

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

ANA CAROLINA BERNARDES TERZIAN

**“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES BRASILEIRAS EM
SOROS DE PACIENTES COM DOENÇA FEBRIL AGUDA”**

São José do Rio Preto-SP

Terzian, Ana Carolina Bernardes.

Diagnóstico molecular de arboviroses brasileiras em soros de pacientes com doença febril aguda / Ana Carolina Bernardes Terzian. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Co-orientador: Roberta Vieira de Moraes Bronzoni

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Vírus - Classificação. 2. Arbovíroses - Diagnóstico. 3. Arbovirus. I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Bronzoni, Roberta Vieira de Moraes. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 578

ANA CAROLINA BERNARDES TERZIAN

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES BRASILEIRAS EM
SOROS DE PACIENTES COM DOENÇA FEBRIL AGUDA**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Professor Doutor

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Livre Docente

Universidade São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Irineu Luiz Maia

Professor Doutor

FAMER- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 25 de Abril de 2008

*De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que precisamos continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção, um novo caminho
Da queda, uma escada
Do sonho uma ponte
Da procura, um encontro*

(Fernando Pessoa)

Dedicatória.....	<i>i</i>
Agradecimentos.....	<i>ii</i>
Lista de Figuras.....	<i>iv</i>
Lista de Tabelas.....	<i>v</i>
Lista de Gráficos.....	<i>vi</i>
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	<i>vii</i>
Resumo.....	<i>xi</i>
Abstract.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	<i>02</i>
1.1. Considerações gerais.....	<i>02</i>
1.2. Arboviroses.....	<i>04</i>
1.2.1. Família <i>Togaviridae</i> - Gênero <i>Alphavirus</i>	<i>04</i>
1.2.2. Família <i>Flaviviridae</i> - Gênero <i>Flavivirus</i>	<i>07</i>
1.2.3. Família <i>Bunyaviridae</i> – Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	<i>14</i>
1.3. Diagnóstico Laboratorial.....	<i>16</i>
2. OBJETIVO.....	<i>22</i>
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	<i>24</i>
3.1. Amostras clínicas.....	<i>24</i>
3.1.1. Amostras de São José do Rio Preto (SP).....	<i>24</i>
3.1.2. Amostras de Acrelândia (AC).....	<i>24</i>
3.2. Vírus.....	<i>25</i>
3.3. Extração de RNA.....	<i>26</i>
3.4. Estratégia de estudo.....	<i>26</i>

3.4.1. Primers.....	28
3.4.2. <i>Duplex</i> -RT-PCR para detecção de <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	30
3.4.3. <i>Multiplex-Nested</i> -PCR para identificação de <i>Alphavirus</i>	30
3.4.4. <i>Multiplex-Nested</i> -PCR para identificação de <i>Flavivirus</i>	31
3.4.5. <i>Nested</i> -PCR para identificação de <i>Flavivirus</i>	31
3.4.6. RT- <i>Nested</i> -PCR para a identificação do vírus Oropouche.....	31
3.5. Isolamento Viral.....	34
3.6. <i>Nested</i> -RT-PCR para amplificação do Gene do Envelope (E).....	34
3.7. Sequenciamento nucleotídico.....	35
3.8. Análise Filogenética.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Diagnóstico Molecular das Arboviroses em amostras de São José do Rio Preto.....	39
4.1.1. Análise Epidemiológica das amostras de São José do Rio Preto.....	40
4.2. Diagnóstico Molecular das Arboviroses em amostras de Acrelândia.....	44
4.3. Isolamento Viral.....	45
4.4. Sequenciamento Nucleotídico.....	45
4.5. Análise Filogenética do isolado SLEV SJRP06/155.....	46
4.6. Análise Filogenética do OROV Acre27.....	49
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	66

DEDICATÓRIA

À minha família:

Paulo, Lucy, Paul, Ana Lu,

Ao meu avô Jorge Terzian,

À Kika, Hanna, Nina, os papagaios, piriquitos e os jabutis,

Que sempre esteve, está e estará presente em todos os

momentos, principalmente nos bons.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira pela oportunidade, incentivo e confiança no meu trabalho. É imenso o meu respeito por você.
- ❖ À minha co-orientadora Prof. Dra. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni por seus princípios, paciência e pelos ensinamentos de que sempre devemos fazer o nosso melhor. E até pelas “brincas”.
- ❖ Às minhas grandes amigas Carol e Gislaine pela amizade, apoio e ajuda na bancada quando cheguei no laboratório. Pelas conversas, risadas, brigadeiros e cachorros-quentes.
- ❖ Ao amigo Adriano pela ajuda na realização e correção deste trabalho. E também pelas risadas e brincadeiras.
- ❖ À Família Pacca: Seu Miro, D. Hêlo, Felipe, Juliana pela amizade e pelos vários almoços e churrascos que me proporcionaram.
- ❖ Aos amigos que indiretamente participaram comigo desta conquista Juliana Carmona, Aninha Cecília, Bruno, Cidão, Gilmar, Guilherme, Carlim, Ingrid, Luciana e todos os outros aqui não mencionados, obrigada por me incentivarem e por fazerem parte da minha vida.

- ❖ Aos professores da Pós-Graduação em Microbiologia pelo ensinamento, especialmente a Prof. Dra. Paula Rahal pelas palavras de amizade e confiança e pelo “puxão-de-orelha”. Essa lição carregarei para sempre.
- ❖ Aos companheiros do laboratório de Virologia, Fernanda, Vinícius, Milena, Gisele, Bianca, Thayza, Vanessa, Adriana, Carol Viegas, pelos momentos a agradáveis.
- ❖ Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (USP-Ribeirão Preto) por ter gentilmente fornecido os vírus usados neste projeto.
- ❖ Ao Depto.de Biologia da Faculdade de Marília pela parceria e enviou das amostras de Acrelândia.
- ❖ Ao Prof. Francisco Chiaravalloti Neto pela colaboração na análise dos resultados epidemiológicos.
- ❖ À Prof. Dra. Betânia Drumond (Universidade Estadual de Montes Claros) pela realização da análise filogenética.
- ❖ À Fapesp pelo financiamento deste projeto.
- ❖ Ao Laboratório de Pesquisas em Virologia – FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.
- ❖ À Deus, por tudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da metodologia aplicada às amostras provenientes de São José do Rio Preto (SP).....	32
Figura 2.	Fluxograma esquemático da metodologia aplicada as amostras provenientes de Acrelândia (AC).....	33
Figura 3.	Eletroforese em gel de agarose dos <i>amplicons</i> obtidos na <i>Multiplex-Nested-PCR</i> para detecção de <i>Flavivirus</i> em amostras clínicas de pacientes de São José do Rio Preto.....	40
Figura 4.	Eletroforese em gel de agarose dos <i>amplicons</i> obtidos na <i>Multiplex-Nested-PCR</i> para detecção arbovírus em amostras clínicas de pacientes de Acrelândia.....	45
Figura 5.	Eletroforese em gel de agarose dos <i>amplicons</i> do gene E obtido na <i>Multiplex-Nested-PCR</i>	46
Figura 6.	Árvore filogenética derivada de seqüências do gene da proteína E de SLEV.....	48
Figura 7.	Árvore filogenética derivada de seqüências do gene S do OROV.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação das estirpes de arbovírus brasileiros utilizadas no estudo como controles positivos.....	26
Tabela 2.	Relação dos arbovírus brasileiros pesquisados.....	27
Tabela 3.	<i>Primers</i> utilizados no estudo.....	29
Tabela 4.	Relação das amostras de Dengue enviadas pela Secretaria Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e diagnosticados por RT-PCR e dos casos positivos para arbovírus por semana de estudo, no período de maio a julho de 2006.....	41
Tabela 5.	Seqüências de SLEV analisadas no presente estudo.....	47
Tabela 6.	Seqüências de OROV analisadas no presente estudo.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Distribuição das amostras clínicas de São José do Rio Preto positivas para *Flavivirus*..... **39**
- Gráfico 2.** Relação dos casos totais de Dengue notificados pela Secretária Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP), amostras testadas por RT-PCR e amostras positivas por semana de estudo, no período de maio a julho de 2006..... **42**
- Gráfico 3.** Relação das amostras diagnosticadas para arbovírus por RT-PCR enviadas pela Secretária Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e as amostras positivas, por faixa etária, no período de maio a julho de 2006..... **43**
- Gráfico 4.** Relação das amostras diagnosticadas para arbovírus por RT-PCR enviadas pela Secretária Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e as amostras positivas, de acordo com o sexo, no período de maio a julho de 2006..... **43**
- Gráfico 5.** Representação das amostras clínicas positivas de Acrelândia para arbovírus..... **44**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μM	Micromolar
μl	Microlitro
μL	Micrograma
6Ks	Polipeptídeo 6Ks
AC	Acre
BSQV	Vírus Bussuquara
C	Proteína do capsídeo viral
CAB	Vírus Cabassou
CACV	Vírus Caciporé
cm^2	Centímetro quadrado
DENV	Vírus Dengue
DENV-1	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus Dengue sorotipo 4
DF	Febre do Dengue
DHF	Febre do Dengue Hemorrágico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	DeoxynucleosideTriphosphate
D-RT-PCR	<i>Duplex</i> -RT-PCR
DSS	Síndrome do Choque do Dengue
DTT	Dithiothreitol
E	Proteína do envelope viral
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Proteína 1 do envelope viral
E2	Proteína 2 do envelope viral
E3	Polipeptídeo E3

EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EEEV	Vírus da Encefalite Equina do Leste
ELISA	Ensaio Imuno-Enzimático
G1	Proteínas G1 do envelope viral
G2	Proteínas G2 do envelope viral
GC	Guanina-citosina
hab	Habitantes
HCl	Ácido Clorídrico
HI	Inibição da Hemaglutinação
IGUV	Vírus Iguape
ILHV	Vírus Ilhéus
IV	Isolamento Viral
KCl	Cloreto de Potássio
L	Transcriptase
L	Segmento <i>Large</i> (Grande)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LPV	Laboratório de Pesquisa em Virologia
<i>M</i>	Segmento <i>Medium</i> (Médio)
M	Molar
MAYV	Vírus Mayaro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-N-PCR	Multiplex-Nested-PCR
MUC	Vírus Mucambo
N	Nucleocapsídeo
NaCl	Cloreto de Sódio

ng	Nanograma
nm	Nanômetro
N-PCR	Nested-PCR
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A
NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5	Proteína não-estrutural 5
NSm	Proteína não-estrutural m
nsP1	Proteína não-estrutural P1
nsP4	Proteína não-estrutural P4
NSs	Proteína não-estrutural s
°C	Graus Celsius
OROV	Vírus Oropouche
pb	Pares de base
PCR	Reação de cadeia em Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIX	Vírus Pixuna
prM	Proteína precursora da proteína M
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROCV	Vírus Rocio
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
S	Segmento <i>Small</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SLEV	Vírus Saint Louis
SOC	Meio de cultura enriquecido para crescimento bacteriano

SP	São Paulo
U	Unidade
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV	Vírus da Encefalite Equina do Oeste
WNV	Vírus West Nile
YFV	Vírus da Febre Amarela

RESUMO

As arboviroses freqüentemente são associadas com surtos nos seres humanos e representam um sério problema de saúde pública, com impactos econômico e social. Entre os arbovírus brasileiros, os vírus Mayaro (MAYV), Dengue (DENV), Febre Amarela (*Yellow Fever* – YFV), Rocio (ROCV) e Oropouche (OROV) são responsáveis por mais de 95% dos casos de arboviroses humanas no Brasil, causando muitas vezes a mesma sintomatologia clínica, especialmente na fase aguda das infecções. Este estudo teve como objetivo analisar a presença de arbovírus em soros de pacientes com doença febril aguda, durante epidemia de Dengue no município de São José do Rio Preto (SP), bem como de pacientes com doença febril aguda, negativos para Malária e arbovírus do município de Acrelândia (AC). Foi utilizada a técnica de RT-*Nested*-PCR para a detecção e identificação dos principais arbovírus brasileiros pertencentes aos gêneros *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*. Na análise molecular das amostras de São José do Rio Preto, 320 (98%) foram positivas para DENV-3, 3 (1%) para DENV-2, 6 (2%) para o SLEV. Uma destas amostras apresentou co-infecção por DENV-2 e DENV-3 e três amostras apresentaram co-infecção por DENV-3 e SLEV. A alta positividade para o DENV-3 está relacionada com a introdução deste sorotipo no município. Em amostras de Acrelândia, 5 positivas para DENV-3, 1 para MAYV e 2 positivas para OROV. A análise filogenética do gene do envelope mostrou que a amostra isolada de SLEV agrupou-se próxima às estirpes de Belém, que pertencem ao genótipo V. A amostra de OROV agrupou-se ao genótipo I, sendo este o mais distribuído na região Amazônica. Estes dados indicam a circulação de diferentes arbovírus em duas regiões distintas do Brasil e demonstram a necessidade de um sistema de vigilância eficiente para controlar a disseminação destes na população.

Palavras-chaves: arbovírus, doença febril aguda, RT-*Multiplex-Nested*-PCR, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Arboviruses are frequently associated with outbreaks in humans and represent a serious public health problem, with economic and social impacts. Among the Brazilian arboviruses, Mayaro virus (MAYV), Dengue virus (DENV), Yellow Fever virus (YVF), Rocio virus (ROCV) and Oropouche virus (OROV) are responsible for more than 95% of human cases in Brazil. These arboviruses usually present the same clinical symptoms, especially on the acute phase of infection. The aim of this study was to investigate the presence of arboviruses in serum of patient presenting acute febrile illness, during a dengue outbreak in the city of São José do Rio Preto (state of São Paulo) and the serum of patients who were tested negatively for malaria and arboviruses in the city of Acrelândia (state of Acre). The RT-*Nested*-PCR technique was applied to detect and to identify the main brazilian arboviruses, especially in *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus* genera. The molecular analysis in the samples of São José do Rio Preto samples showed that 320 (98%) were positive for DENV-3, 3 (1%) to DENV-2, 6 (2%) to SLEV. Among the positive samples, one presented coinfection with DENV-2 and DENV-3 and three presented coinfection with DENV-3 and SLEV. The high positivity of DENV-3 is associated with the introduction of a new DENV serotype in the city. In the samples from Acrelândia, 5 were positive to DENV-3, 1 to MAYV and 2 positive to OROV. The phylogenetic analysis of the envelope gene from a positive SLEV sample indicated that the virus circulating in São José do Rio Preto is most related to strains from Belém, which belong to lineage V. The OROV belongs to lineage I, the most widespread in Amazon region. These results indicate the circulation of different arboviruses in two distinct regions of Brazil and they demonstrate the need of an efficient surveillance system to control the dissemination of these arbovirus in the population.

Key words: arbovirus, acute febrile illness, RT-*Multiplex-Nested*-PCR, molecular diagnostic.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

As arboviroses são doenças causadas por arbovírus, que são vírus transmitidos entre hospedeiros vertebrados suscetíveis a artrópodes hematófagos. As arboviroses são freqüentemente associadas a surtos em seres humanos e representam um problema sério de saúde pública. Apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, mas estão presentes predominantemente nos trópicos, devido às condições climáticas favoráveis à manutenção do ciclo viral. O Brasil é um país tropical que apresenta condições ideais para a ocorrência de arboviroses por apresentar grande extensão territorial (8.514.876 km²) e mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais. Mais de 210 espécies diferentes de arbovírus foram isoladas no país, sendo que 36 delas causam doenças em humanos de forma esporádica, endêmica e/ou epidêmica. A maioria destes vírus pertence às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*). Alguns representantes destas famílias, como os vírus Mayaro (MAYV), Dengue (DENV), Febre Amarela (*Yellow Fever* – YFV), Rocio (ROCV) e Oropouche (OROV), têm sido responsáveis por mais de 95% dos casos de arboviroses humanas no Brasil (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005; Figueiredo, 2007).

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre através de ciclos silvestres complexos com participação de espécies de vertebrados silvestres (aves, roedores, marsupiais, primatas, morcegos, répteis e outros) e artrópodes hematófagos (mosquitos, carrapatos, ácaros, simulídeos e tabanídeos), porém, podem passar despercebidos. O homem é hospedeiro acidental para a maioria das arboviroses e se infecta ao penetrar em áreas enzoóticas, com exceção apenas para o vírus do Dengue, em que é o hospedeiro

principal (Nathanson, 2007). Por outro lado, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus levam a alterações em seus ciclos, podendo haver adaptação a novos reservatórios e, com isto, aumentar sua multiplicação e o risco da emergência (Figueiredo, 2007; Peters, 2007). Outro mecanismo para manutenção dos arbovírus nesses vetores é a transmissão transovariana, como ocorre com os vírus da Encefalite Japonesa, Febre Amarela e Dengue (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005), entretanto este modo de transmissão não é tão expressivo na disseminação dos arbovírus (Nathanson, 2007).

