diferença estatisticamente significativa para o WEEV, Heinemann *et al.* (2006) analisando a soroprevalência de anticorpos para os EEEV e WEEV em equinos, encontraram índices de anticorpos neutralizantes de 27% e 1% ($p < 0,0001$), respectivamente no município de Uruará, mesorregião do Sudoeste Paraense, fato esse que se mostra próximo aos resultados obtidos nesse trabalho nessa mesma mesorregião que apresentou prevalência de anticorpos IH totais de 18,39% para o EEEV e 6,77% para o WEEV, que também mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0342$).

Os resultados deste trabalho mostram que a circulação desses arbovírus (EEEV e WEEV) tem ocorrência no estado do Pará, e é interessante notar uma alta prevalência de anticorpos IH para o EEEV em equinos e a carência de relatos de doença clínica nesses animais neste Estado, que até hoje registrou um único surto epizootico, no município de Bragança, no ano de 1962 (Causey *et al.*, 1962), sem nenhum registro de caso de doença humana do tipo encefalite na região Amazônica por esse arbovírus (Woodall, 2004).

O EEEV causa severa doença neurológica em humanos na América do Norte (Weaver & Reisen, 2010), mas somente dois casos fatais foram relatados na América do Sul, sendo um no Brasil, no estado da Bahia (Alice, 1956) e outro em Trinidad & Tobago (Corniou *et al.*, 1972). Aguilar *et al.*, 2007 relatam que a baixa incidência de casos de encefalites na América do Sul provavelmente é devido à baixa infectividade e/ou não virulência dos isolados do EEEV que circulam nessa região.

O VEEV é um importante arbovírus que causa doença neurológica em humanos e equídeos nas Américas (Weaver & Reisen, 2010). Esse arbovírus apresenta uma segunda amplificação que envolve equinos e requer mutações adaptativas em amostras enzoóticas que permitem eficiente produção de viremia (Weaver, 2005). O VEEV tem causado epidemias periódicas nos seres humanos e em equinos na América Latina desde o início das décadas de 1920 até a década de 1970. Ressalta-se que o primeiro grande surto de encefalite pelo VEEV desde 1973, ocorreu na Venezuela e Colômbia durante o ano de 1995 e envolveu a infecção de aproximadamente 75.000 a 100.000 pessoas e outros milhares de equinos (Weaver *et al.*, 1996).

De acordo com a classificação sorológica de Young & Johnson (1969) o MUCV é o subtipo III do complexo de Encefalite Equina Venezuela. Esse arbovírus foi isolado pela primeira vez em 1954 na floresta de Oriboca próximo a Belém-PA, Brasil, de macacos sentinelas e tem sido isolado de casos febris esporádicos de humanos na Amazônia brasileira, Trinidad & Tobago, Suriname e Guiana Francesa, sem maiores complicações e sem registro de epidemia (Causey *et al.*, 1961). Já foi também isolado no sudeste do Brasil em região próxima ao Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Lopes & Sachetta, 1978). O MUCV tem ciclos envolvendo pequenos mamíferos terrestres principalmente roedores e, provavelmente, não apresenta ciclo em aves (Degallier *et al.*, 1987)

O MUCV não tem sido associado com doença em animais domésticos, porém, um equino de 10 meses de idade inoculado experimentalmente por via intramuscular com altas doses do MUCV

desenvolveu viremia que persistiu por três dias, apresentou febre após 24 horas e persistente leucopenia (Shope *et al.*, 1964). Por outro lado, Iversson *et al.* (1993) encontraram anticorpos para o MUCV em um equino do pantanal brasileiro que apresentava sintomas compatíveis com encefalite.

Ulloa *et al.* (2003) encontraram 45% de positividade de anticorpos pelo teste de neutralização por redução de placas (PRNT) para o VEEV em bovinos no México. Esses dados contrastam com os observados no presente estudo, onde 5% dos animais testados apresentaram anticorpos IH para o MUCV, sendo que a prevalência em bovinos foi de apenas 1% de positividade de anticorpos IH; é interessante assinalar uma maior percentagem de reações positivas de anticorpos IH para MUCV em equinos (8%) e bubalinos (7%).

O MAYV foi primeiramente isolado em Trinidad & Tobago em 1954 (Anderson *et al.*, 1957), e hoje tem sido frequentemente isolado na região norte da América do Sul em humanos, vertebrados selvagens, principalmente macacos e mosquitos. A baixa frequência de isolamentos obtidos desse *Alphavirus* na espécie humana contrasta com a elevada prevalência de anticorpos IH específicos na Pan-Amazônia. O MAYV pode causar doença semelhante à Dengue, com severa artralgia (Causey & Maroja, 1957; Pinheiro & Le Duc, 1988) e surtos deste vírus tem sido relatado em humanos na Amazônia (Le Duc *et al.*, 1981). Recentemente Azevedo *et al.* (2009) relataram um surto, de uma doença semelhante a Febre do Dengue, causada pelo MAYV em uma pequena localidade a 38 Km de Belém, Estado do Pará.

No presente estudo houve uma baixa prevalência de anticorpos IH em herbívoros domésticos para o MAYV (2%), mas com circulação em todas

as mesorregiões do estado. Ressalta-se, porém, que a espécie ovina não apresentou anticorpos IH para esse arbovírus. Não há relato de enfermidade causada por esses vírus em animais domésticos, porém, a síndrome clínica provocada em humanos mostra sintomas que em animais domésticos como equinos e ruminantes podem passar despercebidos. Com efeito, testes de neutralização com soro humano para o *Semliki virus* (SFV), que causa encefalites em equinos no Senegal, demonstraram reações cruzadas com o MAYV (Causey & Maroja, 1957), entretanto como existe um grande relacionamento antigênico do MAYV com o CHIKV é possível que a reatividade para o MAYV na África decorra de reatividade cruzada com o CHIKV. Aliás, o CHIKV como o DENV perdeu a necessidade de amplificação enzoótica sendo transmitida entre humanos em ambientes urbanos mediante a picada de *Aedes aegypti* e *A. albopictus* infectados (Weaver & Reisen, 2010).

A família *Flaviviridae* apresenta alguns arbovírus de grande importância veterinária como os WNV, JEV, LIV e WSLV, dentre outros (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). Doze *Flavivirus* foram presentemente isolados no Brasil: BSQV, CPCV, DENV tipos 1, 2, 3 e 4, IGUV, ILHV, NJLV, ROCV, SLEV e YFV e dez já foram isolados na região Amazônica (BSQV, CPCV, NJLV, YFV, ILHV, SLEV, DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4) (Travassos da Rosa *et al.*, 1998, Baleotti *et al.*, 2003). Alguns de ocorrência no Brasil são mantidos em natureza como zoonoses silvestres, no entanto, podem infectar humanos e animais domésticos quando esses entram em contato com o ecossistema onde aqueles arbovírus estejam circulando ativamente (Figueiredo, 2000).

Quatro arbovírus do gênero *Flavivirus* têm sido implicados em doenças encefálicas humanas nas Américas SLEV, POWV, ROCV e WNV. O WNV foi introduzido na cidade de Nova York, nos EUA em 1999 e se espalhou rapidamente para todo o país e chegou até o Canadá em 2000 já tendo sido encontrado na América Central e na região do Caribe e também na Argentina na América do Sul. De fato, em 2004 já havia evidências sorológicas de atividade do WNV na Colômbia e Trinidad & Tobago (Komar & Clark, 2006). Morales *et al.* (2006) relataram os primeiros casos do WNV em equinos na América do Sul, na Argentina no ano de 2006. Ressalta-se, porém, que até o presente, não há relatos desse arbovírus no Brasil (Pauvolid-Corrêa & Varella, 2008).

A infecção pelo WNV pode causar doença fatal em equinos, ao passo que manifestações clínicas assim como elevada viremia não têm sido relatadas em animais infectados com o SLEV (Mettler *et al.*, 1985, Reisen, 2003). O SLEV é um arbovírus encefalitogênico, que causa doença humana, sendo um dos *Flavivirus* mais prevalentes no Novo Mundo, principalmente nos EUA (Luby, 1979). No Brasil diversas amostras do SLEV foram isoladas de animais sentinelas durante epizootias próximas a cidade de Belém, estado do Pará, de aves silvestres e artrópodes hematófagos em diferentes anos e áreas geográficas (Vasconcelos *et al.*, 1991). O SLEV, assim como os EEEV e WEEV, tem sido associado com severa encefalite em humanos na América do Norte, porém, não têm sido relatados casos de encefalite por esse vírus na América do Sul ou Central (Theiler & Downs, 1973; Woodall, 2004).

Ressalta-se, no entanto, que o SLEV já foi isolado de humanos, no Brasil a partir de casos febris agudos sem comprometimento aparente do sistema nervoso central no estado do Pará (Vasconcelos *et al.*, 1998) e no estado de São Paulo (Rocco *et al.*, 2005). Recentemente um surto ocorreu em São José do Rio Preto, no estado de São Paulo quando o ARN do SLEV foi detectado por RT-PCR em seis pacientes negativos para o VDEN e YFV (Mondini *et al.*, 2007). Por outro lado, Rodrigues *et al.* (2010) relataram que o pequeno número de casos humanos pelo SLEV na Amazônia brasileira é provavelmente devido a ocorrência de infecções inaparentes, mas, pode ser, também resultado da sub-notificação de casos clínicos devido a dificuldade de realizar diagnóstico diferencial.

Em estudos sorológicos realizados em humanos, a prevalência de anticorpos IH para SLEV variou de 1% a 5% (Travassos da Rosa *et al.*, 1997); por outro lado, anticorpos IH foram detectados em bubalinos (*Bubalus bubalis*) de Salvaterra, município da Ilha de Marajó, Pará, para os ILHV, ROCV e SLEV (Vieira *et al.*, 2004; Ribeiro, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que de todos os arbovírus analisados, o mais prevalente foi o SLEV em todas as mesorregiões do estado do Pará, com exceção da mesorregião Metropolitana de Belém, onde o ILHV apresentou prevalência ligeiramente superior a do SLEV ($p=0,7307$). O SLEV foi também o mais prevalente em todos os herbívoros domésticos analisados.

Os resultados sugerem uma notável ocorrência de infecções por SLEV no estado do Pará, cuja positividade variou de 15% a 36% de anticorpos IH nas mesorregiões e de 10% a 48% nas espécies animais analisadas, tais

resultados estão de acordo com trabalhos realizados na Argentina, onde também foi encontrada uma alta prevalência de anticorpos para esse arbovírus em equinos (Monath *et al.*, 1985, Mettler *et al.*, 1985); do mesmo modo, Rodrigues *et al.*, (2010) encontraram uma elevada percentagem de anticorpos IH para SLEV em equinos nos estados do Pará, Amapá, Acre e Mato Grosso do Sul. Apesar da elevada prevalência de anticorpos monotípicos para o SLEV determinada nesse estudo não há relato de doença clínica em animais causada por esse arbovírus no estado do Pará, pois nenhuma epizootia por esse arbovírus foi relatada na população estudada.

O isolamento original do ILHV foi obtido a partir do *pool* de mosquitos *Aedes spp* e *Psorophora spp* capturados em Ilhéus, Bahia, em 1944 (Karabatsos, 1985). O ILHV é considerado potencialmente encefalitogênico, sendo entre esses o arbovírus mais distribuído no Brasil, em particular na Amazônia brasileira, onde tem sido isolado sistematicamente de diversas espécies de animais silvestres e artrópodes vetores principalmente *Psorophora ferox*, bem como, de modo esporádico de seres humanos (Calisher *et al.*, 1989; Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Segundo Pinheiro & Travassos da Rosa (1994) não há doença naturalmente relatada em animais domésticos ou selvagens, porém, primatas não humanos infectados experimentalmente com o ILHV desenvolveram viremia e ocasionalmente morte; esses autores chamam atenção para a possível associação do ILHV com doença em equinos. O ILHV foi o segundo arbovírus mais prevalente em nosso estudo, assim como o mais prevalente da mesorregião Metropolitana de Belém e apresentou uma elevada prevalência de

anticorpos IH na espécie equina em relação às demais espécies analisadas, corroborando, com os resultados do estudo de Iversson *et al.* (1993) que encontraram, em equinos do pantanal brasileiro, anticorpos neutralizantes para o ILHV na prevalência de aproximadamente 27%.

O YFV é endêmico na África e América do Sul e, periodicamente, é responsável por surtos e epidemias associadas à elevada morbidade e letalidade (Vasconcelos, 2003). A febre amarela possui dois bem definidos e diferentes padrões epidemiológicos de apresentação, conhecidos com febre amarela urbana e silvestre. Um terceiro ciclo intermediário (ciclo rural) é observado apenas na África. A febre amarela urbana (transmissão do YFV pelo mosquito peri-doméstico *Aedes aegypti*) não é registrada no Brasil desde 1942 (Vasconcelos *et al.*, 1999).