No homem, após a picada de um vetor infectado, o vírus é transmitido para a corrente sangüínea e circula livremente até atingir células alvos (cérebro, fígado, pele e vasos). Após a infecção, há um período de incubação durante o qual ocorre multiplicação viral, e sua intensidade e a sua localização determinarão o aparecimento de manifestações clínicas, como febre acompanhada de mal-estar, cefaléia, náuseas, vômitos e mialgia. Neste estágio, a doença pode terminar ou exibir manifestações hemorrágicas secundárias. De uma forma geral, infecções por arbovírus podem levar a quatro formas clínicas distintas, dentre as quais se destaca a doença febril (causada por praticamente todos os arbovírus patogênicos ao homem), doença febril com exantema, febre hemorrágica (no Brasil, causada apenas pelos vírus do Dengue e Febre Amarela) e encefalite (causada por diversos membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, e *Bunyaviridae*). No entanto, sintomatologia inespecífica pode ser observada nas infecções por diferentes arbovírus, especialmente na fase aguda, dificultando o estabelecimento de um provável agente etiológico pelo médico assistente (Fonseca, 2002.; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005).

1.2. Arboviroses

1.2.1. Família *Togaviridae* - Gênero *Alphavirus*

Os vírus deste gênero medem 70 nm de diâmetro, apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, circundado por envoltório constituído de espículas em sua superfície. O genoma viral é constituído de RNA de fita única, linear, de polaridade positiva com aproximadamente 11700 nucleotídeos distribuídos por oito genes, os quais codificam proteínas não-estruturais (nsP1 a nsP4) que estão envolvidas na replicação viral e proteínas estruturais do envoltório (glicoproteínas E1 e E2), do capsídeo, além de pequenos polipeptídeos E3 e 6Ks. Os *Alphavirus* se ligam a receptores específicos expressos em muitos tipos celulares de várias espécies, mas cada um apresenta tropismo tecidual diferente, o que causa diferentes manifestações da doença (Murray, 2006).

A proteína do capsídeo interage com o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral e desta forma estimular a síntese do RNA (Strauss e Strauss, 1994; Kuhn, 2007). As proteínas E1 e E2 estão envolvidas no processo de entrada no vírus na célula hospedeira, sendo a E1 responsável pela fusão na membrana celular do hospedeiro. A proteína E2 carrega os principais epítomos neutralizantes e se liga aos receptores celulares (Kuhn, 2007).

A glicoproteína 6Ks funciona como peptídeo-guia para a proteína E1 intensificando o poder de infectividade da partícula viral. A glicoproteína E3 funciona como peptídeo-guia para a proteína E2, formando assim o complexo pE2 (Kuhn, 2007).

A proteína nsP1 é a única das proteínas não-estruturais que interage com membranas (Zusinaite, Tints *et al.*, 2007) desempenhando função de metiltransferase, guaniltransferase e de modulação da atividade de protease da proteína nsP2 (Strauss e Strauss, 1994; Kuhn, 2007).

A proteína não-estrutural nsP2 apresenta duas funções distintas, sendo estas de helicase na porção N-terminal e de protease na porção C-terminal responsável por processar a poliproteína não-estrutural (Strauss e Strauss, 1994; Kuhn, 2007).

A função da proteína nsP3 na replicação viral é desconhecida, entretanto, parece ser importante na síntese da fita negativa. A proteína nsP4 tem função RNA polimerase RNA-dependente (Kuhn, 2007).

Dentre os *Alphavirus* de importância no Brasil, o vírus Mayaro (MAYV) é responsável por causar a Febre do Mayaro, e os vírus da Encefalite Equina Venezuelana (*Venezuelan Equine Encephalitis* – VEEV), da Encefalite Equina do Leste (*Eastern Equine Encephalitis* – EEEV) e da Encefalite Equina do Oeste (*Western Equine Encephalitis* – WEEV) são causadores das Encefalites Equinas.

No Brasil, o MAYV ocorre na região Central e Amazônica, onde o principal vetor, *Haemagogus janthinomys*, é encontrado em abundância. Os primatas não-humanos, bem como aves silvestres, atuam, respectivamente, como hospedeiro primário e secundário, desempenhando papel fundamental na manutenção e disseminação do vírus (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1998). Desta forma, existe a possibilidade de o vírus MAY vir a causar grandes epidemias urbanas, pois se acredita que possa ser transmitido pelo mosquito *Ae. aegypti*, amplamente disseminado nas cidades brasileiras (Travassos Da Rosa, 1997). O homem parece ser amplificador na transmissão do MAYV durante epidemias, pois enquanto a quantidade de vírus necessária para infectar o vetor não é estabelecida, parece que o homem pode circular com o vírus em quantidade suficiente para infectar alguns vetores (Coimbra, Santos *et al.*, 2007).

Infecções pelo vírus MAY já foram descritas em países como Trinidad (Anderson, Downs *et al.*, 1957), Bolívia (Schaeffer, 1959), Guiana Francesa (Talarmin, 1981) e Brasil (Causey, 1957; Pinheiro, Freitas *et al.*, 1981). Em 1979, durante uma epidemia em Belterra, Pará, o vírus foi isolado em 43 pacientes (Pinheiro, Freitas *et al.*,

1981). Em 2000, no estado de São Paulo, este vírus foi isolado de um paciente que havia realizado pescaria no estado do Mato Grosso do Sul (Coimbra, Santos *et al.*, 2007). A febre do Mayaro é doença aguda que cursa com febre, cefaléia, mialgia, artralgia, e artrite e exantema em casos mais graves (Figueiredo, 2007).

As encefalites eqüinas causam epizootias em eqüinos domésticos e surtos de doença febril aguda ou meningoencefalites em seres humanos (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1998).

O complexo VEE é formado pelos subtipos I a VI: VEE (subtipos I e II), Mucambo (MUC, subtipo III), Pixuna (PIX, subtipo IV), Cabassou (CAB, subtipo V) e Rio Negro (subtipo VI). No Brasil, roedores silvestres são os principais hospedeiros deste vírus, além de morcegos, aves silvestres e marsupiais atuarem como hospedeiros secundários. Os mosquitos do gênero *Culex* podem estar envolvidos na transmissão do vírus ao homem. Nenhum caso humano de encefalite, causada por estes vírus, foi registrado no país, tendo sido observados apenas casos de doença febril aguda, apesar da alta prevalência de anticorpos entre moradores das regiões Amazônica e Mata Atlântica (Iversson, 1990.; Vasconcelos, Da Rosa *et al.*, 1991). Por outro lado, surtos ocorrem periodicamente em alguns países da América Central, México, Venezuela e Estados Unidos, causando grande problema econômico, social e para saúde pública (Osorio, 1997; Navarro, Medina *et al.*, 2005).

O vírus EEE está amplamente distribuído nas Américas. No Brasil, já foi isolado em eqüinos localizados nos estados do Amazonas, Pará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (Kotait, 2006). Os eqüinos, aves silvestres e os vetores *Culex pedroi* e *Aedes taeniorhynchus* desempenham importante função na manutenção destes vírus (Brault, Powers *et al.*, 1999), os quais causam desde doença febril aguda a casos fatais de encefalite em seres humanos (30-50%), além de determinar alta morbidade e mortalidade em eqüinos (50-90%) (Alice, 1956;

Vasconcelos, Da Rosa *et al.*, 1991; Figueiredo, 1994; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1998; Aguilar, Robich *et al.*, 2007).

O vírus WEE é causador de encefalite no homem e em eqüinos, principalmente na América do Norte, onde causa epidemias esporádicas (Griffin, 2007). No Brasil, apenas um caso foi relatado da doença em seres humanos (Vasconcelos, Da Rosa *et al.*, 1991). Alguns isolamentos foram realizados em aves silvestres, as quais parecem desempenhar papel importante no ciclo de manutenção destes vírus, apresentando viremia com títulos altos, suficientes para infectar vetores, principalmente do gênero *Culex*. Humanos e eqüinos são hospedeiros acidentais e apresentam viremia com títulos baixos (Figueiredo, 1994; Kotait, 2006).

1.2.2. Família *Flaviviridae* - Gênero *Flavivirus*

Os *Flavivirus* são vírus esféricos, envelopados, com 40 a 60 nm de diâmetro e possuem projeções na superfície do envoltório. Apresentam fita de RNA única, de polaridade positiva com dez genes, 5' –C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'; os quais codificam três proteínas estruturais (E, prM, C) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Fonseca e Figueiredo, 2005.). As funções de todas as proteínas virais ainda não foram totalmente estabelecidas, mas sabe-se que as proteínas estruturais são incorporadas ao *virion* durante a maturação e liberação viral e as proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação nas células infectadas (Monath, 2001).

A proteína E é responsável pela ligação do vírus na célula, bem como pela fusão com a membrana endossomal, sendo o maior determinante antigênico viral (Chambers, Hahn *et al.*, 1990; Knipe, 2007).

A proteína C forma o núcleocapsídeo viral e está envolvida no transporte da proteína prM (precursora da proteína M) ao retículo endoplasmático para ser glicosilada (Chambers, Hahn *et al.*, 1990; Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

A proteína M é formada a partir do processamento de sua precursora prM, sendo uma proteína de membrana de partículas virais maduras (Chambers, Hahn *et al.*, 1990; Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

A proteína NS1, embora com função desconhecida, participa de forma essencial na replicação do RNA viral, pois estudos de mutagêneses em NS1 causaram diminuição drástica na replicação do RNA e produção viral (Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

A NS2A participa na replicação viral e pode estar associada à inibição de interferon (Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007). NS2B forma um complexo estável com a proteína NS3, agindo como um co-fator para a atividade serino-protease (Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

A proteína NS3 é altamente conservada entre os *Flavivirus*. É uma proteína multifuncional, pois tem atividade de serino-protease na sua porção aminoterminal, é uma RNA-helicase RNA-dependente, além disso, codifica uma atividade de RNA trifosfatase com o propósito de defosforilar a região 5' terminal do genoma do RNA antes da adição da CAP (Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

As proteínas NS4A e B são hidrofóbicas, associadas à membrana e pouco conservadas entre os *Flavivirus*. Acredita-se que são componentes da replicase por formarem complexos com NS2B e NS3 (Chambers, Hahn *et al.*, 1990; Vasconcelos, 2003; Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

A proteína NS5 é a maior das proteínas virais e altamente conservada entre os *Flavivirus*. Apresenta atividade de RNA polimerase RNA-dependente na região

carboxi-terminal e metiltransferase em sua porção aminoterminal (Chambers, Hahn *et al.*, 1990; Vasconcelos, 2003; Lindenbach, Thiel *et al.*, 2007).

O gênero *Flavivirus* é composto por 73 vírus distribuídos mundialmente, sendo que 43 destes estão associados a doenças humanas, entre elas, o Dengue, Febre Amarela, Complexo Encefalite por picada de carrapato e Encefalite Japonesa são as mais importantes no mundo por causar alta taxa de morbidade e mortalidade (Burke e Monath, 2001).

No Brasil já foram isolados os *Flavivirus* da Febre Amarela (*Yellow Fever Virus* – YFV), do Dengue (DENV) 1, 2, 3 e 4, Encefalite de Saint Louis (*Saint Louis Encephalitis* - SLEV), Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Bussuquara (BSQV), Iguape (IGUV) e Cacipacaré (CACV). Muitos destes vírus são zoonóticos no meio silvestre e podem, eventualmente, infectar o homem, como os vírus YF, SLE, ROC, ILH e BUS (Degallier, 1998).

O YFV é o protótipo do gênero *Flavivirus*, o agente causador da Febre Amarela, a qual se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de importante impacto para a saúde pública. No Brasil, o YFV é mantido em ciclo silvestre caracterizado por epizootias entre as espécies de primatas não-humanos, considerados os principais hospedeiros vertebrados. O mosquito *Haemagogus janthinomys* é o principal transmissor e os mosquitos do gênero *Sabethes* são considerados vetores secundários. No ciclo urbano, como ocorre com o Dengue, o vírus é transmitido diretamente ao homem pela picada do mosquito *Ae. aegypti* (Figueiredo e Fonseca, 2005; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005).

A infecção pelo YFV pode ser assintomática, causar doença febril aguda branda ou moderada e casos graves de febre hemorrágica cursando com falência hepática, insuficiência renal e morte (Fonseca, 1996).

Com o melhoramento da infra-estrutura urbana, nas primeiras décadas do século XX, aliado às medidas de combate ao vetor e ao advento da vacina anti-amarílica, em 1937, o número de casos de Febre Amarela Urbana foi rapidamente reduzido. Desta forma, os últimos casos registrados da doença urbana no Brasil ocorreram em 1942 (Ministério da Saúde, 1969) e em 1954, nas Américas (Monath, 2001). Entretanto, devido à infestação urbana de *Ae. aegypti*, não seria uma surpresa a reurbanização da Febre Amarela no Brasil.

Um método eficaz para se prevenir a Febre Amarela é a vacinação. Apesar da extensiva campanha de vacinação, desde os anos 80 tem se verificado a re-emergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil. Anualmente são notificados vários casos silvestres da doença, principalmente nas regiões Amazônica, do Planalto Central e do Pantanal brasileiro, onde foram registrados, nos anos de 2003 a 2006, 71 casos, com letalidade de 60% entre 2003 e 2004 e 100% nos anos seguintes. Entre dezembro de 2007 a Abril de 2008, foram registrados 40 casos de Febre Amarela Silvestre nas regiões dos Estados de Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Paraná, com letalidade de 53% (Ministério da Saúde, Março de 2008).

A Febre do Dengue (DF) e Dengue Hemorrágico (*Dengue Hemorrhagic Fever* –DHF) e/ou Síndrome do Choque do Dengue (*Dengue Shock Syndrome* –DSS) são doenças causadas pelo vírus do Dengue (DENV), o qual apresenta quatro sorotipos (1-4) distintos entre si, mas relacionados antigenicamente, sendo que a imunidade protetora induzida é específica para cada sorotipo. Desta maneira, indivíduos que vivem em áreas endêmicas podem desenvolver, após a infecção, doença por qualquer um dos quatro sorotipos. A transmissão viral ocorre quando mosquitos *Ae. aegypti* infectados picam hospedeiros susceptíveis.

O Dengue é exceção quando se observa comportamento das arboviroses, pois é responsável por grandes epidemias urbanas no Brasil desde a década 80 (Figueiredo,

2000). Tal fato está associado à progressiva disseminação e infestação do vetor nas várias regiões do país, como também à incapacidade no controle dos vetores da doença, à intensificação do processo de urbanização em países tropicais e à facilidade com que se faz a introdução viral através de meios de transporte rápido (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005; Fonseca e Figueiredo, 2005.). Em 1981, ocorreu a primeira epidemia de DENV 1 e 4, em Boa Vista (Roraima). Em 1986, o DENV-1 disseminou-se pelo país. No início de 1990, ocorreu a primeira epidemia de DENV-2 no Estado do Rio de Janeiro. Embora a epidemia tenha sido predominantemente de DF, 462 casos de DHF foram notificados totalizando oito óbitos. Em 2000, o DENV-3 foi introduzido no Rio de Janeiro, disseminando-se rapidamente para outros estados e, nos últimos três anos, tem sido o sorotipo responsável pela maioria dos casos de DF e de DHF no Brasil (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005). Foi relatada recentemente a reintrodução do DENV-4 em Manaus (AM), em 2007 (Figueiredo, Naveca *et al.*, 2008).

Foram notificados 231.471 casos de DF em 2000, com 59 registros de DHF/DSS e 3 óbitos; em 2001 foram 413.067 casos, com 679 registros de DHF/DSS e 29 mortes; em 2002 foram 780.644 casos de dengue, 2.607 de DHF/DSS e 145 mortes (Ministério da Saúde, 2003). De Janeiro a Dezembro de 2007, foram registrados 559.954 casos no país, com 1.541 registros de DHF e 158 óbitos (Ministério da Saúde, 2007). O aumento no número de casos de DHF/DSS deve-se em parte às infecções secundárias adquiridas em sucessivas epidemias em que co-circulam múltiplos sorotipos, além de outros fatores associados, como a virulência das estirpes virais e a susceptibilidade de cada indivíduo (Figueiredo, 2000; Gould e Solomon, 2008).

A Encefalite de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo SLEV. Apenas três casos de SLEV em humanos foram relatados no Brasil, durante cerca de 30 anos, sendo dois na região norte, na década de 70, e um no município de São Pedro (SP), em 2004. Nestes casos, os pacientes apresentavam quadro febril sem

envolvimento neurológico (Rocco, Santos *et al.*, 2005; Dos Santos, 2006; Reina, 2006). Em 2006, concomitante a uma epidemia de DENV-3, ocorreu o primeiro surto de SLEV no município de São José do Rio Preto, com registro de 12 casos e um de co-infecção com DENV-3, nos quais os pacientes apresentavam sintomas de Dengue Hemorrágico e encefalite (Mondini, Bronzoni *et al.*, 2007; Mondini, Cardeal *et al.*, 2007).

Dados sorológicos indicam a presença de anticorpos específicos circulantes na população localizada próximo às áreas florestais da Amazônia e Mata Atlântica, e apesar do raro isolamento do SLEV de humanos, este vírus tem sido isolado de artrópodes, aves e animais silvestres, indicando que é enzoótico nestas regiões (Iversson, 1983; Travassos Da Rosa, 1998).

Infecções por SLEV podem ser assintomáticas ou subclínicas, mas também podem levar a sintomas semelhantes a um resfriado comum e muitas vezes são diagnosticadas como Dengue. Os principais sinais e sintomas observados incluem febre, cefaléia, mialgia, náuseas/vômitos e sonolência. Normalmente, quadro grave com sinais neurológicos focais e encefalite ocorre em pacientes com mais de 60 anos ou imunodeprimidos, para os quais a letalidade varia de 7 a 24% (Reina, 2006). Entretanto, pela reatividade cruzada de anticorpo entre diferentes flavivírus, imunização pelo vírus Dengue também confere imunização contra o SLEV (Burke e Monath, 2001).

O vírus ROC é neurotrópico e está associado a quadros graves de encefalite (Travassos Da Rosa, 1998). É mantido na natureza por aves silvestres e pelos mosquitos *Aedes* e *Psorophora* (Figueiredo, 2007). Este vírus causou uma importante epidemia no Vale do Ribeira, nos anos de 1973 a 1977, com 1000 casos e 10% de óbito e, embora não tenham sido registrados outros surtos da doença, dados sorológicos suportam a possibilidade de circulação do vírus nesta região (Lopes, 1978; Lopes, 1979; Figueiredo, 2007). Em 1995, na Bahia, cinco pacientes apresentaram anticorpos para este vírus e em 2004, o exame sorológico de dois pássaros, capturados na região sul do país, mostrou

anticorpos para ROCV (Iversson, 1989; Iversson, 1992; Straatmann, Santos-Torres *et al.*, 1997; Figueiredo, 2007).

O vírus ILH está distribuído nas Américas do Sul e Central, inclusive no Brasil, onde tem sido relacionado à doença febril aguda. A prevalência de anticorpos nas regiões Amazônica e Mata Atlântica é alta, apesar do número de casos diagnosticados da doença ser baixo, indicando que as infecções por este vírus possam ser leves ou inaparentes (Iversson, 1981; Travassos Da Rosa, 1998).

O vírus BSQ tem sido isolado de mosquitos e mamíferos silvestres. Apenas um caso de infecção humana foi relatado, o qual se caracterizou por doença febril aguda (Travassos Da Rosa, 1997).

A encefalite causada pelo vírus West Nile (WNV) é uma das principais doenças emergentes nas Américas. O WNV foi isolado de humanos e eqüinos com encefalite em Nova York no ano de 1999 e, desde então, difundido em direção ao México e Caribe (Kotait, 2006; Gould e Solomon, 2008; Kramer, Styer *et al.*, 2008). A presença do WNV na América do Sul vem sendo relatada pela detecção de anticorpos em aves e/ou eqüinos na Guatemala (Morales-Betoulle, Morales *et al.*, 2006), Caribe, México, El Salvador e Colômbia (Komar e Clark, 2006), Venezuela (Bosch, Herrera *et al.*, 2007), e em humanos em Cuba (Pupo, Guzman *et al.*, 2006) bem como pelo isolamento viral em três eqüinos na Argentina (Morales, Barrandeguy *et al.*, 2006) e no México (Komar e Clark, 2006). No Brasil, não há relatos de doença nem anticorpos detectados em humanos, eqüinos e aves, embora o país apresente condições ecológicas favoráveis à transmissão deste vírus. Desde 2002, esforços têm sido realizados no sentido de se estabelecer uma vigilância epidemiológica ativa de aves migratórias (Araújo, Vianna *et al.*, 2004; Kotait, 2006).

Na América do Norte, epidemias por WNV estão associadas a doenças em eqüinos e aves migratórias que se acredita serem hospedeiros amplificadores juntamente

com mosquitos do gênero *Culex*. Os humanos e equinos são hospedeiros acidentais, entretanto, transplantes de órgãos, transfusões de sangue e o leite materno estão sendo relatadas como importantes vias de transmissão em humanos (Gould e Solomon, 2008).

No entanto, há poucas evidências da morbidade e/ou mortalidade de eqüinos ou humanos nos países tropicais. Este fato pode ser explicado pela proteção cruzada que ocorre com outros *Flavivirus*, como Dengue, Febre Amarela, que já circulam nestes países, o que leva a redução da virulência do WNV, ou pela diminuição da competência dos vetores e aves em transmitir o vírus quando se compara a transmissão em climas temperados, devido a grande variedade de espécies hospedeiras nos trópicos, e ainda pelo fato das aves hospedeiras quando doentes serem incapazes de migrarem grandes distâncias (Brault, Langevin *et al.*, 2004); Chávez, 2006; Kramer, Styer *et al.*, 2008).

1.2.3. Família *Bunyaviridae* – Gênero *Orthobunyavirus*

Os vírus deste gênero medem de 80 a 120 nm de diâmetro, apresentam capsídeo de simetria helicoidal, circundado por um envoltório lipoprotéico com espículas superficiais. O genoma viral é constituído por três segmentos de RNA de fita simples (*Small-S*, *Medium-M* e *Large-L*), lineares e de simetria helicoidal, os quais codificam, respectivamente, proteínas estruturais de nucleocapsídeo (N), glicoproteínas do envelope (G1 e G2) e a proteína L (L), além das proteínas não-estruturais NSs e NSm (Schmaljohn, 2007).

As glicoproteínas G1 e G2 possuem propriedades biológicas importantes por causarem virulência, hemaglutinação, fixação do vírus e fusão com a célula hospedeira (Schmaljohn, 2007). Estudos indicam que anticorpos neutralizantes se ligam diretamente aos epítomos da glicoproteínas G1 (Saeed, Li *et al.*, 2001).

A proteína N é o produto mais abundante nos *virions* e nas células infectadas. Esta proteína forma o nucleocapsídeo viral, e se liga ao RNA para formar o complexo denominado ribonucleoproteína (Kohl, Dunn *et al.*, 2004). Acredita-se que esta proteína induza a formação de anticorpos fixadores de complemento durante infecções em células de mamíferos (Saeed, Li *et al.*, 2001). Além disso, é importante na replicação viral, pois atua como um chaperone de RNA desdobrando continuamente o RNA para permitir que este forme estruturas mais estáveis (Schmaljohn, 2007).

A proteína L tem função de RNA polimerase RNA-dependente, a qual participa da replicação. Entretanto, precisa assumir funções enzimáticas para exercer as atividades de transcriptase endonuclease, replicase e provavelmente RNA-helicase (Schmaljohn, 2007).

A proteína não-estrutural *s* (NSs) parece ser um antagonista do interferon, favorecendo a ligação entre a proteína viral e a proteína do hospedeiro nas células de mamíferos (Kohl, Dunn *et al.*, 2004).

A proteína não-estrutural *m* (NSm) embora não tenha a sua função bem definida, parece estar envolvida na montagem do *virion* no Complexo de Golgi, aonde está localizada (Schmaljohn, 2007).

O arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* de maior importância no Brasil é o vírus Oropouche (OROV) responsável pela Febre do Oropouche.

O vírus é mantido na natureza pelos ciclos silvestre e urbano. No ciclo silvestre, preguiças, macacos e aves são os hospedeiros vertebrados e o *Aedes serratus*, *Culex quinquefasciatus* e *Culicoides paraensis* (maruim) vetores. No ciclo urbano, o vírus é transmitido de pessoa a pessoa através da picada do *Culicoides paraensis*, amplamente disseminado em áreas tropicais e subtropicais das Américas (Vasconcelos, 1992; Pinheiro, Travassos Da Rosa *et al.*, 1997).

A Febre do Oropouche é uma doença aguda febril que cursa com cefaléia, mialgia, artralgia, podendo estar acompanhado de meningite asséptica (Travassos Da Rosa, Rodrigues *et al.*, 1996). O vírus ORO é considerado, depois do vírus do DEN, o arbovírus de maior importância no Brasil, principalmente na região Amazônica, onde causa epidemias explosivas, acometendo simultaneamente milhares de pessoas, em um curto período, implicando em sérias consequências de ordem social e econômica. No entanto, já houve o isolamento e evidências sorológicas constataram a circulação deste vírus em outras regiões do país (Pinheiro, Travassos Da Rosa *et al.*, 1981; Figueiredo, 1986.; Nunes, 2002; Nunes, Martins *et al.*, 2005).

Estudos filogenéticos do segmento S, classificam o vírus ORO dentro de três genótipos distintos, sendo estes genótipos I, II e III (Saeed, Wang *et al.*, 2000). No genótipo I encontra-se o protótipo de Trinidad e a maioria das estirpes brasileiras, o qual é predominante no Brasil. No genótipo II estão agrupadas as estirpes isoladas no Peru entre 1992 e 1998 e duas cepas do Brasil isoladas em 1991, nos estados do Pará e Acre. No genótipo III estão as estirpes isoladas no Panamá, em 1989 (Saeed, Wang *et al.*, 2000) e a estirpe isolada de um primata (*Callithrix* sp.) no estado de Minas Gerais, em 2000, sendo esta a primeira estirpe do genótipo III detectada no Brasil (Nunes, Martins *et al.*, 2005).

1.3. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico virológico moderno tem como característica importante o uso de vários métodos para detecção da infecção viral, sendo de grande importância para a saúde pública, pois auxiliam no diagnóstico de pacientes e no monitoramento das viroses nas diferentes regiões do país. Os testes sorológicos, bem como os métodos moleculares para a detecção de genoma viral assumem grande importância no diagnóstico de arboviroses (Storch, 2007). Entretanto, a realização de testes específicos depende basicamente da

qualidade da amostra, levando em consideração o tempo de colheita *versus* a manifestação da doença no paciente, o tipo de amostra, a qualidade e quantidade do material obtido, o tempo e as condições de transporte as quais a amostra foi submetida (Storch, 2007).

O método comumente utilizado no diagnóstico laboratorial de arboviroses é o isolamento viral, em camundongos recém-nascidos, culturas celulares ou em mosquitos. Praticamente todos os arbovírus são patogênicos para camundongos neonatos e letais para camundongos adultos, como também para *hamsters* e cobaias. Entretanto, o uso de camundongos apresenta desvantagens, como alto custo em manter um biotério, longo tempo para o isolamento (De Paula e Fonseca, 2004). Para o isolamento em cultura celular, uma grande variedade de cultivos celulares tem sido utilizada onde a multiplicação viral pode ser detectada mediante evidência de efeito citopático ou de formação de placas sob camada de ágar. Dentre as linhagens celulares contínuas que apresentam sensibilidade a um grande número de arbovírus estão as células Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*), BHK-21 (rim de *hamster* neonato), LLC-MK2 (rim de macaco *Rhesus*) e as células de artrópodes *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) e *Aedes albopictus* (clone C6/36). Dentre as linhagens celulares primárias, as células de embriões de galinha e pato, bem como as de rim de *hamster* e de tecido nervoso de camundongos recém-nascidos ou de embriões são as que apresentam maior susceptibilidade. As desvantagens desta técnica são as mesmas observadas para o isolamento em camundongos, com o aditivo de que é necessária a realização de múltiplas passagens para a observação de efeito citopático nas células infectadas (De Paula e Fonseca, 2004).

Uma vez realizado o isolamento, a confirmação do agente pode ser feita por ensaios de neutralização, fixação de complemento, inibição da hemaglutinação (HI), imunofluorescência e/ou ELISA (De Paula e Fonseca, 2004; Storch, 2007).

Quanto aos métodos sorológicos, HI e ELISA são os mais empregados. A HI por ser uma técnica sensível, rápida e de fácil execução, é recomendada na rotina laboratorial,

principalmente nos estudos soro-epidemiológicos, devido à longa persistência dos anticorpos inibidores da hemaglutinação após a infecção, permitindo diferenciar entre infecções primárias e secundárias (Shope e Sather, 1979). Contudo, a confirmação do diagnóstico exige amostras de soros pareadas, ou seja, amostras colhidas nas fases aguda e de convalescença da doença, as quais, nem sempre são de fácil obtenção (Figueiredo, Owa *et al.*, 1992; De Paula e Fonseca, 2004)

O teste de ELISA, utilizado para detecção de IgM, tem a vantagem de identificar infecção atual ou recente, como também a detecção de antígenos, e, ademais, apresenta alta sensibilidade, é rápido e de fácil execução (Kuno, Gomez *et al.*, 1987; Figueiredo, Simoes *et al.*, 1989). Contudo, para tais metodologias, de uma forma geral, a interpretação dos resultados pode ser prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas entre os vírus do mesmo gênero (Shope e Sather, 1979; Henschal, Polo *et al.*, 1990; Howe, Vodkin *et al.*, 1992; Fulop, Barrett *et al.*, 1993; Puri, Henschal *et al.*, 1994; Bronzoni, Moreli *et al.*, 2004; De Moraes Bronzoni, Baleotti *et al.*, 2005).

A detecção de antígenos virais pode ser realizada pelo método de Imunohistoquímica, a partir de amostras fixadas em formalina. Tal técnica tem sido utilizada no diagnóstico de casos fatais, principalmente naqueles em que os resultados obtidos em outros testes tenham sido pouco conclusivos, além de ser útil nos estudos epidemiológicos retrospectivos (Miagostovich, Ramos *et al.*, 1997; Vasconcelos, 2003).

O desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu a detecção de seqüências específicas do genoma viral, permitindo, assim, eliminar alguns dos problemas encontrados na utilização de métodos sorológicos como, sensibilidade, especificidade e tempo, sendo este de grande importância em situações de epidemia (Samuel e Tyagi, 2006).

Os métodos baseados em RT-PCR significaram um avanço no diagnóstico das arboviroses, pois fornecem resultados rápidos, de alta sensibilidade e especificidade a

partir de amostras clínicas de sangue, tecidos, biópsias, mosquitos e cultura celular (De Paula e Fonseca, 2004) e permitem o sequenciamento nucleotídico dos produtos amplificados, que visam à identificação viral, estudos filogenéticos e de genotipagem (Storch, 2007). Um fator de grande importância para a sensibilidade da RT-PCR é a qualidade do RNA (De Moraes Bronzoni, Baleotti *et al.*, 2005), que é influenciada tanto pela metodologia adotada para a extração, quanto pela forma de conservação da amostra clínica (Storch, 2007).

Os métodos de *Multiplex*-PCR associados a *Nested*-PCR permitem a detecção de mais de um vírus em uma única amostra, bem como de co-infecções, gerando economia de tempo e dinheiro, sem comprometer a qualidade do teste (Elnifro, Ashshi *et al.*, 2000; Kao, 2005). O uso da técnica de *Nested*-PCR é complementar a RT-PCR, sendo indicado para amostras clínicas que apresentam baixo título viral. Esta técnica tem como objetivo aumentar a sensibilidade e especificidade, tornando o resultado mais preciso (Kuno, 1998; Lam, 2007). A metodologia desenvolvida por Bronzoni e colaboradores (2005) para a detecção e identificação de arbovírus brasileiros, pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, apresenta grande aplicabilidade no diagnóstico diferencial de febres agudas e com características clínicas inespecíficas, principalmente em regiões onde co-circulam estes diferentes vírus.

A partir da identificação viral e sequenciamento nucleotídico é possível à realização de estudos filogenéticos, que permite a diferenciação entre os arbovírus e entre os genótipos existentes. A análise pode ser realizada quando se compara a sequência nucleotídica com as variáveis biológicas do vírus, tais como localização geográfica, os organismos hospedeiros, virulência, tropismo, modo de transmissão e o tempo em que a amostra foi obtida. Desta forma, as informações obtidas permitem determinar, principalmente, a origem e a relação entre os arbovírus circulantes tanto no país como em

outros países, e como a doença se espalhou na população, e a partir disso, realizar medidas de controle para arbovírus emergentes e re-emergentes (Holmes, 1998).