Os hospedeiros vertebrados primários são primatas não humanos, os quais são infectados por mosquitos infectados e servem de fonte de infecção para novos mosquitos e os humanos susceptíveis se infectam ao penetrarem em áreas florestais onde existe circulação viral sendo que na América do Sul, a febre amarela é uma doença ocupacional. De fato, cerca de 60% dos casos ocorrem entre agricultores e, quase 85% em adultos jovens do sexo masculino (Vasconcelos, 2003).

Todas as espécies de primatas não humanos são consideradas susceptíveis a infecção pelo YFV (Meegan, 1994). Apesar de que animais domésticos não têm importância na manutenção do vírus nas áreas urbanas (Monath, 1988), a re-emergência da doença em sua forma silvestre é motivo de

preocupação devido aos crescentes riscos de reurbanização nas Américas (Mondet *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1996; Vasconcelos, 2003).

No presente estudo, anticorpos IH para o YFV foram detectados em todas as espécies de animais estudados e mesorregiões do Estado do Pará e foi o terceiro arbovírus do gênero *Flavivirus* mais prevalente e, também, com alto índice de reações monotípicas nos ruminantes que se apresentou acima de 30%. Esses resultados são intrigantes e podem indicar: reatividade cruzada com outro arbovírus do gênero *Flavivirus* que não foi testado ou ainda não isolado; e que esses animais estão se infectando de modo silencioso com o YFV. Novas investigações merecem ser feitas para elucidar a prevalência de reações monotípicas para o YFV nesses animais, que podem ser realizadas através de tentativas de isolamento desses arbovírus em animais, assim como inoculações experimentais.

O ROCV foi isolado pela primeira vez em 1975, no Estado de São Paulo, a partir de fragmentos de cerebelo e medula espinhal de caso fatal de encefalite (Karabatsos, 1985). No período compreendido entre 1973 e 1980 na região do Vale do Ribeira, São Paulo, o ROCV foi causador de uma epidemia em seres humanos com mais de mil casos reconhecidos de encefalites, tendo sido registrado cem mortes e mais de duzentas referências de sequelas graves do sistema nervoso central (Iversson, 1988).

O BSQV foi isolado pela primeira vez, em 1956, de um macaco sentinela exposto em uma floresta próxima a Belém, Estado do Pará, Brasil (Gomes & Causey, 1959) e tem sido frequentemente isolado de vertebrados sentinelas e selvagens, e também, de mosquitos no Brasil, Panamá e Colômbia

(Karabatsos, 1985). Foi relatado na literatura um único caso de doença humana febril no Panamá causado por esse arbovírus cuja sintomatologia incluiu febre, anorexia, e dores nas articulações que evoluiu para cura sem maiores consequências (Srihongse & Moore, 1971).

O CPCV foi isolado de aves silvestres da região Amazônica (Karabatsos, 1985) e seus vetores são desconhecidos (Figueiredo *et al.*, 1998). Do mesmo modo, se desconhece se o CPCV pode causar doença em humanos. Entretanto, Batista (2007) descreveu o primeiro isolamento desse arbovírus em humanos em um paciente que veio a óbito no Estado de Rondônia, Brasil, com coinfeção com leptospirose.

Não há provas de envolvimento dos arbovírus ROCV, BSQV e CPCV em doenças de animais domésticos ou selvagens (Pinheiro & Travassos da Rosa, 1994). Por outro lado, alguns pacientes humanos mencionaram a morte de suínos e aves domésticas durante a ocorrência de surto causado pelo ROCV (Iversson, 1988). No presente estudo a prevalência de anticorpos IH monotípicos para o ROCV não foi superior a 6% e essas reações foram muito baixas em bovinos e bubalinos, e não houve reações monotípicas em equinos e ovinos. Os BSQV e CPCV, também, apresentaram prevalência de anticorpos IH relativamente baixas nas espécies animais estudadas apresentando uma prevalência total de 3 a 5%, respectivamente. Portanto, esses achados sorológicos devem ser interpretados com cautela, pois pode estar havendo reações cruzadas entre os diferentes arbovírus do gênero *Flavivirus* circulantes no Brasil (Straatmann *et al.*, 1997).

É interessante ressaltar que o JEV, que ocorre apenas no continente asiático, é um arbovírus que causa enfermidade em humanos, equinos, suínos e em outros animais domésticos (Scott & Jacobson, 2003) e sorologicamente é relacionado aos CPCV, ILHV, SLEV, ROCV e MVEV (Calisher, 1988; Vasconcelos *et al.*, 1998).

As enfermidades causadas por arbovírus da família *Bunyaviridae* em animais domésticos diferem das doenças causadas pelos arbovírus da família *Togaviridae* e *Flaviviridae* que como dito anteriormente causam síndromes sistêmicas, encefálicas ou hemorrágicas, pois esses arbovírus causam, principalmente, abortamento com anomalias congênitas (Brès, 1988).

A família *Bunyaviridae* constitui a maior família dos vírus de RNA, possuindo o maior número de arbovírus conhecidos, com três gêneros que possuem arbovírus: *Orthobunyavirus*, que apresenta os seguintes arbovírus que causam doença em animais domésticos AKAV, CVV, CCHFV, AINV e PEAV; *Nairovirus* com o arbovírus NSDV; e *Phlebovirus* que tem o RVFV que causa doença em animais domésticos. Ressalta-se que nenhum desses arbovírus circula na América do Sul (Brès, 1988, Pinheiro & Travassos da Rosa, 1994). Esses arbovírus manifestam principalmente quadro de abortamento e anomalias congênitas, assim como casos de gastroenterite hemorrágica nos animais doentes (St George *et al.*, 1980).

Os agentes virais são importantes causadores de abortamento em bovinos e desses agentes, o *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) é importante causa de anomalias congênitas em bezerros e fetos bovinos abortados (Ross

et al., 1986) e já foi relatado no Brasil causando artrogripose em um bezerro bovino (Pavarini *et al.*, 2008).

Surtos de artrogripose e hidrocefalia em bovinos na Austrália foram associados ao encontro de altos títulos de anticorpos IH para o AKAV (Nicolson *et al.*, 1985), porém, casos de infecção pelo AKAV ainda não foram relatados no Brasil (Schmidt & Oliveira, 2004). Por outro lado, estudos prévios realizados no Brasil sobre defeito congênito, como artrogripose, em fetos abortados em bovinos e ovinos demonstram ausência de um agente etiológico específico (Borges *et al.*, 1997). Sendo assim, há necessidade de pesquisas com outros arbovírus que podem causar abortamento e anomalias congênitas.

Os AKAV, AINV e PEAV acometem bovinos e ovinos, pertencem ao sorogrupo Simbu, ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo, e estão associados a defeitos congênitos (artrogripose e hidrocefalia) e abortamento em animais domésticos (Hurogi *et al.*, 1977; Parsonson *et al.*, 1977; St George *et al.*, 1980). No presente estudo foram analisados anticorpos IH para dois arbovírus do Grupo Simbu, que ainda não foram associados como causadores de doença em animais domésticos, esses arbovírus que apresentaram reações monotípicas foram detectados em equinos, bovinos e bubalinos incluíram o UTIV, e em equinos assim como em bubalinos o OROV, porém, com uma prevalência abaixo de 2%.

O OROV, que causa a doença em humanos denominada febre do Oropouche, foi primeiramente descrito em Trinidad & Tobago, em 1955 (Anderson *et al.*, 1961). Depois a doença voltou a ser detectada em 1961, em Belém, Estado do Pará, apresentando-se em forma epidêmica (Pinheiro *et al.*,

1962). A febre do Oropouche já causou nas Américas aproximadamente 500.000 infecções em pelo menos 30 epidemias (Azevedo *et al.*, 2007) e no Brasil, é a arbovirose com maior número de registros, sendo superada em número de casos, apenas pela febre do Dengue (Figueiredo, 2007).

O CVV pertence ao sorogrupo Bunyamwera e está associado a defeitos congênitos de ovinos em rebanhos na América do Norte (Quinn *et al.*, 2005) e já foi isolado de um equino com encefalite nos EUA (Monath *et al.*, 1985). Um arbovírus isolado de um equino febril na Argentina foi identificado como *Kairi virus* (KRIV), também, pertencente ao sorogrupo Bunyamwera (Calisher *et al.*, 1988). O arbovírus *Main Drain virus* (MDV), também já foi isolado de equinos com encefalite na Califórnia, EUA (Emmons *et al.*, 1983) e ovelhas gestantes inoculadas experimentalmente produziram teratogênese (Edwards *et al.*, 1997).

O MAGV é antigenicamente relacionado com os arbovírus CVV, KRIV e MDV (Travassos da Rosa *et al.*, 1997, Edwards *et al.*, 1997); já foi isolado de equinos e bovinos no Brasil e Argentina e tem mostrado elevada prevalência de anticorpos IH em humanos, equinos e aves na Argentina (Karabatsos, 1985).

Em um estudo realizado por Iversson *et al.* (1993) no pantanal brasileiro foram encontrados anticorpos neutralizantes para o MAGV em 28% dos equinos testados, e Monath *et al.* (1985) em estudo conduzido em equinos da Argentina obteve uma prevalência de anticorpos neutralizantes de 80% para o MAGV, sem, porém, terem sido registradas epidemias de encefalites ou ocorrência de defeitos congênitos por esse arbovírus.

O MAGV foi o arbovírus da família *Bunyaviridae* de maior prevalência de anticorpos IH em todos os herbívoros domésticos analisados neste estudo. Ele apresentou uma prevalência total de 12% no estado do Pará, e, portanto, diante desses resultados é necessário que novos estudos com esse arbovírus sejam realizados para determinar a sua patogênese nos herbívoros domésticos, principalmente em equinos que das espécies testadas, foi a que apresentou a maior prevalência de anticorpos IH.

Os demais arbovírus da família *Bunyaviridae* apresentaram baixa prevalência de anticorpos IH nos herbívoros domésticos analisados neste estudo, ressalta-se, porém, que o TCMV pertencente ao grupo Anopheles A, apresentou a segunda maior positividade de anticorpos IH nos equinos com uma prevalência de reações monotípicas de 19%. Esses resultados corroboram aqueles de Iversson *et al.* (1993) que encontraram em equinos positividade de anticorpos neutralizantes para o TCMV em aproximadamente 16%. O BLMV teve a menor prevalência de anticorpos IH e com reações monotípicas encontradas somente na espécie equina. Os arbovírus TCMV, GROV, CARV e CATUV causam doenças febris esporádicas em humanos na América do Sul (Travassos da Rosa *et al.*, 1998) e apresentaram baixa positividade em nosso estudo.

O RVFV é causa importante de doença humana e apresenta importância considerável na mortalidade de animais recém-nascidos, e é também causa de abortos em animais domésticos em especial em ovinos, bovinos e bubalinos, sendo endêmico no sul e leste da África (Billecocq *et al.*, 2000). Esse arbovírus do gênero *Phlebovirus* é relacionado geneticamente ao

ICOV que apresentou uma baixa prevalência de anticorpos IH (1,0%) em herbívoros domésticos no presente estudo, sendo, portanto, aparentemente, rara as infecções por *Phlebovirus* em herbívoros domésticos no estado do Pará.

O ICOV foi isolado pela primeira vez em roedores silvestres em uma floresta próximo a Belém, Estado do Pará, em 1960 e anticorpos IH são frequentemente detectados em pequenos animais da floresta, especialmente roedores, porém, não tem sido encontrado infectando habitantes humanos de Belém (Causey & Shope, 1965). No presente estudo a maior prevalência de anticorpos IH com reações monotípicas para esse arbovírus foi encontrada em búfalos. Porém, nenhum dos animais testados apresentou anticorpos IH para esse arbovírus na Mesorregião Metropolitana de Belém, somente nas demais mesorregiões.

Os herbívoros domésticos neste estudo mostraram diferentes prevalências de anticorpos IH para os arbovírus analisados, mesmo dentro da mesma mesorregião. Com a maior prevalência para a espécie equina que apresentou reações monotípicas para a maioria dos arbovírus, com exceção de ROCV, ICOV e CARV. Nessa espécie animal a elevada prevalência de anticorpos IH para os arbovírus, pode estar relacionada com a espessura da pele dos equinos que é mais delgada que as dos ruminantes, facilitando assim a infecção.