Neste contexto, não há trabalhos envolvendo a detecção molecular de arbovírus em diferentes populações onde os pacientes apresentam sintomatologia clínica semelhante, como no caso das doenças febris agudas e encefalites. Portanto, o uso da técnica molecular para detecção de arbovírus é uma forma rápida, segura e eficiente de monitoramento da ocorrência de diferentes arbovírus que estão circulando no país, inclusive durante períodos epidêmicos.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Identificar os arbovírus causadores de doença febril aguda em amostras clínicas provenientes de São José do Rio Preto (SP) e Acrelândia (AC), cidades que apresentam situações epidemiológicas diferentes, com presença de epidemia e ausência de epidemia. Para tanto, foram utilizados os métodos de RT-*Nested*-PCR para identificação de *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras clínicas

Foram analisadas amostras clínicas provenientes dos municípios de São José do Rio Preto (SP) e Acrelândia (AC), localidades onde há a circulação de arbovírus.

3.1.1. Amostras de São José do Rio Preto (SP)

Foram analisadas 413 amostras clínicas de pacientes com suspeita de dengue atendidos pelos serviços de saúde do município de São José do Rio Preto (SP) durante surto de dengue. As amostras foram enviadas entre maio a julho de 2006. Todos os pacientes apresentavam quadro febril de até 05 dias e foram considerados positivos para dengue pela Secretaria Municipal de Saúde e Higiene e pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE/SP), segundo critérios epidemiológicos (vigência de epidemias e sintomas clínicos compatíveis).

As amostras de sangue foram colhidas nas Unidades Básicas de Saúde (USB), Prontos Socorros Municipais e Hospitais e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV), onde foram centrifugadas por cinco minutos para a separação do soro, que foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

3.1.2. Amostras de Acrelândia (AC)

Foram analisadas 76 amostras clínicas provenientes de pacientes do município de Acrelândia (AC), do ano de 2004-2005. As amostras foram obtidas por uma parceria entre o Laboratório de Pesquisa em Virologia e o Depto. de Biologia da Faculdade de Marília, que desenvolve projetos no município de Acrelândia em colaboração com o Departamento de Parasitologia do ICB/Universidade de São Paulo (USP).

As amostras vieram de pacientes que apresentavam quadro febril agudo e resultados negativos para malária, através do método de gota espessa, bem como negativos para arboviroses, pelo método de inibição da hemaglutinação.

O sangue dos pacientes foi obtido no município de Acrelândia e centrifugado por cinco minutos para a separação do soro. As amostras foram enviadas ao LPV em gelo seco e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.2. Vírus

Os arbovírus utilizados neste estudo como controles positivos estão listados na Tabela 1. Com exceção da amostra viral Dengue 3, isolada no Laboratório de Pesquisas em Virologia da FAMERP, as demais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo do Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Os vírus foram propagados em culturas celulares, segundo metodologia descrita por Figueiredo (1990), bem como em camundongos neonatos, conforme descrito por Shope & Sather (1979). Para tanto, camundongos lactentes (Balb/c), com dois dias de idade, mantidos em gaiolas e acompanhados de suas mães, foram inoculados via intracerebral com 20 μl de suspensão viral. Os animais foram diariamente observados para presença de sintomas característicos de infecção, tais como retardo do crescimento, apatia e encefalite. Depois de detectadas as lesões, os animais foram recolhidos e sacrificados para extração do extrato cerebral por meio de introdução de uma agulha na região occipital e aspiração de todo o conteúdo cerebral. O aspirado foi diluído (1:20) em meio de cultura contendo antibióticos, centrifugado a 4°C por 5 minutos a 3000 rpm (rotor Eppendorf A-4-44) para a obtenção do RNA viral presente no sobrenadante, e armazenado em alíquotas de 200 μl a -80°C , até o momento do uso. A infecção foi confirmada pela detecção do genoma viral nas

suspensões celulares e extratos cerebrais por métodos de RT-*Nested*-PCR específicos para arboviroses (Bronzoni, Moreli *et al.*, 2004; De Moraes Bronzoni, Baleotti *et al.*, 2005).

Tabela 1. Relação das estirpes de arbovírus brasileiros utilizadas no estudo como controles positivos

Família	Gênero	Vírus (abreviação)	Estirpes (abreviação)
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Mayaro (MAYV)	BeAr 20290
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Dengue (DENV)	DENV 1 Mochizuki DENV 2 SpH 125367 DENV 3 RPDen06/41 DENV 4 Boa Vista
		<i>St. Louis Encephalitis</i> (SLEV)	BeH 355964
		Ilhéus (ILHV)	BeH 7445
		Rocio (ROCV)	SpH 34675
		West Nile (WNV)	NY 99
		Febre Amarela (<i>Yellow Fever</i> -YFV)	17DD (vacina)
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche (OROV)	BeAn 19991

3.3. Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de 140µl de amostras clínicas, suspensões celulares ou do extrato cerebral de camundongos, utilizando o *Qiap Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido foi de 60µl.

3.4. Estratégia de estudo

As amostras de São José do Rio Preto foram inicialmente testadas para DENV 1-3, YFV e SLEV e somente as negativas foram testadas para a presença dos demais arbovírus. As amostras de Acrelândia foram testadas para todos os arbovírus.

Em linhas gerais, as amostras clínicas foram analisadas para a detecção e classificação do agente viral em *Alphavirus* e/ou *Flavivirus* segundo estratégia desenvolvida por Bronzoni e colaboradores (2004 e 2005), na qual se utiliza o método de

RT-PCR em duas etapas. Na primeira delas, *primers* gênero-específicos são usados simultaneamente, em um sistema de *Duplex*-RT-PCR (D-RT-PCR). Em uma segunda etapa, *primers* espécie-específicos são usados, simultaneamente ou não, em um sistema de *Nested*-PCR (N-PCR) para a identificação da espécie viral. Desta forma, *Multiplex-Nested*-PCR (M-N-PCR) foi usada para a identificação dos vírus VEE, EEE, WEE e MAY. Outra M-N-PCR foi usada para a identificação dos vírus DEN (1-3) e YF. Os vírus DEN-4, SLE, ROC, ILH, BUS e IGU foram identificados em N-PCRs. Para a detecção e identificação do vírus Oropouche, seguiu-se a metodologia de RT-N-PCR desenvolvida por Bronzoni e colaboradores (dados não-publicados). O fluxograma da estratégia usada no estudo está demonstrado nas Figuras 1 e 2. A Tabela 2 relaciona os arbovírus pesquisados nas amostras clínicas.

Tabela 2. Relação dos arbovírus brasileiros pesquisados.

GÊNERO	VÍRUS
<i>Alphavirus</i>	Venezuelan Equine Encephalitis
	Eastern Equine Encephalitis
	Western Equine Encephalitis
	Mayaro
<i>Flavivirus</i>	Dengue (1-4)
	St. Louis Encephalitis
	Ilhéus
	Rocio
	Febre Amarela
	Bussuquara
	Iguape
	West Nile
<i>Orthobunyavirus</i>	Oropouche

3.4.1. Primers

Os *primers* usados para a detecção dos *Alphavirus* se ligam a regiões do gene da proteína nsP1, enquanto que os usados para a detecção dos *Flavivirus* se ligam a regiões do gene da proteína NS5. Para a detecção do OROV foram usados *primers* que se ligam no segmento S do genoma viral. Os *primers* usados no presente estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* utilizados no estudo.

Primers	Seqüência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
Primers gênero-específicos para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>			
M2W (+)	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	434	Pfeffer <i>et al.</i> (1997)
CM3W (-)	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC		
FG1 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	1000	Fulop <i>et al.</i> (1993)
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTGCATCAGCATACA		
Primers espécie-específicos para <i>Alphavirus</i>			
NVEE (+)	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400 ¹	Bronzoni <i>et al.</i> (2004)
NEEE (+)	CCACGGTACCGTTGCC	124 ¹	
NWEE (+)	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208 ¹	
NMAY (+)	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 ¹	
Primers espécie-específicos para <i>Flavivirus</i>			
NDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472 ²	Bronzoni <i>et al.</i> (2005)
NDEN2 (-)	GAACCAGTTTGGTTDRTTTCATCGTGCC	316 ²	
NDEN3 (-)	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 ²	
NDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 ²	
NSLE (-)	ATT CTT CTC TCA ATC TCC GT	232 ²	
NBSQ (-)	AAG TGA CAC CTG TTC AGG GTA	388 ²	
NILH (-)	TCC ACC GCT GAT CTG AGC CCG TGA	474 ²	
NROC (-)	TCA CTC TTC AGC CTT TCG	230 ²	
NYF-253(-)	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253 ²	
NIGU (-)	CCA CGA ACC AAC TTG AAG	254 ²	
NWN (-)	TCC CCC CGC AGG TGT GCC TCG	717 ²	
Primers específicos para Oropouche			
S1ORO (+)	GAA GCT AGA TAC GGA CAA GTG CTC AAT GC	500	Bronzoni <i>et al.</i> (dados não publicados)
C2ORO (-)	CCA GAG TGC CTA CAG CCT C		
C1ORO (-)	CTC TTA CAG CAA CTA TCT CTT CAC G		
Primers específicos para o gene do Envelope de SLEV			
F880 (+)	CGA TTG GAT GGA TGC TAG GTA G	477	(Kramer e Chandler, 2001)
B2586 (-)	CAG TTG GAG TCA GAG GGA AAT ACT T		
B1357 (-)	GCA ACC TCA TAC TTG ATG TTT TCT C		

¹Com o *primer* cM3W. ²Com o *primer* FG1. (+): sentido genômico; pb: pares de bases.

3.4.2. Duplex-RT-PCR para detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus*

A RT foi realizada pela adição de 8µl de RNA purificado em uma mistura contendo 4µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,4µl de DTT (*Dithiothreitol*) a 0,1M, 1,6µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 1µl de cada *primer* cM3W (a 100µM) e FG2 (a 15µM), 20U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA), 200U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A mistura de PCR consistiu de 8µl do produto da RT, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ a 50mM, 4µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP, 1µl de cada *primer* M2W (a 50µM) e FG1 (a 15µM), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant* - Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50µl. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

3.4.3. Multiplex-Nested-PCR para identificação de *Alphavirus*

A mistura de M-N-PCR consistiu de 1µl do produto obtido na D-RT-PCR, 1 U da enzima polimerase, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada, 2µl de MgCl₂ a 50mM, 1µl do *primer* cM3W a 100µM, 1µl dos *primers* espécie-específicos NVEE, NEEE, NWEE e NMAY (a 15µM cada), 4µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP e

água suficiente para completar 50µl. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a primeira PCR.

Os *amplicons* foram visualizados à luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 2% (peso/volume) seguido de coloração com brometo de etídeo (Ausubel, 1997).

3.4.4. Multiplex-Nested-PCR para identificação de *Flavivirus*

A M-N-PCR para identificação dos *Flavivirus* foi realizada conforme descrito no item 3.4.3., usando os *primers* NDEN-1, NDEN-2, NDEN3 e NYF-253, juntamente com o *primer* FG1 (15µM cada).

3.4.5. Nested-PCR para identificação de *Flavivirus*

A N-PCR para identificação dos *Flavivirus* foi realizada conforme descrito no item 3.4.3., com a exceção de que foi realizado um teste independente para cada vírus pesquisado usando os *primers* NDEN-4, N-SLE, NROC, ILHV ou WNV. Cada um destes *primers* foi usado juntamente com o FG1 e todos foram usados a 15µM.

3.4.6. RT-Nested-PCR para a identificação do vírus Oropouche

A reação de RT-PCR foi realizada conforme descrito no item 3.4.2., com a exceção dos *primers* usados, os quais foram c2ORO (RT) e s1ORO (PCR) a 15µM cada.

A reação de N-PCR foi realizada conforme descrito no item 3.4.3., com a exceção dos *primers* usados, os quais foram c1ORO juntamente com o s1ORO (15µM cada).

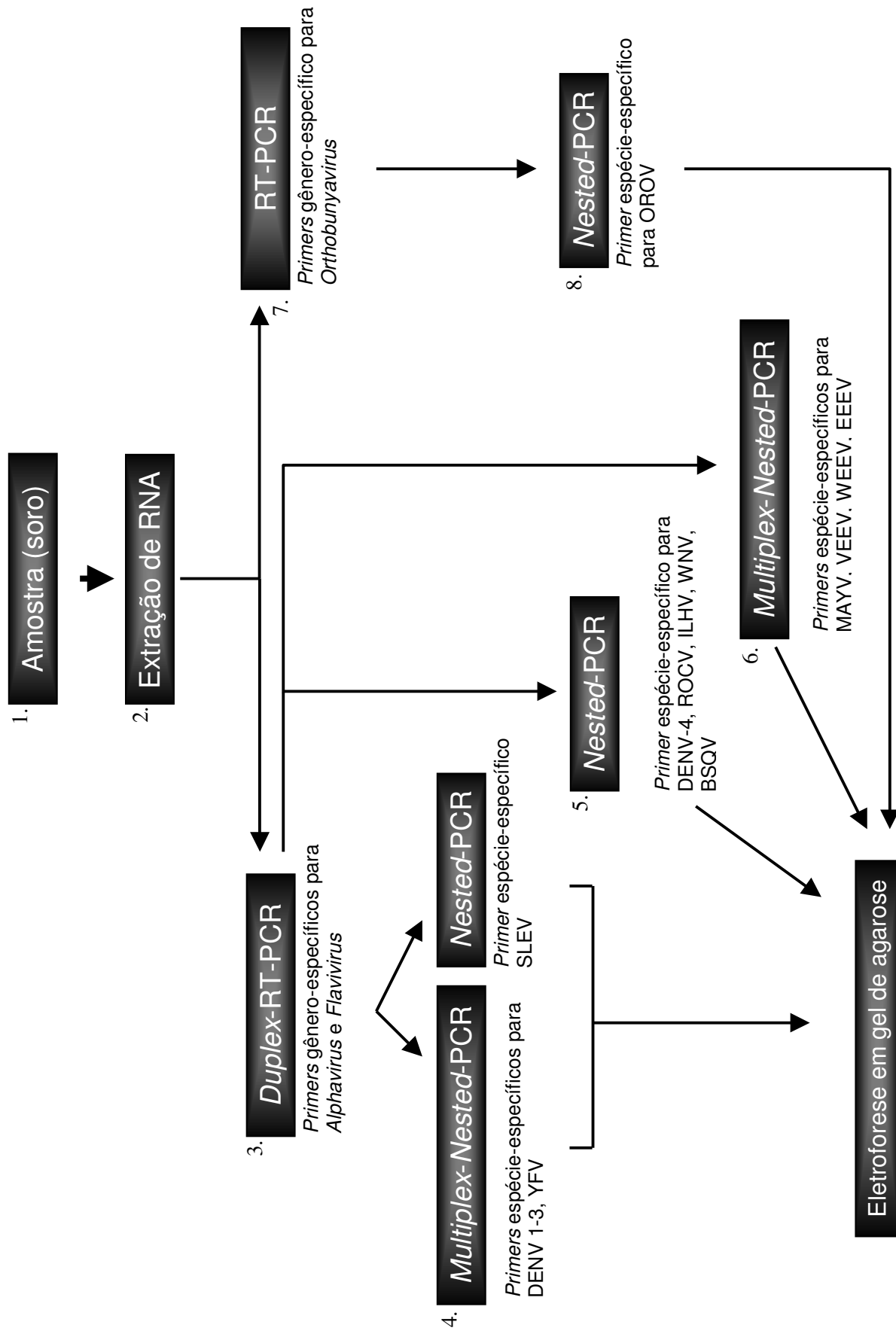


Figura 1. Fluxograma da metodologia aplicada às amostras provenientes de São José do Rio Preto (SP). Os números mostram a sequência que as reações foram realizadas.

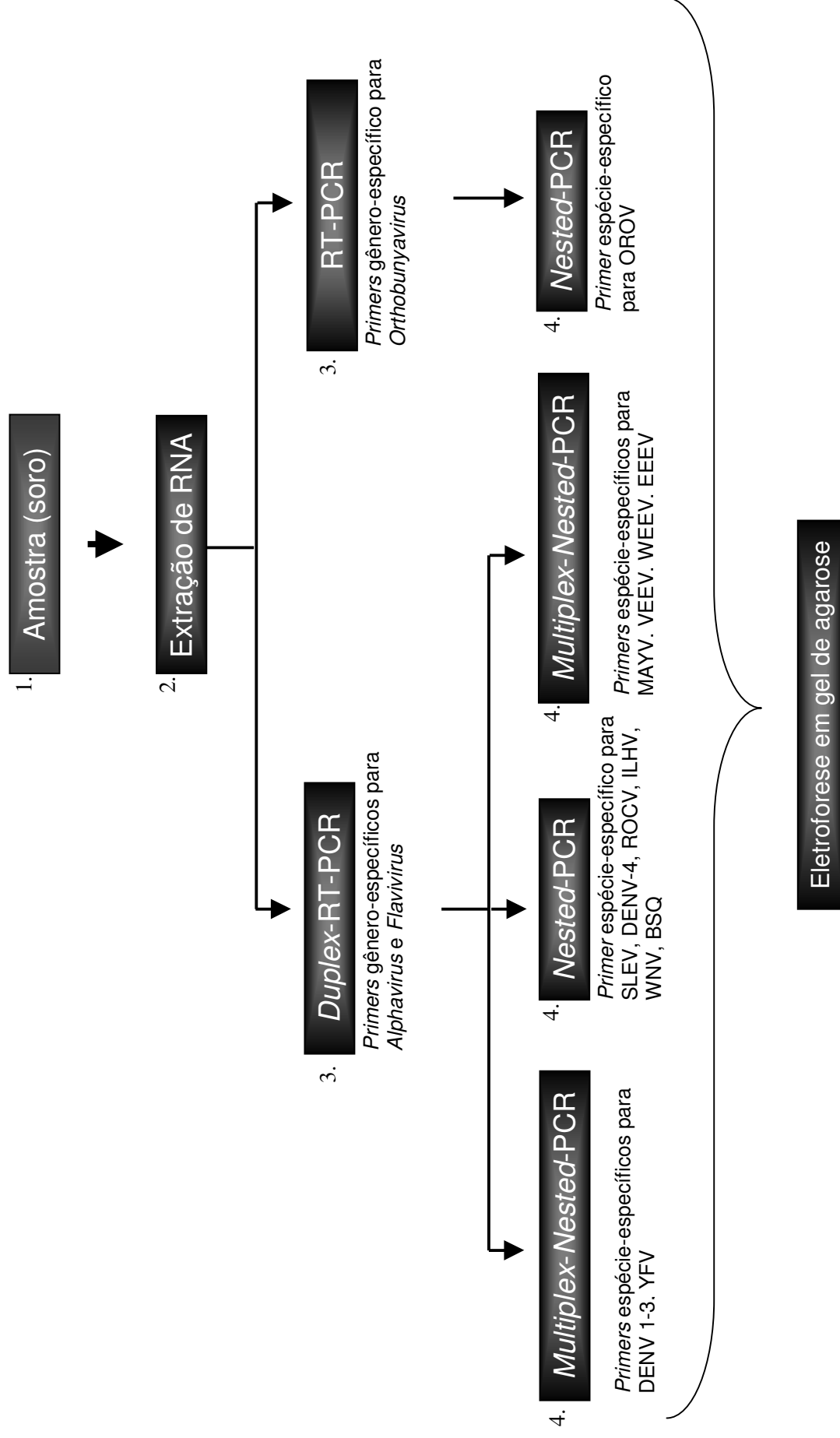


Figura 2. Fluxograma esquemático da metodologia aplicada as amostras provenientes de Acrelândia (AC). Os números mostram a sequência com que as reações foram realizadas.

3.5. Isolamento Viral

Amostras clínicas de alguns pacientes foram isoladas em culturas celulares segundo metodologia descrita por (Figueiredo, 1990). Para tanto, a monocamada confluyente de cultura celular C6/36, mantida em frasco de 25cm², foi inoculada com 100µl de amostra clínica diluída 1:10 em meio de cultura. Após incubação, a 28°C por 45 minutos, foram adicionados 5 ml de Meio Leibovitz L-15 (Cultilab) suplementados com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB - Cultilab). As células foram diariamente observadas e, após sete dias, foram congeladas a -80°C. Por fim, as células foram descongeladas e o sobrenadante avaliado para presença de RNA viral por métodos de RT-*Nested*-PCR específicos para arboviroses (Bronzoni, Moreli *et al.*, 2004; De Moraes Bronzoni, Baleotti *et al.*, 2005)

3.6. *Nested*-RT-PCR para amplificação do Gene do Envelope (E)

Para classificar genotipicamente o SLEV, o gene que codifica a proteína de envelope (E) foi parcialmente seqüenciado (477pb) e analisado perante outras seqüências de SLEV depositadas no GenBank, incluindo a seqüência do SLEVB_{BeH203235}, cujo RNA viral foi usado como controle positivo das reações. Para tanto, a amostra isolada de SLEV foi submetida ao método de RT-*Nested*-PCR, descrita por Kramer & Chandler (2001), sendo que os *primers* usados estão descritos na Tabela 1. A técnica de RT foi realizada com a adição de 8 µl de RNA em uma mistura contendo 4 µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,5µl de DTT a 0,1M, 2µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP, 1µl do *primer* B2586 (a 15µM), 20U do inibidor de ribonuclease, 200U de enzima transcriptase reversa (*Superscript II*) e água suficiente para completar 20µl. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min e a 70°C por 15 minutos.

A PCR consistiu de 8µl do produto da RT, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ a 50mM, 2µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP, 1µl do *primer* B2586 (a 15µM) e F880 (a 15µM), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant*) e água suficiente para completar 50µl. A mistura foi submetida a 25 ciclos de 92°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 7 min.

A reação de N-PCR foi realizada conforme descrito para a PCR, com a exceção dos *primers* usados, os quais foram F880 e B1357.

3.7. Seqüenciamento nucleotídico

Os *amplicons* obtidos foram seqüenciados pelo método dideoxinucleotídeo (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977). Em algumas ocasiões, foram previamente clonados em vetor plasmidial.

Os *amplicons* obtidos nos métodos de (M)-N-PCR foram purificados com etanol baseado em metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001). Em linhas gerais, os *amplicons* foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml para a adição de 3µL de acetato de sódio 3M seguido da adição de 150µl de etanol 100%. O DNA foi precipitado por 20min a -80°C. Após centrifugação de 20 minutos a 13200 rpm (rotor Eppendorf F45-24-11), 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100µL de etanol 70% (Merck). Em seguida foi realizada centrifugação de 10 minutos, a 13200 rpm, 4°C para obtenção de um precipitado, o qual foi homogeneizado em 20µL de água ultra-pura (Invitrogen).

A clonagem dos *amplicons* foi feita em vetor pCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação, foram misturados 2µl do produto da N-PCR, na concentração de 50 ng/µl, 1µl de vetor e 1µl da enzima T4

Ligase. Após 16 horas de incubação a 14°C, bactérias quimicamente competentes *E.coli* DH5 α (100 μ l) foram transformadas com 10 μ l do produto da ligação por 30 minutos, 4° C seguido de incubação a 42°C, por 2 min e gelo por 2 min. Logo em seguida, 250 μ l de meio SOC (2% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glicose) foram adicionados e as bactérias foram incubadas por 1 hora, 37°C, sob agitação constante de 200rpm (câmara com agitação, modelo MA-830, Marconi). Foram plaqueados 100 μ l da transformação em Ágar/LB/ampicilina (50 μ g/mL), seguido de incubação a 37°C por 16 horas.

Uma vez identificada a presença de colônias, estas foram colocadas em 4 mL de meio LB (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de levedura e 1,5% de Ágar bacteriológico) contendo 2 μ l/mL de ampicilina (50 μ g/mL) e incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, durante 16 horas. Para a identificação das colônias que apresentavam o inserto de interesse, PCR foi realizada com 2 μ l da cultura bacteriana, seguindo as metodologias descritas nos itens 3.4.3 a 3.4.6.

Os clones positivos tiveram seu DNA extraído usando o FastPlasmid Mini (Eppendorf, Alemanha), segundo recomendações do fabricante.

O seqüenciamento foi realizado utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Na reação de PCR para seqüenciamento foram utilizados tanto os *primers* espécie-específicos (3,2 μ M), como os de amplificação do vetor. O DNA obtido foi centrifugado por 20 minutos, a 13200 rpm, 4°C, precipitado com 80 μ L de isopropanol 75% e homogeneizado com 2,0 μ L de tampão contendo EDTA 0,5M pH 8.0 e Blue Dextran. O DNA foi desnaturado a 95°C por 2 minutos e aplicado no gel de seqüenciamento. A eletroforese foi realizada no aparelho ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas usando os programas DS Gene 2.0 (Accelrys, USA) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.8. Análise Filogenética

Duas árvores filogenéticas contendo as seqüências de SLEV e OROV, respectivamente, juntamente com outras seqüências destes vírus disponíveis no GenBank, foram construídas pela Prof^a. Betânia Drumond, do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Estadual de Montes Claros (MG). As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas usando o Clustal W implementado no programa Mega 4.0 (Thompson, Higgins *et al.*, 1994), segundo metodologia de Tamura-Ney (Tamura, Dudley *et al.*, 2007). A partir do alinhamento, foi usado o modelo de substituição de nucleotídeo com o auxílio do programa *Modeltest* versão 3.06 (Posada e Crandall, 1998), baseando-se no parâmetro tamura -3 que considera taxas de substituições múltiplas, diferenças no conteúdo de GC e taxas de transição e transversão (Tamura, 1992). Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o método *neighbor-joining* (NJ) executado pelo Mega 4.0, usando como critério de confiabilidade o modelo testado por *bootstrap* de 1000 réplicas (Tamura, Dudley *et al.*, 2007).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico Molecular das Arboviroses em amostras de São José do Rio Preto

A análise das 413 amostras de São José do Rio Preto por RT-PCR mostrou que 325 (79%) foram positivas para a presença de *Flavivirus*. Dentre estas amostras, 320 (98%) foram positivas para DENV-3; 3 (1%) para DENV-2 e 6 (2%) para SLEV. Não houve detecção dos outros arbovírus (DENV-4, ROCV, ILHV, WNV, IGUV, BSQV, MAYV, EEEV, VEEV, WEEV, OROV) nas 88 (21%) amostras negativas para *Flavivirus*, como mostra o Gráfico 1.

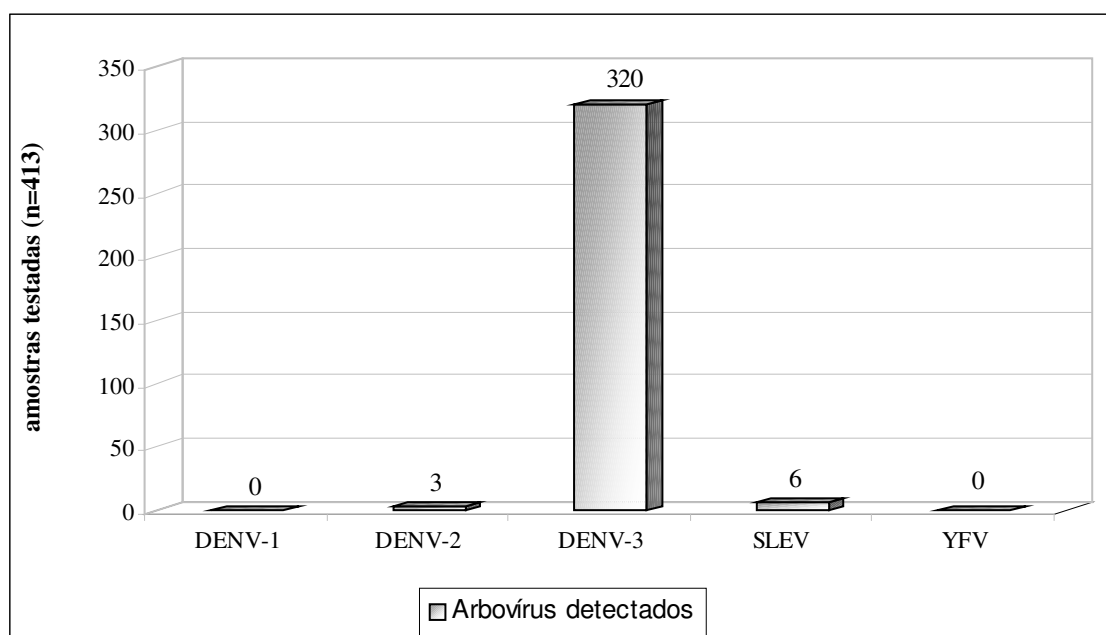


Gráfico 1. Distribuição das amostras clínicas de São José do Rio Preto positivas para *Flavivirus*.

Quatro casos de co-infecção foram detectados, sendo que em uma das amostras foram identificados os vírus DEN-3 e 2 e em outras três foram identificados os vírus DEN-3 e SLE. O perfil eletroforético de algumas amostras clínicas positivas, incluindo casos de co-infecção, pode ser observado na Figura 3.

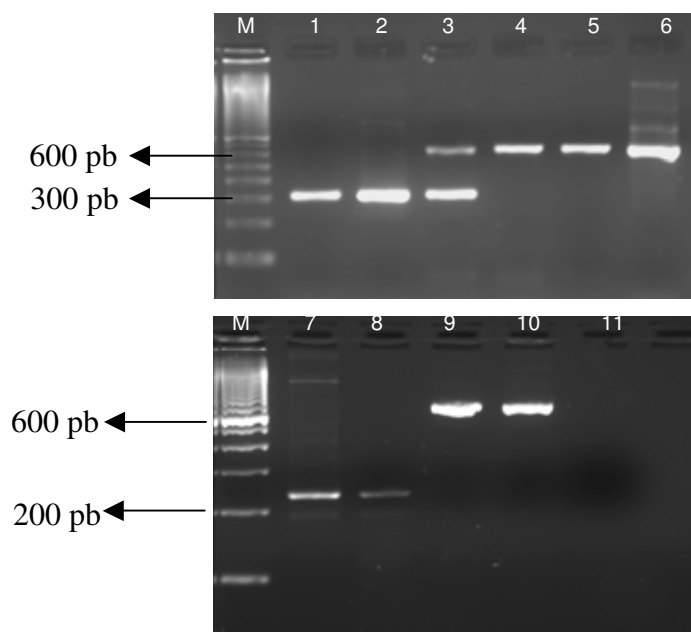


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na *Multiplex-Nested-PCR* para detecção de *Flavivirus* em amostras clínicas de pacientes de São José do Rio Preto. Linha 1: controle positivo para DENV 2. Linha 2: amostra clínica positiva para DENV-2. Linha 3: amostra clínica apresentando co-infecção por DENV-2 e 3. Linhas 4 e 5: amostras clínicas positivas para DENV-3. Linhas 6 e 10: controle positivo para DENV-3. Linha 7: controle positivo de SLEV. Linhas 8 e 9: amostra clínica do mesmo paciente apresentando co-infecção para SLEV e DENV-3. Linha 11: controle negativo. M: marcador de peso molecular (100pb).

4.1.1. Análise Epidemiológica das amostras de São José do Rio Preto

No ano de 2006, no município de São José do Rio Preto, entre os meses de maio a julho, foram enviados pela à Secretária Municipal de Saúde e Higiene (SMSH) 413 amostras de pacientes com suspeita de Dengue. Como estes casos ocorreram em meio a uma epidemia, todos os pacientes foram considerados positivos, não havendo diagnóstico laboratorial. A maior incidência de envio de amostras ocorreu nas segunda e terceira semana do estudo, com 165 e 113 casos, respectivamente. A relação entre o número de amostras testadas por RT-PCR e o número de amostras positivas para arbovírus pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4. Relação das amostras de Dengue enviadas pela Secretaria Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e diagnosticados por RT-PCR e dos casos positivos para arbovírus por semana de estudo, no período de maio a julho de 2006.

<i>Mês</i>	<i>Semana do estudo</i>	<i>Amostras Testadas</i>	<i>Amostras Positivas</i>	<i>% Positivos</i>
	1	45	42	93
	2	165	131	79
	3	113	88	78
	4	56	40	71
<i>Total</i>		<i>379</i>	<i>301</i>	<i>79,4</i>
<i>Junho</i>	5	4	4	100
	6	12	7	58
	7	6	1	17
	8	6	6	100
<i>Total</i>		<i>28</i>	<i>18</i>	<i>64,3</i>
<i>Julho</i>	9	6	6	100
<i>Total Geral</i>		<i>413</i>	<i>325</i>	<i>79</i>

Durante o período que compreendeu este estudo, um número maior de casos foi notificado a Secretária Municipal de Saúde e Higiene e o Gráfico 2 ilustra a relação entre o total de amostras notificadas, amostras enviadas e amostras positivas para arbovírus nas semanas de estudo. O número total de amostras notificadas no município em 2006 foi fornecido pela SMSH/ VE / SEI / SINANW. Observa-se uma positividade nas amostras enviadas, comprovando que os pacientes apresentavam infecções por algum arbovírus.