A pele dos bubalinos é diferente dos bovinos europeus e dos indianos, em diferentes aspectos; a espessura total é em média a mesma, contudo a epiderme e particularmente a camada queratinosa é bem mais

grossa (Garcia, 2010). Por outro lado, os búfalos, também, apresentaram uma alta prevalência de anticorpos IH para os arbovírus analisados, bem como reações monotípicas para a maioria dos arbovírus, com exceção do CPCV e BLMV. É interessante notar, que estatisticamente os búfalos não mostraram diferença significativa em relação aos equinos quanto à prevalência de anticorpos IH, isso provavelmente se deve ao hábito dos búfalos que predominam nas regiões alagadas (Garcia, 2010), onde há maior quantidade de artrópodes, aumentando assim a probabilidade de infecção.

Os ovinos apresentaram uma baixa prevalência de anticorpos IH para os arbovírus analisados, principalmente da família *Bunyaviridae*, pois os arbovírus UTIV, BLMV, CARV, OROV e CATUV não apresentaram reações monotípicas pelo teste de IH. Entretanto, essa espécie animal é a principal acometida por doenças relacionadas com os arbovírus da família *Bunyaviridae* que causam enfermidade em animais domésticos no mundo (Brès, 1988).

Dos arbovírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus são conhecidos aproximadamente cem que infectam humanos e quarenta infectando animais de fazenda, e alguns desses arbovírus causam somente infecções subclínicas detectadas pela presença de anticorpos (Karabatsos, 1985). Tais infecções não provocam um efeito evidente na saúde da comunidade, mas podem indicar que um arbovírus está circulando e que os animais com viremia podem servir de fonte de infecção para vetores artrópodes hematófagos (Brès, 1988).

O conhecimento dos arbovírus de maior circulação em animais domésticos é de fundamental importância para a Saúde Pública, pois esses

animais em geral são hospedeiros finais e também em alguns casos servem como fonte de amplificação desses arbovírus. Por isso, são necessárias outras pesquisas nessa área para investigar o papel dos herbívoros domésticos na expansão e dispersão de arbovírus no Estado do Pará e, mesmo em toda a Amazônia brasileira. Também, é importante investigar a ocorrência de epizootias e ou de possíveis epidemias que podem acometer o homem e animais domésticos por arbovírus. Com o presente estudo pode-se verificar que a maioria dos arbovírus é capaz de infectar e apresentar considerável circulação nas espécies animais analisadas e, portanto, abre perspectivas para futuros trabalhos na área veterinária e, finalmente, permite possíveis medidas de profilaxia.

Outro aspecto bastante interessante que necessita de maiores estudos é o diagnóstico sorológico das enfermidades causadas por arbovírus, pois muitas vezes a grande circulação de arbovírus na Amazônia tem dificultado o diagnóstico preciso dessas enfermidades, principalmente em animais domésticos. No presente estudo foi padronizado o teste de ELISA para 19 arbovírus em quatro espécies de herbívoros domésticos e que para essa padronização foi utilizado o teste de ELISA IgG sanduíche indireto, técnica esta feita pela primeira vez em herbívoros domésticos para 19 arbovírus em circulação na Amazônia brasileira em humanos e animais silvestres. Como já foi demonstrado, o teste de IH tem sido o teste sorológico mais frequentemente usado para o diagnóstico dos arbovírus, além disso, tem sido utilizado como referência para outros testes (Clarke & Casals, 1958, Shope, 1963, Shope *et al.*, 1966).

Não utilizamos o teste de SN devido à grande quantidade de arbovírus testados, e principalmente pela enorme quantidade de camundongos que seriam sacrificados se esse procedimento fosse realizado. Shope *et al.* (1966) analisaram plasma de aves silvestres para o teste de IH e o teste SN para três arbovírus (EEEV, WEEV e SLEV), e obtiveram um alto índice de sensibilidade, especificidade e acurácia entre as técnicas; e o PRNT, é também, atualmente muito utilizado, porém, ainda não foi padronizado para a maioria dos arbovírus isolados na Amazônia e os utilizados nesse estudo. Por isso o teste de IH foi utilizado como padrão de comparação com os testes de ELISA IgG sanduíche indireto utilizados nesse trabalho.

Os testes de ELISA foram desenhados para serem operacionalmente eficientes e minimizar o número de falsos positivos e negativos, e são de mais fácil execução que os testes de IH, assim como são automatizados, o que permite testar um grande número de soros (Kuno *et al.*, 1991). Pesquisa de anticorpos IgG antiarbovírus em humanos já foram determinados pelo método de ELISA (Frazier & Shope, 1979, Calisher *et al.*, 1986, Paweska *et al.*, 2005), assim como em outros animais (Paweska *et al.*, 2003).

No teste ELISA quando antígenos inativados são colocados diretamente nas microplacas, reações não específicas ocorrem com maior frequência (Frazier & Shope, 1979), assim como pela aplicação de antígenos não purificados (Forghani & Schmidt, 1979). Essa baixa especificidade do teste ELISA indireto pode ser explicada pela presença de proteínas de origem celular na preparação do antígeno, pois essas proteínas competem com os sítios de

ligação na fase sólida, assim decresce a quantidade de proteína viral adsorvida na microplaca e, por conseguinte, a sensibilidade do teste (Hofmann & Wyler, 1990).

Para amenizar esse problema com o ELISA IgG os testes foram desenvolvidos por anticorpos de captura contra a IgG que cobrem inicialmente as microplacas (Erdman & Anderson, 1990), e, também, o uso de anticorpos monoclonais através de ELISA sanduíche para ligar antígenos virais específicos a microplaca abrem a possibilidade do uso de antígenos não purificados, assim prevenindo a parte laboriosa de purificação viral obtendo um teste mais específico e sensível (Ban *et al.*, 1990, Schrijver & Kramps, 1998). Chungue *et al.* (1989) e Kuno *et al.* (1991) usaram anticorpos monoclonais para capturar antígenos inativados do DENV para detectar anticorpos IgG no soro humano. Parte do método descrito nesse trabalho é uma modificação dessas técnicas.

Henriques (2009) demonstrou em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) que para os ROCV e ILHV anticorpos IH aparecem a partir do 5º dia pós-infecção, seguindo de forma crescente até o título máximo detectado no 15º dia para ambos os vírus. Após esse evento, os anticorpos diminuem até 45 dias, permanecendo sem muita alteração no título de anticorpos até o final do quarto mês.

A IgG para arbovírus geralmente se eleva pelo 12º dia após a infecção e pode persistir por anos e, provavelmente por toda a vida, mantendo títulos menores ou iguais a 640 pelo teste de IH (Gubler, 1996), enquanto que elevados títulos de anticorpos IH para um arbovírus são sugestivos de infecção

recente, ou seja, resposta primária ou secundária (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). Por outro lado, após a infecção uma amostra que testou positiva para a IgG, mas negativa para a IgM e foi obtida menos que 45 dias após o aparecimento dos sintomas, pode indicar a presença da IgG em decorrência de uma infecção em passado difícil de precisar (Johnson *et al.*, 2000).

Sabe-se que a IgM é mais específica que a IgG para os antígenos de arbovírus (Westaway *et al.*, 1974); e a IgG persiste por longo tempo após infecção, assim como o método de ELISA IgG de captura é passível de ter baixa sensibilidade devida a competição das IgG não específicas, porém, pode ter a vantagem de detectar a IgG para antígenos específicos ou aqueles antígenos para os quais o soro tem reação cruzada (Johnson *et al.*, 2000).

Ressalta-se que o teste de IH detecta tanto anticorpos IgM quanto IgG, por isso há possibilidade de resultados positivos no teste de IH que não foram determinados pelo teste de ELISA IgG sanduíche indireto utilizado nesse estudo, reduzindo assim a sensibilidade deste teste. Outro importante fator é que todos os animais analisados foram de idade superior a dois anos, isto implica na maior possibilidade de contato dos animais com uma maior quantidade e diversidade de arbovírus aumentando a chance de reação cruzada (Guilermel *et al.*, 1996).

A escolha da diluição do soro teste pode resultar em resultados incorretos (Johnson *et al.*, 2000). No presente estudo a diluição do soro variou com a família de arbovírus analisada, assim como, a espécie animal, mostrando ser fator fundamental na regulação da prova de ELISA IgG sanduíche indireto. Outro fator fundamental na regulagem da técnica foi à

diluição do conjugado e diluição do antígeno. A diluição de todos os componentes do teste deve ser realizada durante a execução da técnica para se obter resultados confiáveis, fator esse que corrobora com os achados de Johnson *et al.*, (2000), que recomendam esses cuidados, principalmente, com antígenos, conjugados e substratos.

Um passo muito importante na realização do teste de ELISA é a fase de bloqueio, pois se não for bem realizada pode produzir inúmeras reações de *background*, e se este for grande inviabiliza o teste, pois é fundamental a ocupação dos espaços deixados no uso dos anticorpos de captura e que permitem a ligação de antígenos diretamente na placa. Para evitar esses inconvenientes foi utilizado, no presente estudo, leite desnatado a 5% que evitou os efeitos de *background*, porém, somente quando o tempo de incubação foi de uma hora.

A consideração mais importante em determinar o *cut-off* de um teste de ELISA é primeiramente selecionar soros de animais que realmente são infectados e soro de animais que nunca tiveram contato com o vírus em questão (Jacobson, 2000). No presente estudo utilizamos como controle negativo soro de animais que apresentaram negatividade para os 19 tipos de arbovírus testados pelo teste de IH e os controles positivos aqueles que apresentaram positividade para apenas um único tipo de arbovírus (reação monotípica) e o *cut-off* foi determinado pela média das D.O dos controles negativos mais três desvios padrões com um grau de confiança do teste de quase 100%.

Apesar de todos esses aspectos observados, houve um alto grau de reatividade cruzada entre as espécies de arbovírus analisadas neste estudo, e possivelmente, para aumentar a especificidade do teste seja necessária a purificação dos antígenos e/ou utilização de anticorpos de alta especificidade, porém, produção de estoque e de antígenos virais purificados para o teste de ELISA pelos métodos clássicos é caro e laborioso, especialmente quando um agente não multiplica em altos títulos em culturas celulares (Chu *et al.*, 1985).

Foi interessante notar, que para alguns arbovírus houve uma baixa especificidade, mostrando que amostras negativas no teste de IH apresentavam positividade no teste ELISA, isso pode ter ocorrido devido ao contato desses animais com outros arbovírus da mesma família que não foram avaliados nesse estudo, ou também, pela diluição inicial das amostras de soro no teste de IH.

O teste ELISA IgG sanduíche é de fácil realização, tem boa sensibilidade e especificidade e apresenta grande concordância com o teste de IH em humanos para o DENV (Cerqueira, 1999). Os testes sorológicos para arbovírus devem ser interpretados com cautela, pois podem apresentar reações cruzadas entre os tipos de arbovírus mais relacionados antigenicamente nas famílias analisadas (Straatmann *et al.*, 1997), principalmente em herbívoros domésticos, com múltiplas exposições a artrópode, e assim com maior possibilidade de contaminação por diversos arbovírus.

Como já foi demonstrado, o uso de ELISA sanduíche indireto desenvolvido no presente estudo para 19 tipos de arbovírus em herbívoros

domésticos apresentou grande número de reações sorológicas cruzadas, por isso pode ser utilizado para detectar anticorpos IgG em uma família de arbovírus, mas não pode distinguir entre as espécies de arbovírus da família em estudo aquela associada com a infecção aguda, então é fundamental o uso conjunto com teste de IH ou outras técnicas mais específicas como o teste de SN ou PRNT.

Uma alternativa estratégica para tentar diminuir as reatividades cruzadas seria o uso de peptídeos sintéticos com epítomos imunodominantes representando os arbovírus mais prevalentes na Amazônia, e que tenham importância econômica e/ou em saúde pública. Assim, o sequenciamento desses arbovírus pode contribuir para o uso de ferramentas de biologia molecular para predição desses epítomos que podem ser utilizados como antígenos na fase sólida do teste de ELISA.

5 CONCLUSÕES

- 1- Os arbovírus SLEV, ILHV, EEEV, MAGV e WEEV foram os que apresentaram maior prevalência de anticorpos IH entre herbívoros domésticos no estado do Pará.
- 2- Anticorpos IH para o SLEV foi o mais prevalente em todas as mesorregiões, com exceção da mesorregião Metropolitana de Belém, onde anticorpos IH para o ILHV foi mais prevalente.
- 3- Quanto às espécies animais, os equinos foram os que apresentaram maior prevalência de anticorpos IH para os arbovírus, mas não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência nos bubalinos.
- 4- Os arbovírus mais prevalentes em ordem decrescentes de positividade de anticorpos IH em equinos foram SLEV, ILHV, EEEV, WEEV, MAGV e YFV; em bovinos SLEV, YFV e ILHV; em búfalos SLEV, ILHV, EEEV, WEEV, MUCV e MAGV; e em ovinos SLEV e MAGV.
- 5- Em relação à detecção de anticorpos IH nas famílias de vírus o MAGV foi o de maior prevalência da família *Bunyaviridae* em todas as espécies, o SLEV foi o de maior prevalência da família *Flaviviridae* em todas as espécies, e na família *Togaviridae* o EEEV foi o de maior prevalência em equinos.
- 6- As reações monotípicas em ruminantes para as famílias *Bunyaviridae* e *Togaviridae* foi estatisticamente significativa maior em relação aos

equinos. Na família *Flaviviridae* somente a relação de bovinos e equinos não apresentou diferença estatisticamente significativa, sendo que as demais relações foi estatisticamente significativa maior para os ruminantes.