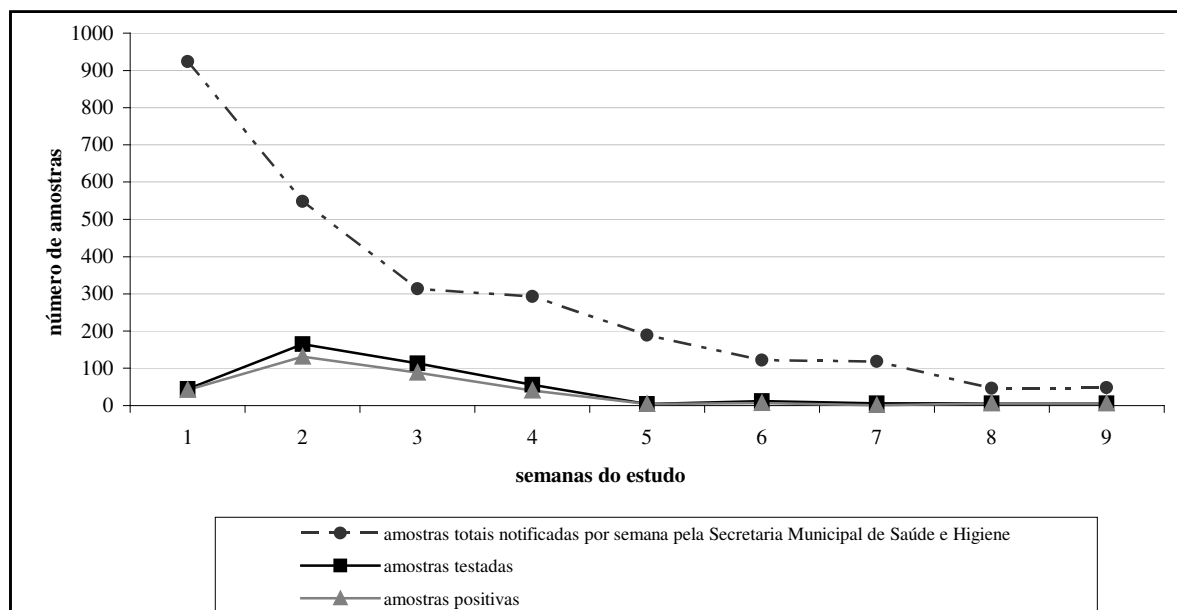
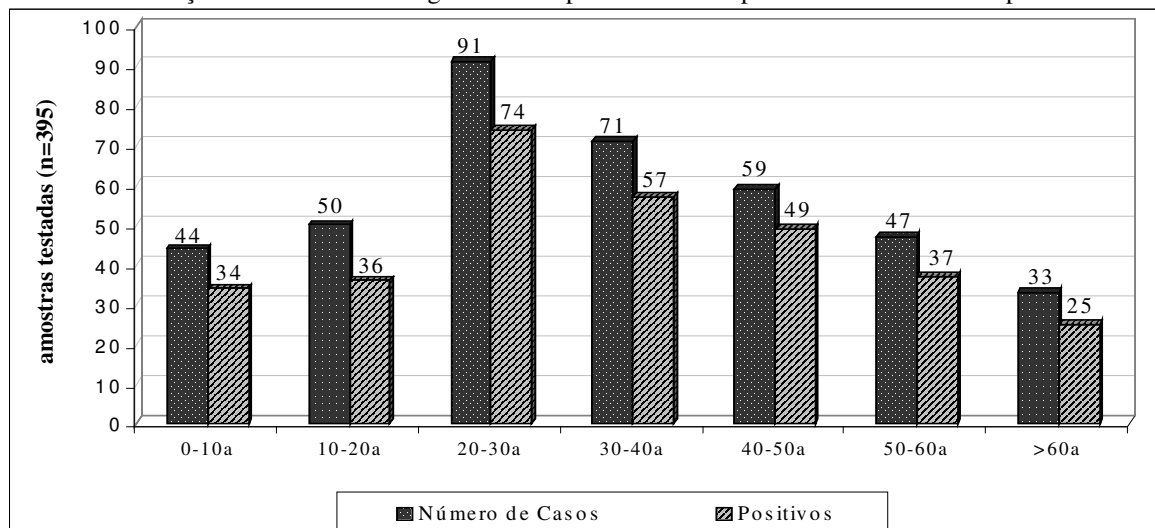


Gráfico 2. Relação dos casos totais de Dengue notificados pela Secretária Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP), amostras testadas por RT-PCR e amostras positivas por semana de estudo, no período de maio a julho de 2006.

Dentre os pacientes, 44 eram de crianças (0 a 10 anos) com 77% (34/44) positivas para arbovírus; 50 eram de pacientes de 10 a 20 anos com 72% (36/50) casos positivos; 91 eram de pacientes de 20 a 30 anos com 81% (74/91) positivos, 71 eram de pacientes de 30 a 40 anos com 80% (57/71) positivos, 59 eram de pacientes de 40 a 50 anos com 83% (49/59) positivos, 47 eram de pacientes de 50 a 60 anos com 79% (37/47) positivos e 33 pacientes eram de idosos (mais de 60 anos) com 76% (25/33) positivos para arbovírus (Gráfico 3).

Gráfico 3. Relação das amostras diagnosticadas para arbovírus por RT-PCR enviadas pela Secretária



Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e as amostras positivas, por faixa etária, no período de maio a julho de 2006.

De acordo com o sexo, dos 413 pacientes testados para arbovírus, 78,90% das mulheres (172/218) foram positivas e 78,46% (153/195) homens foram positivos para arbovírus (Gráfico 4).

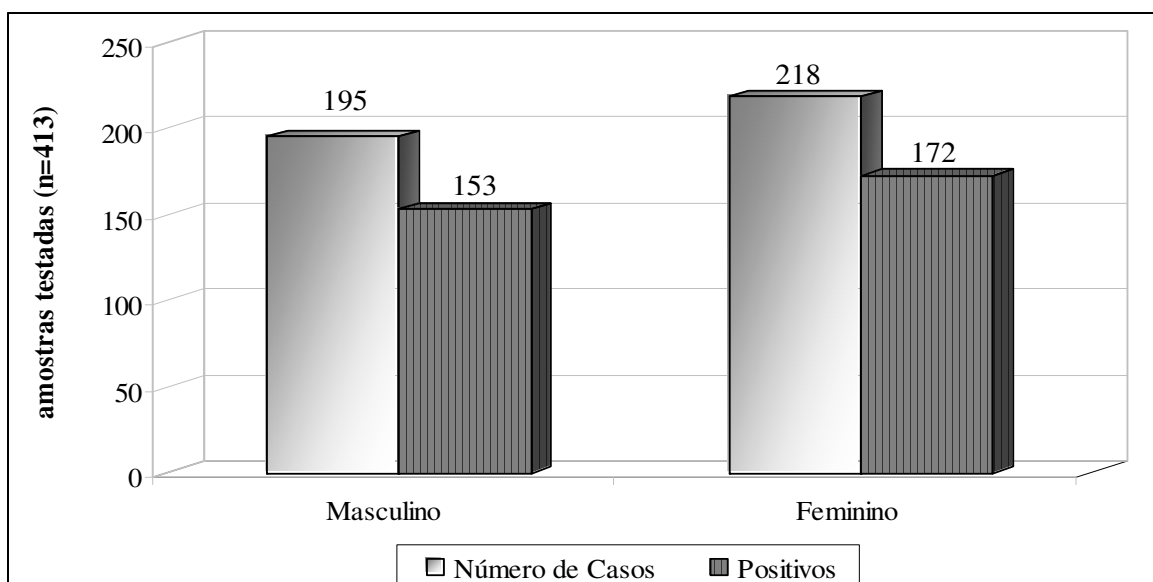


Gráfico 4. Relação das amostras diagnosticadas para arbovírus por RT-PCR enviadas pela Secretária Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto (SP) e as amostras positivas, de acordo com o sexo, no período de maio a julho de 2006.

4.2. Diagnóstico Molecular da Arboviroses em amostras de Acrelândia

A análise das 76 amostras de Acrelândia por RT-PCR mostrou que 8 (11%) foram positivas para a presença de arbovírus. Dentre estas amostras, 5 foram positivas para DENV-3; 1 para MAYV e 2 para OROV (Gráfico 5). O perfil eletroforético de algumas amostras clínicas positivas pode ser observado na Figura 4. Não houve detecção dos outros arbovírus DENV-1, DENV-2, DENV-4, SLEV, ROCV, ILHV, WNV, IGUV, BSQV, EEEV, VEEV, WEEV nas 68 (10,6%) amostras negativas para arbovírus.

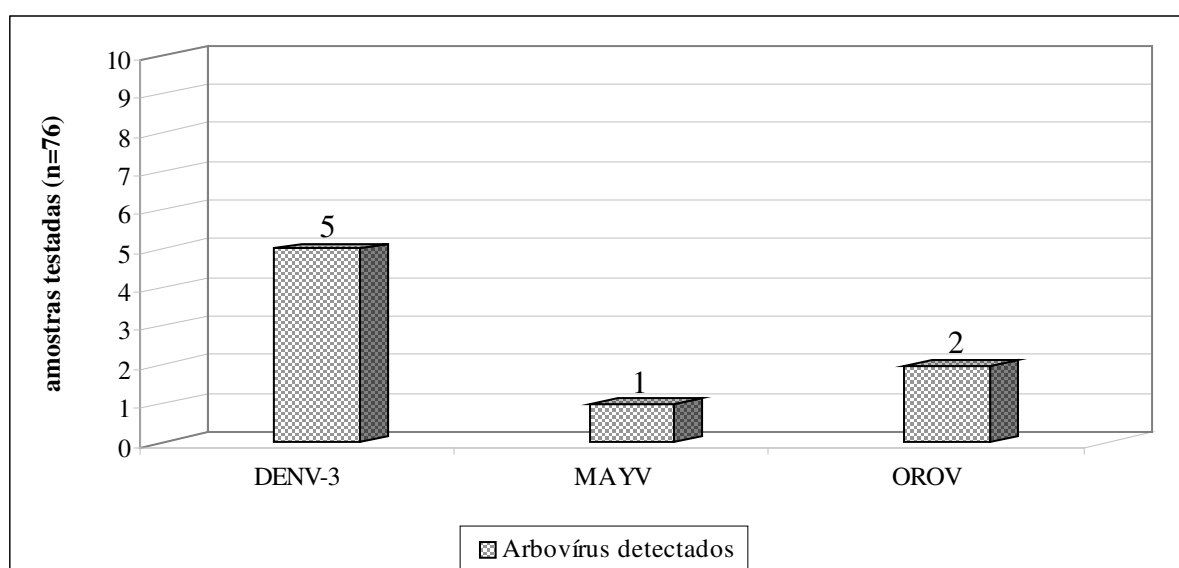


Gráfico 5. Representação das amostras clínicas positivas de Acrelândia para arbovírus

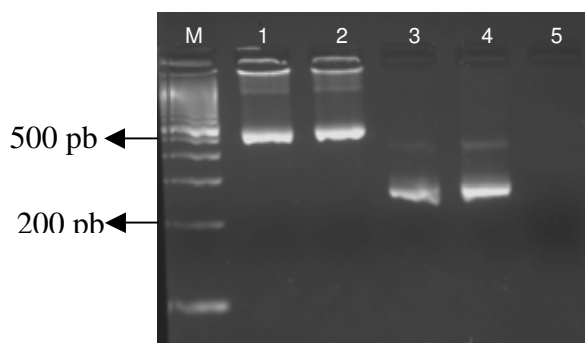


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na *Multiplex-Nested-PCR* para detecção arbovírus em amostras clínicas de pacientes de Acrelândia. Linha 1: controle positivo para OROV. Linha 2: amostra clínica positiva para OROV. Linha 3: amostra clínica positiva para MAYV. Linhas 4: controle positivo para MAYV. Linha 5: controle negativo. M: marcador de peso molecular (100pb).

4.3. Isolamento Viral

Tentativa de isolamento viral em cultura celular foi realizada para quatro amostras clínicas de São José do Rio Preto positivas por RT-PCR para SLEV (2) e DENV-2 (2), bem como para uma amostra de Acrelândia positiva para MAYV. O vírus SLE SJRP06/155 foi isolado de uma amostra na segunda passagem em cultura celular e, da amostra de Acrelândia, foi isolado o MAYV AC/30 na primeira passagem.

4.4. Seqüenciamento Nucleotídico

O genoma viral detectado em 16 amostras clínicas foi seqüenciado para confirmação do diagnóstico. A análise nucleotídica das seqüências confirmou a presença de DENV-3 em 13 amostras, SLEV em duas e OROV em outra amostra, além da isolada.

4.5. Análise Filogenética do isolado SLEV SJRP06/155

O gene que codifica a proteína E do isolado SLEV SJRP06/155 foi parcialmente amplificado conforme mostra a Figura 5. O *amplicon* de 477pb foi clonado e submetido ao seqüenciamento nucleotídico. A análise comparativa da seqüência obtida de 449 nucleotídeos (segmento 826 a 1274, com base no genoma do vírus SLEV Argentina66 – acesso GenBank: AY632544) com seqüências de SLEV disponíveis no GenBank (Tabela 5) mostrou 13 nucleotídeos diferentes, nas posições 45, 83, 89, 169, 186, 201, 225, 235, 302, 330, 396, 408, 435 do SLEV SJRP06/155 em relação ao SLEV BeH203235 (usado como controle positivo). Estes achados indicam que ambos são estirpes diferentes, mas que se agrupam dentro do genótipo V, no qual estão classificados os isolados de Belém (BeAr23379; BeAn246262; BeAn246407; 78v6507; 75D90; BeAn247377; BeAn242587; BeH203235), Trinidad (TRVL9464; Trinidad) e Argentina (GMO-94; CorAn9275; CorAn9124). Entretanto, como o valor de *bootstrap* foi baixo (60%), este não dá suporte para incluir o isolado neste genótipo V, conforme demonstra a Figura 6.

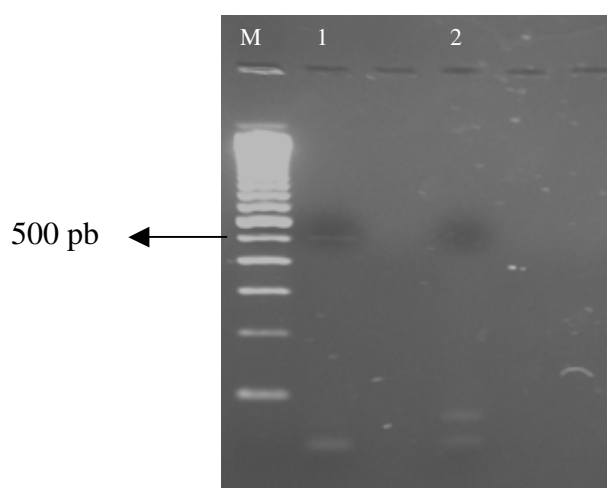


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* do gene E obtido na *Multiplex-Nested-PCR*. Linha 1: amplificação positiva do gene E do isolado SLEV SJRP06/155. Linha 2: controle negativo. M: marcador de peso molecular (100pb).

Tabela 5. Sequências de SLEV analisadas no presente estudo.

Isolado	Localidade	Acesso GenBank
BeH203235 (controle positivo)	Belém	AF205484
BeAr23379	Belém	EF158048
BeAn246262	Belém	EF158053
BeAn246407	Belém	AF205482
BeAn247377	Belém	EF158067
BeAn242587	Belém	AF205478
Span9398	São Paulo	AF205472
65v310	México	AF205470
TRVL9464	Trinidad	EF158056
Trinidad	Trinidad	AF205486
GMO-94	Guatemala	AF205513
78v6507	Argentina	AF205481
CorAn9275	Argentina	EF158068
CorAn9124	Argentina	EF158063
79V2533	Argentina	AF205490
gml902984	Panama	AF205477
gml903797	Panama	AF205487
75D90	Peru	EF158054
72V4749	EUA	AF205497
TD6-4G	EUA	AF205496
soue135	EUA	AF205458
98V3181	EUA	AF205500
Kern217	EUA	EF158058
Imp1311	EUA	AF205461
75v14868	EUA	AF205466
VP34	EUA	AF205503
MSI7	EUA	EF158050
TBH-28	EUA	AF205469
GHA-3	EUA	EF158066
Parton	EUA	EF158070

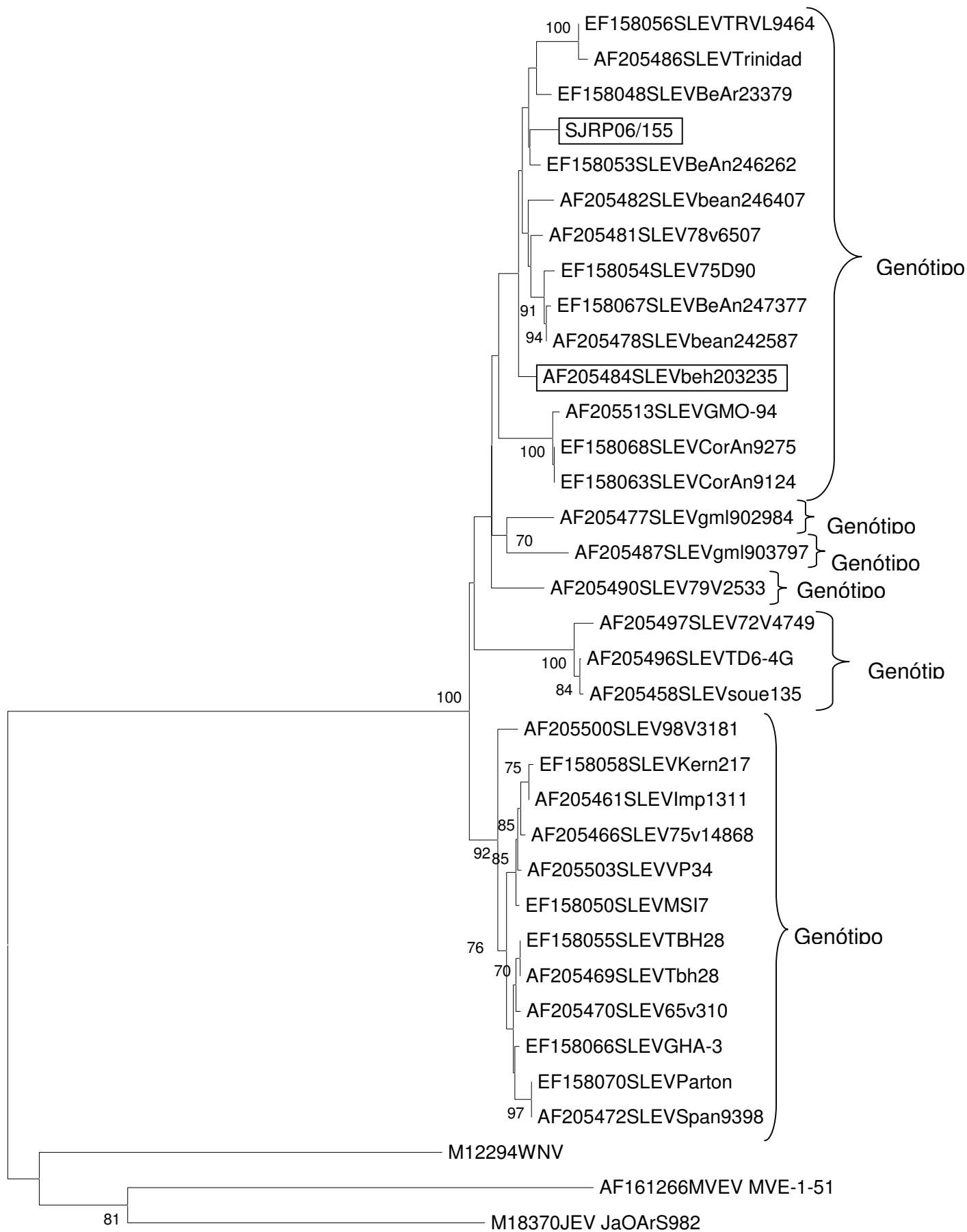


Figura 6. Árvore filogenética derivada de seqüências do gene da proteína E de SLEV. O isolado SLEV SJRP06/155 e o SLEV BeH203235 estão em destaque. Os genótipos de SLEV (I-V) foram previamente definidos. Grupo externo: Encefalite Japonesa (acesso Genbank: M18370), Murray Valley (acesso: AF161266) e WN (acesso: M12294). A seta indica o valor de bootstrap de 60 %, entretanto este valor não dá suporte a inclusão do isolado no genótipo V.

4.6. Análise Filogenética do OROV Acre27

O gene S do OROV Acre27 foi clonado e submetido ao seqüenciamento nucleotídico. A análise comparativa da seqüência obtida de 453 nucleotídeos (segmento 68 a 521, com base no genoma do vírus BeAn1999 – acesso GenBank: AF164532) com seqüências de OROV disponíveis no GenBank (Tabela 6). A seqüência nucleotídica do OROV Acre27 mostrou 6 nucleotídeos diferentes nas posições 269, 318, 543, 552, 586 e 602 em relação ao OROV BeAn19991 (usado como controle) indicando que são estirpes diferentes, porém pertencem ao mesmo genótipo, pois ambos estão dentro do *cluster* pertencente ao genótipo I, conforme demonstra a Figura 7.

Tabela 6. Seqüências de OROV analisadas no presente estudo.

Isolado	Localidade	Acesso GenBank
BeAn19991 (controle positivo)	Belém	AF164532
BeH544552	Brasil Novo	AF164546
BeAr473358	Porto Franco	AF164539
BeH472204	Tocantinópolis	AF164538
BeH475248	Tucuruí	AF164540
BeH541863	Altamira	AF164544
BeH472200	Porto Franco	AF164537
BeH521086	Barra do Corda	AY704559
BeH543639	Belém	AY704562
BeH543087	Xapuri	AF164547
BeH543033	Oriximiná	AF164545

BeH622544	Paraná	EF467368
BeH504514	Desconhecido/Brasil	AF164541
BeH543760	Belém	AY704568
BeH543629	Belém	AY704563
BeH390233	Manaus	AF164536
BeH379693	Castanhal	AF164534
BeH543790	Belém	AY704567
BeH543638	Belém	AY704564
BeH543857	Belém	AY704566
BeH543733	Oriximiná	AY704560
BeH543745	Belém	AY704561
BeH271815	Santarém	AF164533
BeH543880	Belém	AY704565
TRVL976	Trinidad	AF164531
Oropouche	Desconhecido/Brasil	AY237111
BeAn208819	Maracanã	AY993911
BeAn208823	Maracanã	AY993912
BeAn206119	Macaranã	AY993909
BeAn208402	Maracanã	AY993910
BeH381114	Belém	AF164535
PPS522H669314	Desconhecido/Brasil	EF467370
PPS523H669315	Desconhecido/Brasil	EF467369
GML445252	Panamá	AF164557
GML444911	Panamá	AF164556
GML444477	Panamá	AF164555
BeAn626990	Arinos	AY117135
GML450093	Panamá	AF164558
01-812-98	Peru	AF164553
DEI209	Peru	AF164551
IQT4083	Peru	AF164552
MD023	Peru	AF164550
IQT7085	Peru	AF164554
PMOH682426	Arinos	EF467371
BeH505663	Ariquemes	AF164543
PMOH682431	Desconhecido/Brasil	EF467372
BeH505442	Ouro Preto d'Oeste	AF164542

IQT1690	Peru	AF164549
Jabotal	Pará	AF312382

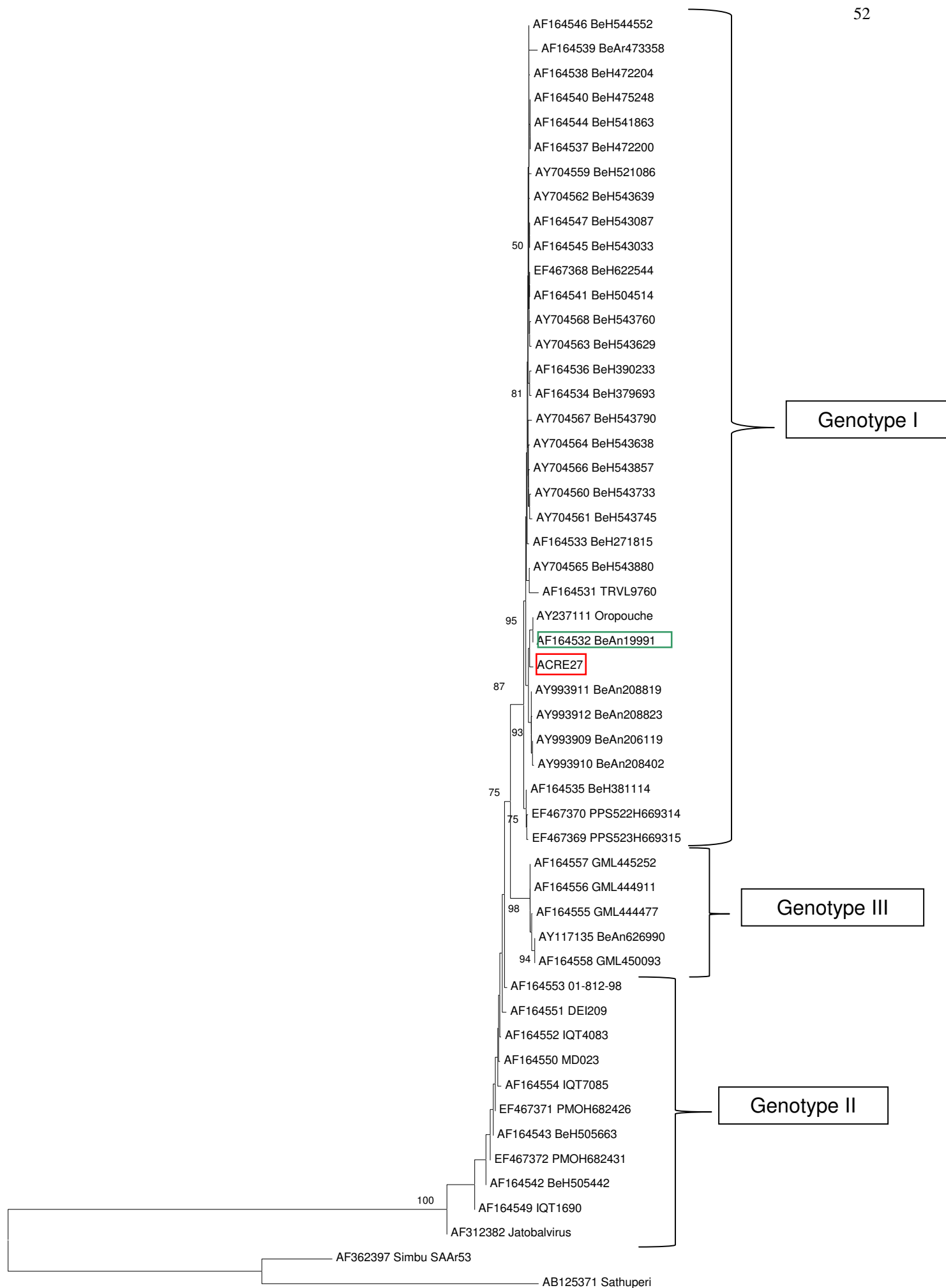


Figura 7. Árvore filogenética derivada de seqüências do gene S do OROV. O OROV Acre27 e o OROV BeAn19991 estão em destaque. Os genótipos de OROV (I-III) foram previamente definidos. Grupo externo: Simbu SAAr53 (acesso GenBank: AF362397) e Sathuperi (acesso: AB125371).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As arboviroses são de grande importância para a saúde pública. No entanto, a epidemiologia destas doenças é pouco explorada nos países em desenvolvimento, havendo relatos de casos em humanos durante as epidemias ou alguns estudos isolados em humanos, animais e mosquitos (Kuniholm, Wolfe *et al.*, 2006).

Dentre os casos de arboviroses em humanos relatados no Brasil, 95% foram causados pelos vírus DEN, ORO, MAY, ROC e YF (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005).

O vírus do Dengue é responsável por grandes epidemias urbanas que geralmente estão associadas à introdução de novos sorotipos (Figueiredo, 2000; Gubler, 2002; De Simone, Nogueira *et al.*, 2004). O sorotipo 3 foi introduzido no Brasil, pelo Rio de Janeiro, no ano 2000, e disseminou-se rapidamente para outros estados. Nos últimos anos esse sorotipo tem sido responsável pela maioria dos casos de Dengue Clássica e DHF/DSS no país (Nogueira, Schatzmayr *et al.*, 2005; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 2005). Nos anos de 2004 e 2005, o DENV-3 foi considerado o único sorotipo circulante no Estado de São Paulo, ao contrário do que ocorria em anos anteriores, em que eram detectados concomitantemente diferentes sorotipos (De Simone, Nogueira *et al.*, 2004; Boletim Epidemiológico Paulista, 2005). Segundo os achados do presente estudo, 79% das amostras testadas de São José do Rio Preto foram positivas para arbovírus, sendo a maioria delas (98%) positiva para DENV-3, confirmando a predominância de sua circulação. Entretanto, segundo dados do Ministério da Saúde (2008), o DENV-2 circulou no município entre 1998 a 2004, corroborando achados no presente estudo, pois três amostras testadas foram positivas para esse sorotipo, indicando que o mesmo não deixou de circular, em São José do Rio Preto. Ademais, o sorotipo 2 foi isolado no ano de 2007 em 20% dos casos de Dengue do estado de São Paulo (Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério

da Saúde, 2008).

Dentre as amostras positivas para DENV-3, uma apresentou co-infecção com DENV-2. Casos de co-infecção dos vírus DEN-3 e DEN-2 são relatados com frequência na Somália, Taiwan, China e Brasil (Kanesa-Thanan, Iacono-Connors *et al.*, 1994; Wang, Chao *et al.*, 2003; Wenming, Man *et al.*, 2005; Araujo, Nogueira *et al.*, 2006).

O primeiro relato de co-infecção por dois sorotipos do Dengue ocorreu em Porto Rico, em 1982. A partir deste ano outros casos de co-infecções foram relatados, incluindo infecções de DENV-1 com DENV-3, de DENV-2 com DENV-3, DENV-1 com DENV-4 e de DENV-3 com DENV-4 (Gubler, Kuno *et al.*, 1985; Laille, Deubel *et al.*, 1991; Wang, Chao *et al.*, 2003; Araujo, Nogueira *et al.*, 2006; Bharaj, Chahar *et al.*, 2008). Acredita-se que estas co-infecções ocorram apenas durante epidemias, onde circulam múltiplos sorotipos e onde há uma alta prevalência do vetor urbano, o qual é capaz de transmitir simultaneamente mais de um vírus (Wenming, Man *et al.*, 2005, Bharaj, Chahar *et al.*, 2008).

Todas as amostras de São José do Rio Preto testadas para arbovírus, no presente estudo, foram consideradas positivas para DENV-3, segundo critérios clínicos e epidemiológicos. Dentre as 413 amostras pesquisadas por RT-PCR, 21% foram negativas para arbovírus, incluindo DENV-3, DENV-2 e SLEV. Desta forma, durante epidemias explosivas de Dengue não se pode afirmar que a doença febril apresentada pelo paciente seja causada exclusivamente pelo vírus em questão, mas sim por outras infecções que induzem sintomatologia semelhante, incluindo outras arboviroses.

No presente estudo, trabalhou-se com amostras dos meses de maio a julho de 2006, período no qual é observada uma diminuição no número de casos notificados, que coincide com a diminuição da temperatura e pluviosidade na região de São José do Rio Preto. Assim, no mês de maio foram enviadas 379 amostras com positividade de 79,4%, no mês de junho foram 28 amostras com positividade de 64,3%, e no mês de julho foram seis

amostras com 100% de positividade. Observa-se que mesmo com a diminuição no número de amostras enviadas, estas apresentaram um alto índice de positividade, o que é observado durante períodos de epidemias.

Em relação à distribuição dos casos por faixa etária, os pacientes entre 20-30 anos foram os mais acometidos. Esta incidência também foi observada por outros pesquisadores que estudavam a epidemiologia de DENV em epidemias (Scandar, Cardoso Junior *et al.*, 2003; Gupta, Dar *et al.*, 2006; Ribeiro, Marques *et al.*, 2006; Bharaj, Chahar *et al.*, 2008)

Quanto à distribuição dos casos segundo o sexo, as mulheres foram as mais acometidas pela doença (52,8%). A explicação para tal fato está relacionada à permanência das mulheres nos domicílios, habitat preferencial dos mosquitos (Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1993; Ribeiro, Marques *et al.*, 2006).