- 7- Houve um elevado grau de correlação entre os resultados sorológicos por ELISA IgG sanduíche indireto padronizado nesse estudo, dentro da mesma família de arbovírus.
- 8- Devido ao elevado grau de positividade cruzada, o teste de ELISA IgG sanduíche indireto usado no presente estudo pode detectar anticorpos IgG para vários vírus em uma família de arbovírus, mas não pode distinguir entre as diversas espécies de arbovírus aquela responsável pela infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALICE, F.J. Encefalomielite equina na Bahia, estudo de três amostras isoladas. **Revista Brasileira de Biologia**, **11**:125-144, 1951.

ALICE, F.J. Infecção humana pelo vírus "leste" da encefalite equina. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia (Brasil)**, **3**: 3-9, 1956.

ANDERSON, C.R., DOWNS, W.G., WATTLEY, G.H., AHIN, N.W., REESE, A.A. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **6**: 1012–1016, 1957.

ANDERSON, C.R.; SPENCE, L.; DOWNS, W.G.; AITKEN, T.H.G. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **10**: 574-578, 1961.

Animal Health Trust- The science behind animal welfare. Disponível em: <<http://www.aht.org.uk/images/flu5.gif>>. Acesso em: 05/09/2009.

ARAÚJO, R. Alterações ultraestruturais na infecção experimental com arbovírus na Amazônia. In: **Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas**. Pinheiro, F. P., (ed.). Belém, Pará, Brasil, 1980. p. 175-192.

- AZEVEDO, R.S.S., NUNES, M.R.T., CHIANG, J.O., BENSABATH, G., VASCONCELOS, H.B., PINTO, A.Y.N., MARTINS, L.C., RODRIGUES, S.G., VASCONCELOS, P.F.C. Reemergence of oropouche fever, northern Brazil. . **Emerging Infectious Diseases**, **13**: 912-915, 2007.
- AZEVEDO, R.S.S., SILVA, E.V.P., CARVALHO, V.L., RODRIGUES, S.G., NUNES NETO, J.P., MONTEIRO, H.A.O., PEIXOTO, V.S., CHIANG, J.O., NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, P.F.C. *Mayaro fever virus*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, **15**: 1830-1832, 2009.
- AYRES, M., AYRES, J.R.M., AYRES, D.L, SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0- Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: sociedade civil mamirauá, Brasília CNPq, 2007. p. 44-45.
- BALEOTTI, F.G., MORELI, M.L., FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian flavivirus phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98**: 379-382, 2003.
- BAN, J., GIECICOVA, E, ORLICK, O., ALTANER, C: Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus infection. **Journal of Virological Methods**, **30**: 79-88, 1990.
- BATISTA, W.C. **Mapeamento das arboviroses no Estado de Rondônia**. Tese (Doutorado)- Manaus, Universidade Federal do Amazonas, 2007. 110p.
- BEATY, B.J., TRENT, D.W., ROEHRIG, J. T. Virus variation and evolution: Mechanisms and epidemiological significance. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Monath, T.P. (ed.). Boca Raton: CRC Press, 1988.

- BILLECOCQ, A., VAZEILLE-FALCOZ, M., RODHAIN, F., BOULOY, M. Pathogen-specific resistance to *Rift Valley fever* virus infection is induced in mosquito cells by expression of the recombinant nucleoprotein but not NSs non-structural protein sequences. **Journal of General Virology**, **81**: 2161-2166, 2000.
- BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. Encefalomielite Viral Equina. In: **Clínica veterinária**. Blood, D. C. & Radostits, O. M. (eds.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, p. 761-767.
- BORGES, A.S., MENDES, L.C.N., VASCONCELOS, R., ALVES, A.L.G., RODRIGUES, C.A. Mielodisplasia e espinha bifida em ruminantes: relato de caso **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **49**: 685-692, 1997.
- BRÈS, P. Impact of Arboviruses on human and animal health. In: **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Monath, T.P (ed.), v. I, Boca Ratón: CRC Press, 1988. p. 1-18.
- BRONZONI, M.R.V., BALEOTTI, F.G., RIBEIRO NOGUEIRA, R.M., NUNES, M., MORAES FIGUEIREDO, L.T. Duplex reverse transcription- PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 696-702, 2005.
- BROWN, C.M., TIMONEY, P.J. *Getah virus* infection of Indian horses. **Tropical Animal Health Production**, **30**:241-52, 1998.
- California Departamento of Food and Agriculture**, Disponível em: <
<http://www.cmmcp.org/arbovirus%20cycle2a.JPG>>. Acesso em: 22/10/2010

- CALISHER, C.H., SHOPE, R.E., BRANDT, W., CASALS, J., KARABATSOS, N., MURPHY, F.A., TESH, R.B., WIEBE, M.E. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. Togaviridae, Alphavirus. **Intervirology**, **14**: 229-232, 1980.
- CALISHER, C.H., BERARDI, V.P., MUTH, D.J., BUFF, E.E. Specificity of immunoglobulin M and G antibody response in humans infected with eastern and western equine encephalitis viruses: application to rapid serodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, **23**: 369-372, 1986.
- CALISHER, C.H. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family *Flaviviridae*) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. **Acta Virologica**, **32**: 469-78, 1988.
- CALISHER, C.H., KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Monath, T.P. (ed.). Boca Raton: CRC Press, v.1, 1988. p. 19-58.
- CALISHER, C.H., ORO, J.G.B., LORD, R.D., SABATTINI, M.S., KARABATSOS, N. Kairi Virus Identified from a Febrile Horse in Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **39**: 519-521, 1988.
- CALISHER, C.H., KARABATSOS, N., DALRYMPLE, J.M. Antigenic relationship among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Microbiology**, **70**: 37-43, 1989.
- CASALS, J., BROWN, L.V. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. **Journal of Experimental Medicine**, **99**: 429, 1954.

- CASALS, J. Viruses: The versatile parasites of the arthropod-borne group of animal viruses. **Annals of the New York Academic of Science, 19:** 219-235, 1957.
- CASTRO, A., TEMPERA, G., GUGLIELMINO, S. Incidence of arbovirus antibodies in bovine, ovine and human sera collected in Eastern Sicily. **Acta Virologica, 20:** 76-9, 1976.
- CAUSEY, O., R., MAROJA, O. M. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent .III. Investigation of an Epidemic of Acute Febrile Illness on the River Guama in Pará, Brazil, and Isolation of Mayaro Virus as Causative Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 6:** 1017-1023, 1957.
- CAUSEY, O.R., CAUSEY, C.E., MAROJA, O.M., MACEDO, D.G. 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, 10:** 227-249, 1961.
- CAUSEY, O. R., SHOPE, R. E., LAEMMERT, H. W. Report of an epizootic of encephalomyelitis virus in Pará, Brazil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Publica 12:** 47-50, 1962.
- CAUSEY, O.R., SHOPE, R.E. Icoaraci, a new virus related to Naples phlebotomus fever virus (29862). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, New York, 118:** 420-421, 1965.
- CERQUEIRA, D.I.S. **Comparação entre as técnicas de inibição de hemaglutinação e ELISA IgG no diagnóstico sorológico das infecções**

- pelo vírus dengue.** Monografia (Licenciatura em Farmácia-Bioquímica)- Belém, Centro de Ensino Superior do Pará, 1999. 56p.
- CHU, H.J., ZEE, Y.C., ARDANS, A.A., DAI, K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bovine sera. **Veterinary Microbiology, 10:** 325–333, 1985.
- CHUNGUE, E., MARCHÉ, G., PLICHAT, R., BOUTING, J.P., ROUX, J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83:** 708-11, 1989.
- CLARKE, D.H., CASALS, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 7:** 561-573, 1958.
- CORNIU, B., ARDOIN, P., BARTHOLOMEW, C., INCE, W., MASSIAH, V. First isolation of a south American strain of eastern equine virus from a case of encephalitis in Trinidad. **Tropical & Geographical medicine, 24:** 162-167, 1972.
- CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. Encefalomielite Equina. In: **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.** Correa, W.M. & Correa, C.N.M. (eds). Rio de Janeiro, Medsi, 1992. p. 635-642.
- CUNHA, R. Estudos sobre uma amostra de vírus *da encefalomielite equina* isolada de material proveniente de Recife. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 14:** 201-215, 1954.

CYBINSKI, D.H., ST GEORGE, T.D. A survey of antibody to *Aino virus* in cattle and other species in Australia. **Australian Veterinarian Journal**, **54**: 371-3, 1978.

CYBINSKI, D.H., ST GEORGE, T.D., PAULL, N.I. Antibodies to *Akabane virus* in Austrália. **Australian Veterinarian Journal**, **54**: 1-3, 1978.

Daneke Club Lambs and Livestock. Disponível em: <<http://www.danekeclublambs.com/cachevalley.jpg>>. Acesso em: 17/06/2010.

DÉGALLIER, N., HERVE, J.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., SÁ FILHO, G.C. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectivas. **Hiléia Médica**, **8**: 47-50, 1987.

DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., SÁ FILHO, G.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic Yellow Fever in Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, **44**: 136-142, 1992.

DE LUCA, R.R., ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. **Manual para Técnicos em Bioterismo.** 2ª ed. COBEA, São Paulo: Winner Graph. 1996. 121p.

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

DIAS, L.B. Patologia natural e experimental de arbovírus e vírus correlatos isolados na Amazônia. *In*: **Instituto Evandro Chagas: 50 Anos de**

- Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical.** Belém, Fundação de Serviços de Saúde Pública, (1): 1986. p. 439-450.
- DOMINGUES, O. **Introdução a Zootecnia.** Rio de Janeiro: Série didática, 1968. 138p.
- ERDMAN, D.D., ANDERSON, L.J. Monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassays for specific immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM antibodies to respiratory syncytial virus. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**: 2744-2749, 1990.
- EDWARDS, J.F., KARABATSOS, N., COLLISSON, E.W., BERMEJILLO, A.C. Ovine Fetal Malformations Induced by in Utero Inoculation with Main Drain, San Angelo, and Lacrosse Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **56**: 171-176, 1997.
- ELLIOTT, R.M. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. **Journal of General Virology**, **70**: 1281-1285, 1990.
- ELLIOTT, R.M. Bunyaviruses: General Features. In: **Encyclopedia of Virology**. Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (eds). Third edition. Elsevier Academic Press, San Diego, California. 2008. p. 391 – 399.
- EMMONS, R.W., WOODIE, J.D., LAUB, R.L., OSHIRO, L.S. Main Drain virus as a cause of equine encephalomyelitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, **183**: 555-8, 1983.
- FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. Family *Bunyaviridae*. In: **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J.,

- DESSELBERGER, U., BALL, L.A (eds). San Diego, Elsevier Academic Press, 2005. p. 695-716.
- FERNÁNDEZ, Z., RICHARTZ, R., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., SOCCOL, V.T. Identificação do vírus causador de Encefalomielite Equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **34**: 181-188, 2000.
- FERREIRA, I.B., PEREIRA, L.E., ROCCO, I.M., MARTI, A.T., SOUZA, L.T.M., IVERSSON, L.B. Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, State of São Paulo, Brazil. In: Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **36**: 265-74, 1994.
- FIGUEIREDO, L.T.M., BATISTA, W.C., NASSAR, E.S. Identification of brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using flavivirus universal primers. **American Journal of Medicine and Hygiene**, **59**: 357-362, 1998.
- FIGUEIREDO, L.T.M. The brazilian flaviviruses. **Microbes and Infections**, **2**: 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **40**: 224-229, 2007.
- FORGHANI, B., SCHMIDT, R.E. Detection of antibodies to Alphavirus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **10**: 583-585, 1979.
- FRAZIER, C.L., SHOPE, R.E. Detection of antibodies to alphaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **10**: 583-585, 1979.

GARCIA, R. **Considerações sobre o efeito do clima na performance dos búfalos.** Disponível em: <[http:// www. bufalos@yahoogrupos.com.br](http://www.bufalos@yahoogrupos.com.br)>.

Acesso em: 29/05/2010.

Genomic replication strategies of viruses. Disponível em: <<http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/bunya.gif>>. Acesso em: 10/09/2009.

GOMES, G., CAUSEY, O.R. Bussuquara, a new arthropod-borne virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 101:** 275, 1959.

GOMES-LEAL, W., MARTINS, L.C., DINIZ, J.A.P., DOS SANTOS, Z.A., BORGES, J.A., MACEDO, C.A.C., MEDEIROS, A.C., DE PAULA, L.S., GUIMARÃES, J.S., FREIRE, M.A.M., VASCONCELOS, P.F.C., PICANÇODINIZ, C.W. Neurotropism and neuropathological effectes of selected rhabdoviruuses on intranasally-infected newborn mice. **Acta Tropica, 97:** 126-139, 2006.

GUBLER, D.J. Arboviruses as imported disease agents: the need for increased awareness. **Archieves of Virology, 11:** 21-32, 1996.

GUILERMEL, J.M., GONELLA-LEGALL, C., LEGALL, F., NAKOUME, E., VINCENT, J. Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central Afican Republican. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90:** 31-33, 1996.

HEINEMANN, M.B., SOUZA, M.C.C., CORTEZ, A., FERREIRA, F., HOMEM, V.S.F; FERREIRA-NETO, J.S., SOARES, R.M., CUNHA, E.M.S., RICHTZENHAIN, L.J. Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no Município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of**

Veterinary Research and Animal Science, 43: 1-5, 2006.

HERENDA, D. [org] Specific diseases of sheep and goats. In: _____. **Manual on meat inspection for developing countries.** ISBN 92-5-103304-8. Food and Agriculture Organization. Roma, 2000. Disponível em: www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E06.htm, acesso em 27 de junho de 2010.

HENRIQUES, D. F. **Infecção persistente pelos flavivírus *Ilhéus* e *Rocio* em hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*).** Dissertação (mestrado em Patologia das Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2009. 99 p.

HOFMANN, M, WYLER, R: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. **Veterinary Microbiology, 21:** 263-273, 1990.

HUROGI, H., INABA, Y., TAKAHASHI, E., SATO, K., SATODA, K., GOTO, Y., OMORI, T., MATUMOTO, M. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with *Akabane virus*. **Infection and Immunity, 17:** 338-343, 1977.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Pesquisa Pecuária Municipal. [2006a] Banco de dados agregados. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=20&i=P>, Acesso em 18/08/2006.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Divisao_MAPAS33441148189. [2006b] Banco de dados agregados.

- Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>, Acesso em 28/05/2006.
- INNIS, B.L. Antibody responses to dengue vírus infection. In: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Gubler, D.J & Kuno, G (eds). Cambridge/UK, University Press, 1997. p. 221-243.
- IVERSSON, L.B. Rocio encephalitis. In: **Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. CRC Press: Boca Raton, V. III, 1988. p. 77-92.
- IVERSSON, L.B., SILVA, R.A.M.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., BARROS, V.L.R.S. Circulation of *Eastern Equine Encephalitis*, *Western Equine Encephalitis*, *Ilhéus*, *Maguari* and *Tacaiuma* viruses in equines of the brazilian pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **35**: 355-359, 1993.
- JACOBSON, R.H. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: **OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**, fourth ed. Office International des Epizooties, Paris, France . 2000.
- JOHNSON, A.J., MARTIN, D.A., KARABATSOS, N., ROEHRIG, J.T. Detection of Anti-Arboviral Immunoglobulin G by Using a Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 1827-1831, 2000.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**, 3rd. ed. San Antonio, USA: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1985. 1141p.

- KIRKLAND, P.D. *Akabane* and *Bovine ephemeral fever virus* infections. **Veterinary Clinical of North America and Food Animal Practical**, **18**: 501-14, 2002.
- KOMAR, N., CLARK, G.G. *West Nile virus* activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salude Publica**, **19**: 112-117, 2006.
- KOOGAN, A., HOUAISS, A. **Enciclopédia e dicionário ilustrado**. 4 ed. Rio de Janeiro: Edições Delta, 2000. 1808p.
- KUNO, G., GOMEZ, I., GUBLER, D.J. - Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **36**: 153-159, 1987.
- KUNO, G., GÓMEZ, I., GUBLER, D.J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **Journal of Virological Methods**, **33**: 101-113, 1991.
- LANCONESCU, M. Turkey mengo-encephalitis: a general review. **Avian Diseases**, **20**: 2-3, 1976.
- LE DUC, J.W., PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of mayaro virus disease in Belterra, Brazil. II. Epidemiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 682-688, 1981.
- LE DUC, J.W., PINHEIRO, F.P. Oropouche fever. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Monath, T. P. (ed.). v. 4, Boca Ratón: CRC Press, 1988. p. 1-14.
- LOPES, O.S., SACHETTA, L.A. Isolation of *Mucambo virus*, a member of the Venezuelan equine encephalitis virus complex in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, **20**: 82-6, 1978.

- LUBY, J.P. Saint Louis Encephalitis. **Epidemiology Review**, **1**: 55-73, 1979.
- MARTINS, L. C., DINIZ, J. A. P., SILVA, E. V. P., BARROS, V. L. R. S., MONTEIRO, H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Characterization of Minaçu vírus (Reoviridae: Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice. **International Journal of Experimental Pathology**, **88**: 63-73, 2007.
- MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas**, 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 237 p.
- MEEGAN, J.M. Yellow Fever. In: **Handbook of Zoonoses**. Section B: Viral. 2ed. Beran, George W. (ed.). EUA: CRC Press, 1994. p. 111-124.
- MEZADRI, T.J., TOMAZ, V.A., AMARAL, V.L.L. **Animais de Laboratório: Cuidados na iniciação experimental**. Editora da UFSC. COBEA. Cap. 4, 2004. 106p.
- METTLER, N.E., FERNÁNDEZ, A.S., DI SANTO, M.I., PARDO, D.A. Flavivirus: serological survey in horses from the Tandil area. **Revista Argentina de Microbiologia**, **17**: 47-49, 1985.
- MITCHELL, C.J., FORATTINI, O.P., MILLER, B.R. Vector competence experiments with *Rocio virus* and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, **20**: 171-177, 1986.
- MOHAMED, M., MCLEES, A., ELLIOTT, R.M. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete Serogroups in the *Orthobunyavirus* genus (family *Bunyaviridae*) do not encode a NSs protein. **Journal of Virology**, **83**: 7612-7618, 2009.

MONATH, T.P. SABATINI, M.S., PAULI, R., DAFNER, J.F., MITCHEL, C.J. BOWEN, G.S., CROPP, C.B. Arbovirus investigation in Argentina, 1977-1980. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **34**: 966-975, 1985.

MONATH, T.P. Yellow Fever. In: **The Arboviruses: ecology and epidemiology**. Monath, T.P. (ed.), v. 5. CRC Press, Boca Raton, USA. 1988. p. 139-241.

MONDET, B., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C. Les Risques D'Épidémisation Urbaine de la Fièvre Jaune au Brésil par les Vecteurs de la Dengue. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, **89**: 107-114, 1996.

MONDINI, A., CARDEAL, I.L.S., NUNES, S.H., MOREIERA, C.C., RAHAL, P., MAIA, I.L., FRANCO, C., GÓNGORA, D.V.N., GÓMGORA-RUBIO, F., CABRERA, E.M.S., FIGUEIREDO, L.T.M., FONSECA, F.G., BRONZONI, R.V.M., CHIARAVALLLOTI-NETO, F., NOGUEIRA, M.L. *Saint Louis encephalitis virus*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, **13**: 176-178, 2007.

MORALES, M.A., BARRANDEGUY, M., FABBRI, C., GARCIA, G.B., VISSANI, A. TRONO, K., GUTIERREZ, G., PIGRETTI, S., MENCHACA, H., GARRIDO, N., TAYLOR, N., FERNANDEZ, F., LEVIS, S., ENRÍA, D. *West Nile virus* isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, **12**: 1559-1566, 2006.

- MURPHY, F.A. Virus taxonomy. In: **Virology**. Fields, B.N., Knipe, D.M., Honleyl, P.M. (eds). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.15-57.
- MURRAY, P.R., DREW, ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. Togavírus e Flavivírus. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. 623-634p.
- NICOLSON, T.B., NETTLETON, P.F., SPENCE, J.A., CALDER K.H. High incidence of abortions and congenital deformities of unknown aetiology in a breed herd. **Veterinary Record**, **116**: 281-284, 1985.
- NILSON, M.R., SUGAY, W. Ocorrência da encefalomielite equina em Itaporanga, Estado de São Paulo, I isolamento e identificação do vírus. **Arquivo do Instituto Biológico**, **29**: 63-68, 1962.
- PARSONSON, I.M., DELLA-PORTA, A.J., SNOWDON, W.A. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with *Akabane virus*. **Infection and Immunity**, **15**: 254-262, 1977.
- PAUVOLID-CORRÊA; A., VARELLA; R.B. Aspectos epidemiológicos da febre do oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **11**: 1-11, 2008.
- PAVARINI; S.P. SONNE, L., ANTONIASSI, N.A.B., SANTOS; A.S.O., PESCADOR; C.A., CORBELLINI; L.G., DRIEMEIER, D. Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **28**: 149-154, 2008.
- PAWESKA; J.T., BURT, F.J., ANTHONY, F., SMITH, S.J., GROBBELAAR, A.A., CROFT, J.E., KSIAZEK, T.G., SWANEPOEL, R. IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of

- antibody to *Rift Valley fever virus* in domestic ruminants. **Journal of Virological Methods**, **113**: 103-112, 2003.
- PAWESKA, J.T., BURT, F.J., SWANEPOEL, R. Validation of IgG-sandwich and IgM-capture ELISA for the detection of antibody to *Rift Valley fever virus* in humans. **Journal of Virological Methods**, **124**: 173-181, 2005.
- PHILIP SAMUEL, P., TYAGI, B.K. Diagnostic methods for detection and isolation of *Dengue* viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research**, **123**: 615-28, 2006.
- PINHEIRO, F.P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G. CAUSEY, O.R., SHOPE, R. Epidemia de Vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, **12**: 15-23, 1962.
- PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., FREITAS, R.B., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, Vol. 1, 1986. p.375-408.
- PINHEIRO, F.P., LEDUC, J.W. *Mayaro virus* disease. In: **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Monath, T.P. (ed). Vol. 3. Boca raton: CRC Press; 1988. p. 137-150.
- PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Arboviral zoonoses of Central and South American. Parte E. Ilheus Fever. In: **Handbook of Zoonoses**. Section B: Viral. 2ed. Beran, George, W. (ed.). EUA: CRC Press, 1994. p. 210-212.

- PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R., Focaccia, R. (eds.). São Paulo: Atheneu, 1996. p. 169-180.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. Vírus e Prions. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (eds). Porto Alegre, Artmed. 2005. p.309-430.
- REISEN, W.K. Epidemiology of *Saint Louis encephalitis virus*. In: **Advances in Virus Research**. Maramoroshch, K., Murphy, F.A. Shatkin, A.J., (eds). San Diego, Academic Presss, 2003. p. 139-83.
- RIBEIRO, S.L.G. **Pesquisa de anticorpos para os arbovírus de maior ocorrência na região amazônica em soro de búfalos (*Bubalus bubalis*) provenientes do município de Soure-Ilha de Marajó/PA**. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária)-Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2006. 63p.
- ROBERTSON, S.E., HULL, B.P., TOMORI, O., BELE, O., LEDUC, J.W., ESTEVES, K. Yellow Fever. A decade of reemergence. **The Journal of the American Medical Association**, **276**: 1157-62, 1996.
- ROCCO, I.M., SANTOS, C.L.S., BISORDI, I., PETRELLA, S.M.C.N., PEREIRA, L.E., SOUZA, R.P., COIMBRA, T.L.M., BESSA, T.A.F., OSHIRO, F.M., LIMA, L.B.Q., CERRONI, M. P., MARTI, A.T., BARBOSA, V.M., KATZ, G., SUZUKI, A. *Saint Louis encephalitis virus*: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **47**: 281-285, 2005.

- RODRIGUES; A., FIGHERA, R.A.; SOUZA; T.M., SCHILD; A.L., SOARES; M.P., MILANO; J., BARROS, C.S.L. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **25**: 12-25, 2005.
- RODRIGUES, S.G., OLIVA, O.P., ARAÚJO, F.A.A. MARTINS, L.C., CHIANG, J.O., HENRIQUES, D.F., SILVA, E.V.P., RODRIGUES, D.S.G., PRAZERES, A.S.C., TAVARES-NETO, J., VASCONCELOS, P.F.C. Epidemiology of *Saint Louis encephalitis virus* in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica da Saúde**, **1**: 81-86, 2010.
- ROSS, C.E., DUBOVI, E.J., DONIS, R.O. Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, **188**: 618-619, 1986.
- SCHMALJOHN, C. S., NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: **Virology**. Fields, B.N., Knipe, D. M. (eds). Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1741 – 1789.
- SCHMIDT, V., OLIVEIRA, R.T. Artrogripose em caprino: Relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **56**: 38-440, 2004.
- SCHRIJVER, R.S., KRAMPS, J.A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assay formats. **Revue Science Techonology off International Epizootiology**, **17**: 550–661, 1998.

- SCOTT, B., JACOBSON, J. Japanese Encephalitis. In: **Advances in Virus Research**. Maramoroshch, K., Murphy, F.A. Shatkin, A.J., (eds). San Diego, Academic Presss, 2003. p. 103-138.
- SHOPE, R.E. The use of micro-hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, **11**: 167-171, 1963.
- SHOPE, R.E., CAUSEY, O.R., ANDRADE, A.H.P., THEILER, M. The Venezuelan equine encephalomyelitis complex group A arthropod-borne virus, including mucambo and pixuna from the amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **13**: 723, 1964.
- SHOPE, R.E., ANDRADE, A.H.P., BENSABATH, G., CAUSEY, O.R., HUMPHREY, P.S. The epidemiology of EEE, WEE, SLE and Turlock viruses, with special reference to birds, in a tropical rain florest near Belém, Brazil. **American Journal of Epidemiology**, **84**: 467-477, 1966.
- SHOPE, R.E., SATHER, G. E. Arboviruses. In: **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. Lennette, E.H., Schmidt, N.J. (eds.). Washington, American Public Health Association, 1979. p. 767-814.
- SHOPE, R.E. Disease in evolution- Global changes and emergence of infectious disease in: **Annals of the New York Academy of Sciences**, **740**. The discovery of arbovírus diseases.1994.
- SILVA-NUNES, M., MALAFRONTTE, R.D.O.S., LUZ, B.D.E.A., SOUZA, E.A., MARTINS, L.C., RODRIGUES, S.G., CHIANG, J.O., VASCONCELOS, P.F.C., MUNIZ, P.T., FERREIRA, M.U. The acre project: the epidemiology

- of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Caderno de Saude Pública**, **22**: 1325-34, 2006.
- SRIHONGSE, S., MOORE, C.M. The first isolation of *Bussuquara virus* from man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **65**: 541, 1971.
- ST GEORGE, T.D., STANDFAST, H.A., CYBINSKI, D.H., FILIPPICH, C., CARLEY, J.G. *Peaton virus*: a new simbu group arbovirus isolated from cattle and *Culicoides brevitarsis* in Australia. **Australian Journal of Biology and Science**, **33**: 235-43, 1980.
- STOTT, J.L. *Togaviridae e Flaviviridae*. In: **Microbiologia Veterinária**. Hirsh, D.C & Zee, Y. C. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. p. 358-367.
- STRAATMANN, A., SANTOS-TORRES, S., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TAVARES-NETO, J. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **30**: 511-515, 1997.
- THEILER, M., DOWNS, W.G. The arthropod-borne viruses of vertebrates. New Haven, Yale University Press, 1973.
- TORRES, A.D.P., JARDIM, W.R., JARDIM, L.B.F. **Manual de Zootecnia-Raças que interessam para o Brasil**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres LTDA, 1982. 9-12p.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., SHOPE, R.E., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., NAKAUTH, C., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: Aspectos virológicos. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de Contribuição às**

- Ciências Biológicas e à Medicina Tropical.** Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p.365-373.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., DÉGALLIER, N., VASCONCELOS, P.F.C., RODRIGUES, S.G., CRUZ, A.C.R. **Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo.** Belém: Instituto Evandro Chagas/ Fundação Nacional de Saúde, 1994. 28p. (Documento Técnico n. 2. Instituto Evandro Chagas/ Fundação Nacional de Saúde).
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., PINHEIRO, F.P., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico.** Leão, R.N.Q. (ed.). Belém: CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. p. 207-225.
- TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., PINHEIRO, F.P., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., DIAS, L.B., CRUZ, A.C.R. 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: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries.** Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C., Travassos da Rosa, J.F.S. (eds.). Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p.19-31.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TURELL, M.J., WATTS, D.M., POWERS, A.M., VASCONCELOS, P.F.C., JONES, J.W., KLEIN, T.A., DOHM, D.J., SHOPE, R.E., DÉGALLIER, N., POPOV, V.L., RUSSELL, K.L., WEAVER,

- S.C., GUZMAN, H., CALAMPA, C., BRAULT, A.C., LEMON, A.P., TESH, R.B. *Trocará virus: a newly recognized Alphavirus (Togaviridae) isolated from mosquitoes in the Amazon Brazilian. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64: 93-97, 2001.*
- ULLOA, A. LANGEVIN, S.A., MENDEZ-SANCHEZ, J.D., ARREDONDO-JIMENEZ, J.I., RAETZ, J.L., POWERS, A.M., VILLARREAL-TREVIÑO, C., GUBLER, D.J., KOMAR, N. Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest region of Chiapas, Mexico. **Vector Borne Zoonotic Disease, 3: 3-9, 2003.**
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARTENS, E.B., ESSES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., McGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WIKNER, R.B. **Virus Taxonomy. VII report of the ICTV.** San Diego: Academic Press, 2000. 1167p.
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., DEGALLIER, N., PINHEIRO, F.P., SÁ FILHO, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, 33: 465-476, 1991.**
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., PINHEIRO, F.P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura** (Journal of the Brazilian association for the Advancement of Science), **44: 117-124, 1992.**
- VASCONCELOS, P.F.C., RODRIGUES, S.G., DÉGALLIER, N., MORAES, M.A., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.,

- MONDET, B., BARROS, V.L. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **57**: 132-137, 1997.
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P., SHOPE, R.E., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., RODRIGUES, S.G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C., Travassos da Rosa, J.F.S. (eds.). *Belém*: Instituto Evandro Chagas, 1998, p. 72-99.
- VASCONCELOS, P.F.C. Emergence of arboviruses in Brazilian Amazon region. **Virus Review and Research**, **4**: 48-49, 1999.
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., CRUZ, E.S., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American Countries. Past and present, and future perspectives. **WHO Dengue Bulletin**, **23**: 55-66, 1999.
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, **17**: 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 275-293, 2003.

VIEIRA, C.M.A., CASSEB, A.R., CARVALHO, V.L., BITTENCOURT, R.H.F.P.M., SILVA, M.C., MOREIRA, A.H., SOUZA, R.K.A., CASSEB, L.M.N., VASCONCELOS, P.F.C. Pesquisa de anticorpos para arbovírus em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*) em Salvaterra, na Ilha de Marajó-Pará. In: **XX Congresso de Medicina Veterinária**, São Luís, 2004, p.15.

VORNDAM, V., KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Gubler, D.J & Kuno, G. (eds). Cambridge/UK, University Press, 1997. p. 313-333.

WEAVER, S.C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. In: **Infectious Disease from Nature: Mechanisms of Viral and Persistence**. Peters, C.J. & Calisher, C.H. (eds). New York/ USA, Springer Viena, 2005. p. 33-44.

WEAVER, S.C., FREY, T.K., HUANG, H.V., KINNEY, R.M., ROEHRIG, J.T., SHOPE, R.E., STRAUSS, E.G. *Togaviridae*. In: **Virus Taxonomy. VIII report of the ICTV**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. P. 999-1008.

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

WEAVER, S.C., REISEN, W.K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, **85**: 328-45, 2010.

- WESTAWAY, E. G., DELLA-PORTA, A. J., REEDMAN, B. M. Specificity of IgM and IgG antibodies after challenge with antigenically related togaviruses. **The Journal of Immunology**, **112**: 656-663, 1974.
- WESTAWAY, E.G., BRITON, M.A., GAIDAMOVICH, S.Y., HORZINEK, M.C., IGARASHI, A., KAARIANEN, L., LVOV, D.K., PORTERFIELD, J.L., RUSSELL, P.K., TRENT, D.W. *Flaviviridae*. **Intervirology**, **24**: 183-192, 1985.
- WHITE, D.O., FENNER, F.J. Epidemiology of viral infections. **Medical Virology**. San Diego: Academic Press. Cap.14, 1994. 233-255p.
- WOODALL, J. Notas históricas de alguns arbovírus isolados no laboratório de vírus de Belém da Fundação Rockefeller. In: **III Simpósio Internacional de Arbovírus dos Trópicos e febres Hemorrágicas**. Belém, Pará, Brasil, 30.11 a 03.12. 2004, p. 12-13.
- YOUNG, N.A., JOHNSON, K.M. Antigenic variants of *Venezuelan equine encephalitis virus*. Their geographic distribution and epidemiologic significance. **American Journal of Epidemiology**, **89**: 286-307, 1969.

APÊNDICES

**APÊNDICE A - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DE ANTICORPOS IH
PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS EM SOROS DE HERBÍVOROS DOMÉSTICOS
POR MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ:**

Antígenos Virais	Met. N=335		Nordeste N=428		Sudeste N=277		Sudoeste N=310		B. A N=402		Marajó N=439	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
EEEV	33	9,85	76	17,75	33	11,91	57	18,39	46	11,44	41	9,34
WEEV	45	13,43	72	16,82	22	7,94	21	6,77	75	18,65	22	5,01
MAYV	02	0,60	04	0,93	08	2,89	05	1,61	33	8,30	02	0,45
MUCV	03	0,89	09	2,10	07	2,53	33	10,64	55	13,68	10	2,28
YFV	25	7,46	45	10,51	12	4,33	39	12,58	32	7,96	23	5,24
ILHV	61	18,21	75	17,52	15	5,42	71	22,90	15	3,73	138	31,43
SLEV	51	15,22	155	36,21	80	28,88	88	28,39	93	23,13	155	35,31
CPCV	24	7,16	24	5,61	34	12,27	05	1,61	08	1,99	07	1,59
BSQV	04	1,19	13	3,04	16	5,78	13	4,19	09	2,24	02	0,45
ROCV	12	3,58	38	8,88	14	5,05	18	5,80	17	4,23	24	5,46
GROV	06	1,79	34	7,94	02	0,72	23	7,42	06	1,49	08	1,82
MAGV	34	10,14	62	14,49	27	9,75	66	21,29	30	7,46	44	10,02
TCMV	12	3,58	41	9,58	03	1,08	33	10,64	17	4,23	08	1,82
ICOV	---	---	09	2,10	01	0,36	02	0,64	07	1,74	03	0,68
UTIV	08	2,39	06	1,40	02	0,72	13	4,19	16	3,98	03	0,68
BLMV	01	0,30	01	0,23	01	0,36	---	---	02	0,50	---	---
CARV	01	0,30	03	0,70	---	---	03	0,97	06	1,49	05	1,14
OROV	---	---	---	---	03	1,08	01	0,32	07	1,74	19	4,33
CATUV	06	1,79	17	3,97	01	0,36	05	1,61	09	2,24	19	4,33

IH- Inibição de Hemaglutinação; UHA- Unidades Hemaglutinantes; --- ausência de reação positiva, Met.- Mesorregião Metropolitana de Belém; Nordeste- Mesorregião do Nordeste Paraense; Sudeste- Mesorregião do Sudeste Paraense; Sudoeste- Mesorregião do Sudoeste Paraense; B.A- Mesorregião do baixo Amazonas; Marajó- Mesorregião do Marajó; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

**APÊNDICE B- FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DE
ANTICORPOS IH PARA 19 TIPOS DE ARBOVÍRUS POR ESPÉCIE ANIMAL**

Antígenos Virais	Equinos N=753		Bovinos N=399		Bubalinos N=654		Ovinos N=385	
	n	%	n	%	n	%	n	%
EEEV	227	30,14	03	0,75	53	8,10	03	0,78
WEEV	172	22,84	27	6,77	51	7,80	07	1,82
MAYV	40	5,31	01	0,25	13	1,99	---	---
MUCV	63	8,36	04	1,00	49	7,49	01	0,26
YFV	105	13,94	45	11,28	23	3,52	03	0,78
ILHV	262	34,79	38	9,52	73	11,16	02	0,52
SLEV	367	48,73	70	17,54	147	22,48	38	9,87
CPCV	80	10,62	14	3,5	08	1,22	0	---
BSQV	44	5,84	01	0,25	06	0,92	06	1,56
ROCV	101	13,41	08	2,00	13	1,99	01	0,26
GROV	70	9,26	---	---	07	1,07	02	0,52
MAGV	167	22,17	17	4,26	48	7,34	31	8,05
TCMV	98	13,01	04	1,00	09	1,38	03	0,78
ICOV	02	0,26	03	0,75	15	2,29	02	0,52
UTIV	41	5,44	02	0,50	03	0,46	02	0,26
BLMV	05	0,66	---	---	---	---	---	---
CARV	11	1,46	02	0,50	06	0,92	---	---
OROV	24	3,19	---	---	03	0,46	03	0,78
CATUV	47	6,24	01	0,25	07	1,07	02	0,52

IH- Inibição de Hemaglutinação; UHA- Unidades Hemaglutinantes; --- ausência de reação positiva, EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

**APÊNDICE C- FREQUÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA DE REAÇÕES
MONOTÍPICAS PELO TESTE DE IH NAS DIFERENTES FAMÍLIAS DE
ARBOVÍRUS EM SOROS DE HERBÍVOROS DOMÉSTICOS**

	Antígenos Virais	Equinos		Bovinos		Bubalinos		Ovinos	
		RM/RT	%	RM/RT	%	RM/RT	%	RM/RT	%
Togaviridae	EEEV	74/227	32,60	02/03	66,67	38/53	71,70	02/03	66,67
	WEEV	24/172	13,95	25/27	92,59	31/51	60,78	07/07	100
	MAYV	04/40	10,00	01/01	100	04/13	30,77	---/---	---/---
	MUCV	09/63	14,29	03/04	75,00	23/49	46,94	01/01	100
Flaviviridae	YFV	03/105	2,86	18/45	40,00	09/23	39,13	01/03	33,33
	ILHV	48/262	18,32	10/38	26,32	25/73	34,25	01/02	50,00
	SLEV	122/367	33,24	24/70	34,29	82/147	55,78	36/38	94,74
	CPCV	03/80	3,75	04/14	28,57	---/08	---/---	---/---	---/---
	BSQV	03/44	6,82	---/01	---/---	04/06	66,67	05/06	83,33
	ROCV	---/101	---/---	01/08	12,50	02/13	15,38	---/01	---/---
Bunyaviridae	GROV	10/70	14,29	---/---	---/---	06/07	85,71	01/02	50,00
	MAGV	68/167	40,72	15/17	88,24	43/48	89,58	27/31	87,10
	TCMV	19/98	19,39	04/04	100	08/09	88,89	03/03	100
	ICOV	---/02	---/---	02/03	66,67	15/15	100	01/02	50,00
	UTIV	02/41	4,88	01/02	50,00	03/03	100	---/02	---/---
	BLMV	02/05	40,00	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---
	CARV	---/11	---	01/02	50,00	06/06	100	---/---	---/---
	OROV	04/24	16,67	---/---	---/---	01/03	33,33	---/03	---/---
	CATUV	03/47	6,38	01/01	100	06/07	85,71	---/02	---/---

RM- Reações monotípicas, RT- Reações totais, --- ausência de reação positiva, EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV – *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

**APÊNDICE D- PROTOCOLO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA
SANDUÍCHE INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IgG EM HERBÍVOROS
DOMÉSTICOS**

ETAPA I: IGUAL PARA TODOS OS VÍRUS

- 1- Lavar as microplacas uma vez com tampão de lavagem (PBS pH 7.4 TWEEN 20 0,1%) e sensibilizá-las com 100 µL por orifício de FAI diluídos 1:300 em tampão de carbonato-bicarbonato pH 9,6. Incubar as microplacas *overnight* a 4° C OU 2 h em câmara úmida.
- 2- Após a incubação, lavar as microplacas três vezes (PBS pH 7,4 TWEEN 20 0,1%) e bloqueá-las com 160 µL por orifício de uma solução de leite *fat free* 5% em tween-20 0,05%, durante 60 minutos a 37° C em câmara úmida.
- 3- Lavar as microplacas três vezes (PBS pH 7,4 TWEEN 20 0,1%) e adicionar 75 µL da mistura de antígenos (4 a 32 UHA) diluídos em solução de leite *fat free* 5% em tween-20 0,05%. Incubar as microplacas a 37° C por 1 hora em câmara úmida.

ETAPA II: DIFERENTE PARA CADA ESPÉCIE ANIMAL E TIPO DE VÍRUS

- 1- DILUIÇÃO DO SORO: Lavar as microplacas três vezes (PBS pH 7,4 TWEEN 20 0,1%) e adicionar 75 µL das amostras de soro diluídas em leite *fat free* 5% em tween-20 0,05% nos orifícios, incubar por 1 hora a 37° C em câmara úmida. As fileiras 11 e 12 devem ser usadas para os soros controles e branco, como segue: fileira 11 (A a H) usar soro controle negativo, fileira 12 de

A a D usar com soro controle positivo e fileira 12 de E a H usar como branco (sem soro).

EQUINOS: As amostras de soro são diluídas conforme a família de arbovírus, *Togaviridae*: 1: 100, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* 1: 200.

BOVINOS, BUBALINOS E OVINOS: As amostras de soro são diluídas 1:100 para todas as famílias de arbovírus.

2- DILUIÇÃO DO CONJUGADO: Lavar as microplacas três vezes (PBS pH 7,4 TWEEN 20 0,1%) e adicionar 40 μ L de anticorpo anti IgG de animal (CONJUGADO) diluído em leite *fat free* 5% em Tween-20 0,05% a cada orifício da placa e incubadas por 1 hora a 37° C em câmara úmida.

EQUINOS: 1:10000; BOVINOS: 1:1000, BUBALINOS: 1:100, OVINOS 1:10000.

ETAPA III: IGUAL PARA TODAS AS ESPÉCIES ANIMAIS E ARBOVÍRUS;

Lavar as microplacas seis vezes (PBS pH 7,4 TWEEN 20 0,1%) e adicionar 100 μ L da solução substrato (SOL A (2,2' -azino-di- (3- etilbenzotiazolína-6-sulfonato) na concentração de 0,3 g/L em tampão ácido e solução B (H₂O₂ na concentração de 0.02% em um tampão apropriado) misturadas na proporção de 1:1. Incubar por 30 minutos a 37° C. Ler a placa em espectrofotômetro com filtro de D.O 405 nm.

Para validação do teste é utilizado o critério de razão entre a média aritmética das densidades ópticas (D.O) dos controles positivos em relação à média aritmética das D.O dos controles negativos, esta razão, tem que ter o valor \geq a dois

O *cut-off* é determinado pela média das D.O dos controles negativos mais três desvios padrões, desta forma são consideradas positivas as amostras que resultarem $D.O \geq$ ao *cut-off* e todas as amostras que apresentaram $D.O <$ que o *cut-off* são consideradas negativas.

**APÊNDICE E- RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DO TESTE
IMUNOENZIMÁTICO- ELISA SANDUÍCHE INDIRETO PARA DETECÇÃO DE
IgG COM O TESTE DE IH (PADRÃO OURO) EM EQUINOS PARA 19 TIPOS
DE ARBOVÍRUS PELO SCREENING TEST.**

Antígeno	SENS.	ESP.	FP	FN	PREV	VPTP	VPTN	ACUR	LR	LR
Viral	%	%	%	%	%	%	%	%	POS	NEG
EEEV	70,31	61,90	38,10	29,69	27,59	41,28	84,55	64,22	1,85	0,48
WEEV	52,73	60,45	39,55	47,27	23,71	29,29	80,45	58,62	1,33	0,78
MAYV	53,85	66,99	33,01	46,15	11,21	17,07	92,00	65,52	1,63	0,69
MUCV	51,85	62,93	37,07	48,15	11,64	15,56	90,85	61,64	1,40	0,77
GROV	46,15	49,77	50,23	53,85	5,60	5,17	93,97	49,57	0,92	1,08
MAGV	63,16	45,71	54,29	36,84	24,57	27,48	79,21	50,00	1,16	0,81
TCMV	44,44	47,80	52,20	55,56	11,64	10,08	86,73	47,41	0,85	1,16
ICOV	100,00	53,68	46,32	0,00	0,43	0,93	100,00	53,88	2,16	0,00
UTIV	72,73	50,00	50,00	27,27	9,48	13,22	94,59	52,16	1,45	0,55
BLMV	100,00	48,91	51,09	0,00	1,29	2,50	100,00	49,57	1,96	0,00
CARV	66,67	53,81	46,19	33,33	3,88	5,50	97,56	54,31	1,44	0,62
OROV	55,00	45,75	54,25	45,00	8,62	8,73	31,51	46,55	1,01	0,98
CATUV	53,85	47,57	52,43	46,15	11,21	11,48	89,09	48,28	1,03	0,97
YFV	72,97	45,13	54,87	27,03	15,95	20,15	89,80	49,57	1,33	0,60
ILHV	40,85	40,99	59,01	59,15	30,60	23,39	61,11	40,95	0,69	1,44
VSLE	61,16	49,55	50,45	38,84	52,16	56,92	53,92	55,60	1,21	0,78
CPCV	81,82	40,00	60,00	18,18	9,48	12,50	95,45	43,97	1,36	0,45
BSQV	86,67	46,08	53,92	13,33	6,47	10,00	98,04	48,71	1,61	0,29
ROCV	82,14	39,71	60,29	17,86	12,07	15,75	94,19	44,83	1,36	0,45

%- Percentual; SENS.-Sensibilidade; ESP.-Especificidade; FP-Falso Positivo; FN- Falso Negativo; PREV. Prevalência; VPTP- Valor preditivo do teste positivo; VPTN- Valor preditivo do teste negativo; ACUR. – Acurácia; LR POS- Likelihood ratio positivo; LR NEG- Likelihood ratio negativo; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

**APÊNDICE F- RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DO TESTE
IMUNOENZIMÁTICO- ELISA SANDUÍCHE INDIRETO PARA DETECÇÃO DE
IgG COM O TESTE DE IH (PADRÃO OURO) EM BOVINOS PARA 19 TIPOS DE
ARBOVÍRUS PELO SCREENING TEST**

Antígeno Viral	SENS. %	ESP. %	FP %	FN %	PREV. %	VPTP %	VPTN %	ACUR. %	LR POS.	LR NEG.
EEEV	0,00	95,65	4,35	100,00	1,43	0,00	98,51	94,29	0,00	1,05
WEEV	50,00	94,29	5,71	50,00	0,00	0,00	100,00	94,29	8,75	0,53
MAYV	50,00	92,86	7,14	50,00	0,00	0,00	100,00	92,86	7,00	0,54
MUCV	50,00	92,86	7,14	50,00	0,00	0,00	100,00	92,86	7,00	0,54
GROV	50,00	84,29	15,71	50,00	0,00	0,00	100,00	84,29	3,18	0,59
MAGV	0,00	84,85	15,15	100,00	5,71	0,00	93,33	80,00	0,00	1,18
TCMV	50,00	88,57	11,43	50,00	0,00	0,00	100,00	88,57	4,38	0,56
ICOV	50,00	81,43	18,57	50,00	0,00	0,00	100,00	81,43	2,69	0,61
UTIV	50,00	74,29	25,71	50,00	0,00	0,00	100,00	74,29	1,94	0,67
BLMV	50,00	74,29	25,71	50,00	0,00	0,00	100,00	74,29	1,94	0,67
CARV	50,00	77,14	22,86	50,00	0,00	0,00	100,00	77,14	2,19	0,65
OROV	50,00	78,57	21,43	50,00	0,00	0,00	100,00	78,57	2,33	0,64
CATUV	0,00	84,06	15,94	100,00	1,43	0,00	98,31	82,86	0,00	1,19
YFV	0,00	82,09	17,91	100,00	4,29	0,00	94,83	78,57	0,00	1,22
ILHV	0,00	86,76	13,24	100,00	2,86	0,00	96,72	84,29	0,00	1,15
VSLE	7,69	91,23	8,77	92,31	18,57	16,67	81,25	75,71	0,88	1,01
CPCV	0,00	89,71	10,29	100,00	2,86	0,00	96,83	87,14	0,00	1,11
BSQV	0,00	85,51	14,49	100,00	1,43	0,00	98,33	84,29	0,00	1,17
ROCV	0,00	88,24	11,76	100,00	2,86	0,00	96,77	85,71	0,00	1,13

%- Percentual; SENS.-Sensibilidade; ESP.-Especificidade; FP-Falso Positivo; FN- Falso Negativo; PREV. Prevalência; VPTP- Valor preditivo do teste positivo; VPTN- Valor preditivo do teste negativo; ACUR. – Acurácia; LR POS- Likelihood ratio positivo; LR NEG- Likelihood ratio negativo; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

**APÊNDICE G - RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DO TESTE
IMUNOENZIMÁTICO- ELISA SANDUÍCHE INDIRETO PARA DETECÇÃO DE
IgG COM O TESTE DE IH (PADRÃO OURO) EM OVINOS PARA 19 TIPOS
DE ARBOVÍRUS PELO SCREENING TEST**

Antígeno	SENS.	ESP.	FP	FN	PREV.	VPTP	VPTN	ACUR.	LR	LR
Viral	%	%	%	%	%	%	%	%	POS.	NEG.
EEEV	50,00	51,90	48,10	50,00	1,25	1,30	98,80	51,88	1,04	0,96
WEEV	40,00	54,84	45,16	60,00	3,13	2,78	96,59	54,38	0,89	1,09
MAYV	50,00	68,13	31,88	50,00	0,00	0,00	100,00	68,12	1,57	0,73
MUCV	50,00	77,5	22,50	50,00	0,00	0,00	100,00	77,50	2,22	0,65
GROV	50,00	76,58	23,42	50,00	0,00	0,00	100,00	76,58	2,14	0,65
MAGV	33,33	63,76	36,24	66,67	5,70	5,26	94,06	62,03	0,92	1,05
TCMV	0,00	63,69	36,31	100,00	0,63	0,00	39,01	63,29	0,00	1,57
ICOV	50,00	75,32	24,68	50,00	0,00	0,00	100,00	75,32	2,03	0,66
UTIV	50,00	79,11	20,89	50,00	0,00	0,00	100,00	79,11	2,39	0,63
BLMV	50,00	74,40	25,60	50,00	0,00	0,00	100,00	74,40	1,95	0,67
CARV	50,00	89,24	10,76	50,00	0,00	0,00	100,00	89,24	4,65	0,56
OROV	0,00	82,01	17,99	100,00	1,42	0,00	98,28	80,85	0,00	1,22
CATUV	0,00	78,85	21,15	100,00	1,27	0,00	98,40	77,85	0,00	1,27
YFV	0,00	68,35	31,65	100,00	1,25	0,00	98,18	67,50	0,00	1,46
ILHV	0,00	62,26	37,74	100,00	0,63	0,00	99,00	61,88	0,00	1,61
VSLE	33,33	58,45	41,55	66,67	11,25	9,23	87,37	55,63	0,80	1,14
CPCV	50,00	81,25	18,75	50,00	0,00	0,00	100,00	81,25	2,67	0,62
BSQV	50,00	80,63	19,38	50,00	0,00	0,00	100,00	80,62	2,58	0,62
ROCV	0,00	72,33	26,67	100,00	0,63	0,00	99,14	71,88	0,00	1,38

%- Percentual; SENS.-Sensibilidade; ESP.-Especificidade; FP-Falso Positivo; FN- Falso Negativo; PREV. Prevalência; VPTP- Valor preditivo do teste positivo; VPTN- Valor preditivo do teste negativo; ACUR. – Acurácia; LR POS- Likelihood ratio positivo; LR NEG- Likelihood ratio negativo; EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

ANEXOS

**ANEXO A- CÓPIA DA AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO IEC**



Parecer de Aprovação N° 054/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - N° 0065/2009

Ananindeua/PA, 27 de novembro de 2009.

Projeto: “Soroprevalencia de anticorpos, padronização do teste ELISA sanduíche indireto para 19 arbovírus em herbívoros domésticos e caracterização genética do *virus Tacaiuma*”.


Pesquisador Responsável: ALEXANDRE DO ROSÁRIO CASSEB

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,



NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

ANEXO B- PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS UTILIZADOS NA TÉCNICA DE IH E ELISA PELA TÉCNICA DE SUCROSE-ACETONA E SOROVÍRUS:

1- **TÉCNICA DE SUCROSE-ACETONA:** Esta técnica é utilizada para a obtenção de antígenos dos *Flavivirus* (BSQV, CPCV, ILHV, SLEV, ROCV, YFV; *Orthobuynavirus* (TCMV, MAGV, GROV, UTIV e BLMV) e *Phlebovirus* (ICOV).

Camundongos recém-nascidos (1-2 dias de idade) são inoculados por via intracerebral com 0,02 mL de uma suspensão de cérebro de camundongo infectado em determinado arbovírus, na diluição 1:10 em solução tamponada de albumina bovina 0,75%. Os camundongos inoculados são examinados duas vezes ao dia, para observar sinais de doença. Quando a maioria dos camundongos apresentarem tais sinais, eles são sacrificados. Os cérebros são removidos assepticamente e colocados em uma placa de pétri e guardados a -70° C, até o preparo do antígeno. O camundongo inteiro também pode ser guardado a -70° C e o cérebro removido no dia do preparo do antígeno. O recipiente contendo os cérebros é pesado, e o peso anotado. Transferir o tecido para o recipiente onde irá ser homogeneizado. O recipiente é pesado novamente e o peso dos cérebros coletados é determinado pela diferença. Quatro volumes de solução aquosa de sucrose a 8,5% são acrescentados e os cérebros são homogeneizados (ex.: 2 gramas de cérebro + 8 mL de sucrose 8,5%). Adicionar lentamente o homogeneizado a 20 volumes de acetona fria, (ex.: 10 mL do homogeneizado 200 mL de acetona) com o uso de seringa e agulha n° 18. Deixar 5 minutos no frio (banho de gelo ou refrigerador). Decantar o sobrenadante e adicionar o mesmo volume de acetona. Agitar vigorosamente e deixar uma hora a frio. Decantar o

sobrenadante. Secar por 1 hora à temperatura ambiente em uma bomba de vácuo. Hidratar o antígeno com NaCl a 0,85% (com um volume igual a duas vezes o peso em gramas o cérebro; por exemplo, 4 gramas de cérebro para 8 mL de NaCl a 0,85%). O sedimento deve se dissolver em 1-2 horas, mas é preferível deixar durante a noite a 4° C, para completa hidratação. A solução é então centrifugada a frio (10000 rpm /60 min) e o sobrenadante é o antígeno que deve ser testado para reatividade HA. Esse é um antígeno infeccioso e deve ser manuseado como tal. Se o ensaio é satisfatório, o antígeno é inativado. Preparar uma solução de betapropiolactona a 1% em água gelada. Adicionar a betapropiolactona a 1% ao antígeno para dar uma concentração final de 0,3%. Misturar bem, e deixar a 4° C por 18 horas. Remover uma quantidade para teste e o restante guardar em alíquotas de 1,0 mL a - 70° C ou liofilizar e guardar a - 20° C. O teste de infectividade por inoculação intracerebral em camundongos de 2-3 dias deve incluir antígeno não diluído e diluições seriadas (10 vezes). O antígeno não deve ser infeccioso após tratamento por betapropiolactona.

2- **TÉCNICA DE SOROVÍRUS:** Esse procedimento é realizado para os vírus que apresentam um período de incubação rápido (entre 12 a 48 horas), assim encontramos os vírus no soro do animal, como: *Alphavirus* (EEEV, WEEV, MAYV e MUCV) e *Orhtobuynavirus* (CARV, CATUV, OROV).

Inocular em camundongos albinos suíços recém nascidos via intracerebral, o sorovírus diluído a 1: 10 em penicilina e estreptomicina. Usar uma média de 20 gaiolas com seis camundongos cada. Esperar que os camundongos adoeçam; Coletar o sangue em um tubo. Repetir o procedimento

para todos os animais; Centrifugar o tubo a 3.000 rpm por 10 minutos para separar o soro e transferi-lo para outro tubo; Distribuir 0,1 mL do sorovírus em tubos de vidro 16/100, tendo o cuidado de guardar uma quantidade para novas passagens; Colocar 0,3 mL de solução de NaCl 0,85% em cada tubo; Colocar 8 mL de acetona gelada, tampar com rolha de borracha e agitar bem; Deixar na geladeira por 5 minutos; Centrifugar por 1 minuto a 2.000 rpm a 4°C; Desprezar o sobrenadante e desprender o *pellet* agitando; Colocar novamente 8 mL de acetona gelada, tampar e agitar; Deixar na geladeira por 1 hora; Centrifugar por 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C; Desprezar o sobrenadante e desprender o pellet agitando; Levar para a bomba de vácuo para secar por 1 hora; Hidratar o material com 0,5 mL de solução borato salina pH 9,0; Armazenar a temperatura de – 70°C. Observação: Para o OROV é necessária a adsorção com hemácias na quantidade de 0,1 mL.

Fonte: Casals & Brown (1954), Clarke & Casals (1958).

**ANEXO C- TEMPERATURAS E PH PARA TESTE DE IH CONFORME O
TIPO DE ARBOVÍRUS E CEPA VIRAL**

ARBOVÍRUS	CEPA	PH	TEMPERATURA
EEEV	Be AN 7526	6,2	37°C
WEEV	Be AN 70100	6,2	37°C
MAYV	Be AR 20290	6,2	37°C
MUCV	Be AN 10967	6,2	37°C
GROV	Be H 22063	6,2	37°C
MAGV	Be AR 7272	6,1	37°C
TCMV	Be AN 73	6,1	37°C
YFV	Be H 111	6,4	37°C
ILHV	Be H 7445	6,4	37°C
ICOV	Be AN 24262	6,4	37°C
UTIV	Be AN 84785	6,4	37°C
SLEV	Be AR 23379	6,8	37°C
CPCV	Be AN 327600	7,0	TA
BSQV	Be AN 4116	6,8	TA
ROCV	SP H 34675	6,4	TA
BLMV	Be AN 141106	6,0	TA
CARV	Be AN 3994	6,0	TA
VORO	Be AN 19991	6,0	TA
CATUV	Be H 151	6,0	TA

AN-Animal, AR-Artrópode, H-Humano. Be-Belém, SP-São Paulo, TA- Temperatura Ambiente, EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*; WEEV- *Western equine encephalitis virus*; MAYV- *Mayaro virus*; MUCV- *Mucambo virus*; YFV- *Yellow fever virus*; ILHV- *Ilheus virus*; SLEV- *Saint Louis encephalitis virus*; CPCV- *Cacipacore virus*; BSQV- *Bussuquara virus*; ROCV- *Rocio virus*; GROV- *Guaroa virus*; MAGV- *Maguari virus*; TCMV- *Tacaiuma virus*; ICOV- *Icoaraci virus*; UTIV- *Utinga virus*; BLMV- *Belem virus*; CARV- *Caraparu virus*; OROV- *Oropouche virus*; CATUV- *Catu virus*.

Fonte: Clarke & Casals, 1958, Travassos da Rosa *et al.*, 1994.

ANEXO D- REATIVOS E SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE IH

ALBUMINA BOVINA A 0,75% EM PBS

NaCl	7,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ .	13,6 g
Albumina Bovina	7,5 g
Água milli-Q ou destilada	100 mL

ACD (ANTI-COAGULANTE)

Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	4,0 g
Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ . H ₂ O)	11,26 g
Dextrose	11,0 g
Água milli-Q ou destilada	500 mL

VERONAL (SOLUÇÃO ESTOQUE - 5X CONCENTRADA)

Ácido Barbital	2,88 g
Barbital sódio	1,88 g
Cloreto de sódio	42,5 g
Cloreto de Magnésio	0,84 g
Cloreto de cálcio	0,14 g
Água milli-Q ou destilada	1000 mL

DGV

Dextrose	10,0 g
Salina veronal 5 x concentrada	200 mL
Gelatina	0,6 g
Água milli-Q ou destilada	1000 mL

ANEXO E- PREPARAÇÃO DE FAI

Preparar uma suspensão de cérebro de camundongo infectado na proporção de 1: 10 em solução de Cloreto de Sódio 0,85%. Inocular 0,2 mL da suspensão viral por via intraperitoneal nos camundongos jovens (21 dias de idade) (1ª dose). No intervalo de cada sete dias, repetir o procedimento até a 4ª dose. No terceiro dia após a 4ª dose, aplicar 0,2 mL de uma suspensão 1:5 de sarcoma murino. Três dias após a aplicação do sarcoma, aplicar a 5ª dose. Esperar que os camundongos apresentem dilatação abdominal evidente (ascite), o que ocorre por volta do 13º dia. Coletar o fluido ascítico do abdômen do animal com a seringa e agulha. Centrifugar o fluido ascítico a 2.000 rpm por 5 minutos. Coletar o sobrenadante, identificar e armazenar a temperatura de – 20°C.

Fonte: Clarke & Casals, 1958.

ANEXO F- SOLUÇÕES E REAGENTES PARA O TESTE DE ELISA**PBS PH 7.4 TWEEN 20 0,1% (TAMPÃO DE LAVAGEM)**

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2.9 g
Água milli-Q ou destilada	1000 mL
Tween 20	1 mL

TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO PH 9,6:

H ₂ O destilada q.s.p	100 mL
Na ₂ CO ₃	0.159 g
Na ₂ HCO ₃	0.239 g

LEITE DESNATADO (*FAT FREE*) 5% EM PBS PH 7.4 COM TWEEN-20 0,05%

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2.9 g
Água milli-Q ou destilada	1000 mL
Tween 20	.5 mL
Leite desnatado (<i>fat free</i>)	5 g