O vírus SLE encontra-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Canadá até a Argentina (Sabattini, 1998; Burke e Monath, 2001). Ao contrário do que acontece nos Estados Unidos, em países da América Central e do Sul, a detecção do SLEV é rara (Sabattini, 1998), embora 5% da população do norte e sudeste do Brasil apresentam anticorpos contra o vírus. Entretanto, esses dados devem ser criteriosamente analisados, pois pode haver reação cruzada entre anticorpos de diferentes *Flavivirus*, os quais são induzidos principalmente por vacinação contra Febre Amarela ou exposições aos vírus DEN. No entanto, o SLEV pode estar circulando nestas áreas e causando infecções humanas, embora a maioria delas não seja diagnosticada (Lopes, Sacchetta *et al.*, 1979; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1998; Figueiredo, 2000).

No Brasil, os primeiros casos registrados da doença em humanos ocorreram nos anos de 1971 e 1978, nos quais os pacientes apresentavam sinais de icterícia e doença febril sem sintomas neurológicos (Pinheiro, Leduc *et al.*, 1981; Vasconcelos, Travassos Da Rosa *et al.*, 1998; Figueiredo, 2000). Em 2004, o vírus foi isolado de uma moradora de São Pedro (SP), a qual apresentava doença febril semelhante à causada pelo Dengue (Rocco,

Santos *et al.*, 2005).

No início de 2005, a Argentina registrou uma epidemia causada por SLEV, na cidade de Córdoba, com 65,3% de pacientes positivos (Spinsanti, 2008). Concomitante a esta epidemia, foi realizado um estudo com aves domésticas (gansos e galinhas) das áreas urbanas próximas às residências de pacientes positivos para SLEV. Destas aves, 62% foram positivas (Diaz, Re *et al.*, 2006).

Em maio de 2005, a presença de anticorpos contra SLEV foi investigada em aves silvestres (residentes e migratórias) capturadas em Iguape, SP, porém a prevalência não foi significativa. No entanto, em aves capturadas em maio de 2006, houve uma alta prevalência de anticorpos anti-SLEV. Os autores concluem que pode ter ocorrido uma importante transmissão de SLEV na região devido, provavelmente, à re-introdução do vírus ou à ativação do ciclo silencioso de transmissão por algum fator do meio (Suzuki, Bizordi *et al.*, 2006).

Neste mesmo ano de 2006, concomitante à epidemia de DENV-3, 12 casos de SLEV foram confirmados na cidade de São José do Rio Preto, sendo considerada a primeira epidemia registrada no Brasil, com um caso de co-infecção com o DENV-3 (Mondini, Cardeal *et al.*, 2007 Mondini, Bronzoni *et al.*, 2007). No presente estudo, dentre as amostras positivas para arbovírus, seis foram positivas para SLEV, com três casos de co-infecção com DENV-3. Tais amostras positivas foram oriundas de pacientes com doença febril aguda, com diagnóstico clínico de Dengue.

As aves migratórias podem ser as responsáveis pela introdução do SLEV, pois além da grande variedade de espécies presentes no Brasil, estas participam tanto da manutenção do ciclo como da disseminação do vírus.

O fato de SLEV ter sido causador de doença humana serve como um alerta para os profissionais de saúde sobre a necessidade de investigações clínicas e epidemiológicas mais completas sobre doenças febris, principalmente durante epidemias, já que segundo

dados presentes neste estudo, infecções por SLEV podem não ser reconhecidas ou confundidas com o DENV, devido à sintomatologia clínica semelhante.

Dentre estas amostras positivas para SLEV, uma (SLEV SJRP06/155) foi isolada em células C6/36 e teve o gene da proteína E parcialmente sequenciado. Este gene codifica a proteína de envelope viral, a qual, ao contrário da NS5, apresenta regiões de variabilidade que permitem a discriminação entre os sete genótipos de SLEV existentes (I-VII), segundo classificação de Kramer e Chandler (2001).

A análise filogenética do segmento nucleotídico da proteína E mostrou que o SLEV SJRP06/155 se agrupou junto aos isolados de Belém, os quais estão classificados no genótipo V, classificação esta baseada nos trabalhos de Kramer e Chandler (2001), Diaz e colaboradores (2006) e Dos Santos (2006). No entanto, o baixo valor de *bootstrap* (60%) observado na árvore filogenética não deu suporte para incluí-lo neste genótipo. Este baixo valor pode ser devido à construção da árvore ter sido baseada em uma sequência curta de nucleotídeos (477 pb), já que os trabalhos que definem a classificação em genótipos usam sequências completas do envelope viral.

Dos Santos (2006) classificou o SLEV isolado em 2004 (Rocco, Santos *et al.*, 2005) como sendo do genótipo III, onde estão incluídos vírus da Argentina. O isolado de 1968 se agrupou no genótipo II, juntamente com vírus dos Estados Unidos, segundo classificação de Kramer e Chandler (2001). Desta forma, vírus pertencentes a três genótipos diferentes estão circulando no estado de São Paulo.

Em 2004, foi realizado, no município de Acrelândia, um estudo sorológico onde 357 amostras de moradores acerca de áreas rurais foram testadas para a presença de malária e arbovírus pelos testes de gota espessa e inibição da hemaglutinação (HI), respectivamente. Dentre as amostras positivas para arbovírus, 152 foram positivas para *Alphavirus* (5,6%), incluindo MAYV (5%), *Orthobunyavirus* (5,3%), incluindo Oropouche (1,7%) e DENV (3,3%) (Silva-Nunes, Malafronte Rdos *et al.*, 2006).

Parte das amostras negativas para arbovírus testadas pelo método de HI, segundo o trabalho citado anteriormente, foi re-testada por RT-*Nested*-PCR no presente estudo. Dentre as 76 amostras, oito foram positivas para arbovírus, e cinco delas apresentaram DENV-3, uma MAYV e outras duas OROV. Diante do fato destas amostras terem sido obtidas fora do período epidêmico do Dengue, pode-se inferir que a doença está ocorrendo de forma endêmica na região rural da cidade de Acrelândia, embora dados obtidos por Tavares-Neto e colaboradores (2004) mostrem que a população da região Amazônica apresenta baixa incidência de anticorpos para o vírus DEN.

Análise filogenética de seqüências de DENV-3 isolados no Brasil entre os anos de 2002 e 2004 sugere que o vírus circulante da região norte do país tenha sido introduzido pelas ilhas do Caribe e não pelo Rio de Janeiro, conforme descreve Aquino e colaboradores (2006).

No Brasil, o MAYV é amplamente distribuído nas regiões da Amazônia, Central e Nordeste. As epidemias de MAYV estão limitadas às áreas rurais ou dentro de florestas onde o vetor *Haemagogus janthinomys* é encontrado em abundância. Na Amazônia, o vírus é endêmico, com altas taxas de anticorpos na população (10-60%), por isso há dificuldade de se isolar o vírus de amostras clínicas. Além disso, o período virêmico é curto, podendo se estender por três dias. Primatas não-humanos e aves migratórias são importantes disseminadores do vírus, pois podem voar longas distâncias, em fase virêmica, em um curto período de tempo (Vasconcelos et al., 1998).

Neste estudo, o isolado MAYV Acre30 de um paciente de Acrelândia confirma os achados de Silva-Nunes (2005). Segundo o autor, este parece ser o *Alphavirus* de maior circulação dentro do estado, embora o vírus nunca tenha sido isolado de indivíduos do Acre.

Desde o primeiro isolamento em Trinidad em 1955 (Anderson *et al.*, 1961), OROV tem sido associado com grandes epidemias nas Américas, com quinhentos mil casos

descritos nos últimos 45 anos (Pinheiro et al., 2004). O vírus é conhecido por causar epidemias urbanas explosivas, como as que ocorreram nos estados do Amazonas, Acre e Pará, onde houve o envolvimento de milhares de pessoas, sem o registro de casos fatais (Pinheiro, 1998). As epidemias ocorrem tanto em grandes centros como em pequenas cidades, uma vez que o vetor (maruim) encontra-se distribuído em áreas urbanas e rurais (Travassos Da Rosa, Rodrigues *et al.*, 1996).

A detecção de OROV em dois pacientes de Acrelândia, que foram previamente considerados negativos para anticorpos anti-OROV, sem relato de uma epidemia, sugere a ocorrência de casos esporádicos da doença na região, ao contrário do que é esperado em epidemias de OROV.

Estudos filogenéticos do gene do nucleocapsídeo do OROV indicam a existência de diferentes genótipos (I, II, III) circulantes no Brasil (Nunes, Martins *et al.*, 2005; Azevedo, Nunes *et al.*, 2007). No presente estudo, a amostra OROV Acre27 agrupou-se junto aos isolados do Pará, os quais pertencem ao genótipo I, o mais encontrado neste estado. No Acre, tanto o genótipo I como o II já foram descritos em epidemias (Azevedo, Nunes *et al.*, 2007).

No presente estudo, as amostras de Acrelândia negativas para anticorpos inibidores da hemaglutinação contra arbovírus foram ensaiadas nos métodos de RT-N-PCR e mostraram uma positividade de 11%. Tal fato pode ser explicado pela alta sensibilidade associada à especificidade destes testes moleculares quando se relaciona o tempo de colheita das amostras, a qual foi realizada na fase aguda da infecção. Tais testes usados para a detecção e identificação dos diferentes *Alphavirus* e *Flavivirus*, bem como o vírus ORO oriundos de amostras clínicas apresentam sensibilidade e especificidade comparáveis aos do IV (De Moraes Bronzoni, Baleotti *et al.*, 2005).

Por fim, cabe aos profissionais da área de saúde o conhecimento da epidemiologia dos arbovírus, que na maioria das vezes apresentam sintomatologia semelhante ao DENV e

por isso não são diagnosticados, principalmente, quando os sintomas ocorrem em períodos não epidêmicos.

Faz necessária a implementação de um sistema de vigilância ativo, baseado na prevenção e controle de pacientes com doença febril aguda, reservatórios, animais domésticos e mosquitos vetores, a fim de monitorar a circulação no país e evitar que ocorra a introdução ou reintrodução destes vírus, o que poderia causar grandes epidemias.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nas amostras de São José do Rio Preto (SP), o DENV-3 mostrou que este sorotipo foi o predominante, entretanto a presença de amostras positivas para o sorotipo 2 mostrou que este ainda estava circulando no município.

A relação sexo/idade não foi significativa pois os pacientes positivos foram infectados durante período epidêmico e estavam susceptíveis ao novo sorotipo do DENV.

Além do DENV, houve a detecção de SLEV mostrando que este vírus está circulando e não está sendo diagnosticado.

Nas amostras de Acrelândia (AC) foram detectados os vírus DEN-3, MAY e ORO. A presença de amostras positivas para DENV-3 pode estar relacionada à circulação endêmica deste vírus no município. A detecção do OROV mostrou que este vírus circula fora de períodos epidêmicos. O MAYV que mesmo sendo o arbovírus de maior circulação no estado do Acre, até o momento não havia sido detectado.

O método molecular empregado neste estudo permitiu diagnosticar os arbovírus DENV, SLEV, OROV e MAYV em pacientes de duas regiões distintas do país e em condições epidemiológicas diferentes (epidemia e ausência de epidemia).

A ausência de outros arbovírus nas amostras testadas não significa que estes vírus não estejam circulando no estado e no país. Desta forma, a vigilância é importante a fim de monitorar a circulação e entrada dos arbovírus e assim evitar e/ou controlar o aparecimento de epidemias.

REFERÊNCIAS

Aguilar, P. V., R. M. Robich, *et al.* Endemic eastern equine encephalitis in the Amazon region of Peru. Am J Trop Med Hyg, v.76, n.2, Feb, p.293-8. 2007.

Alice, F. Infecção humana pelo vírus “Leste” de Encefalite Equina. Bol Inst Biol, Bahia, v.v.3, p.p.3-9. 1956.

Anderson, C. R., W. G. Downs, *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. Am J Trop Med Hyg, v.6, n.6, Nov, p.1012-6. 1957.

Araújo, F. A. A., R. S. T. Vianna, *et al.* Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa de Peixe/RS para a detecção de vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. Boletim eletrônico EPIDEMIOLÓGICO, v.4, n.5. 2004.

Ausubel, F. B., R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. Et Al. Preparation and analysis of DNA. In: (Ed.). Short protocols in molecular biology
John Wiley & sons, Inc, 1997. Preparation and analysis of DNA

Azevedo, R. S., M. R. Nunes, *et al.* Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. Emerg Infect Dis, v.13, n.6, Jun, p.912-5. 2007.

Bharaj, P., H. S. Chahar, *et al.* Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. Virology, v.5, p.1. 2008.

Bosch, I., F. Herrera, *et al.* West Nile virus, Venezuela. Emerg Infect Dis, v.13, n.4, Apr, p.651-3. 2007.

Brault, A. C., S. A. Langevin, *et al.* Differential virulence of West Nile strains for American crows. Emerg Infect Dis, v.10, n.12, Dec, p.2161-8. 2004.

Brault, A. C., A. M. Powers, *et al.* Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central, and South America. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.4, Oct, p.579-86. 1999.

Bronzoni, R. V., M. L. Moreli, *et al.* Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.98, n.8, Aug, p.456-61. 2004.

Burke, D. S. e T. P. Monath. Flaviviruses
In: (Ed.). FIELD'S virology
Philadelphia: LWW, v.1, 2001. Flaviviruses

Causey, O., Maroja, Om. Mayaro virus: a new human disease agente. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the River Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as a causative agent. Am J Trop Med Hyg, v.6, p.1017-1023. 1957.

Chambers, T. J., C. S. Hahn, *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol, v.44, p.649-88. 1990.

De Moraes Bronzoni, R. V., F. G. Baleotti, *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol, v.43, n.2, Feb, p.696-702. 2005.

De Paula, S. O. e B. A. Fonseca. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. Braz J Infect Dis, v.8, n.6, Dec, p.390-8. 2004.

Degallier, N. T. D. R., Apa; Vasconcelos, Pfc; Sá Filho, Gc; Travassos Da Rosa, Es; Rodrigues, Sg. Et Al. . An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute. 1998 (Evolutionary aspects of the ecology of arboviruses in Brazilian Amazonia, South America)

Diaz, L. A., V. Re, *et al.* Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. Emerg Infect Dis, v.12, n.11, Nov, p.1752-4. 2006.

Dos Santos, C. S., Mam; Franco, Hm; Oshiro, Fm; Rocco, Im. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.101, n.1, p.57-63. 2006.

Elnifro, E. M., A. M. Ashshi, *et al.* Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev, v.13, n.4, Oct, p.559-70. 2000.

Figueiredo, L. Togaviridae-Alphavirus
In: (Ed.). Virologia Humana
Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. Togaviridae-Alphavirus
p.p.213-222

Figueiredo, L. T. [The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families]. Rev Soc Bras Med Trop, v.23, n.1, Jan-Mar, p.13-8. 1990.

_____. Emergent arboviruses in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, Mar-Apr, p.224-9. 2007.

Figueiredo, L. T., M. A. Owa, *et al.* Laboratory diagnosis and symptoms of dengue, during an outbreak in the Ribeirao Preto region, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.34, n.2, Mar-Apr, p.121-30. 1992.

Figueiredo, L. T., M. C. Simoes, *et al.* Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.83, n.5, Sep-Oct, p.702-7. 1989.

Figueiredo, L. T. D. R., Apa; Fiorillo, Am. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). Revista de Saúde Publica (São Paulo), v.v.20, p.p.204-211. 1986.

Figueiredo, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. Microbes Infect, v.2, n.13, Nov, p.1643-9. 2000.

Figueiredo, L. T. M. e B. A. L. Fonseca. Febre Amarela
In: (Ed.). VERONESI: Tratado de Infectologia
São Paulo: Atheneu, 2005. Febre Amarela
p.389-397

Figueiredo, R. M. P., F. G. Naveca, *et al.* Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. Emerg Infect Dis, v.14, n.4, p.667-669. 2008.

Fonseca, B. A. L. e L. T. M. Figueiredo. Dengue
In: (Ed.). VERONESI: Tratado de Infectologia
São Paulo: Atheneu, 2005. Dengue
p.343-356

Fonseca, B. F., Ltm. Febre Amarela
In: (Ed.). VERONESI: Tratado de Infectologia
São Paulo: Atheneu,, 1996. Febre Amarela
p.251-257

_____. Febre Amarela
In: (Ed.). VERONESI: Tratado de Infectologia
São Paulo: Atheneu, 2002. Febre Amarela

Fulop, L., A. D. Barrett, *et al.* Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. J Virol Methods, v.44, n.2-3, Oct, p.179-88. 1993.

Gould, E. A. e T. Solomon. Pathogenic flaviviruses. Lancet, v.371, n.9611, Feb 9, p.500-9. 2008.

Griffin, D. E. Alphaviruses. In: (Ed.). Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007. Alphaviruses, p.1023-1067

Gupta, E., L. Dar, *et al.* The changing epidemiology of dengue in Delhi, India. Virol J, v.3, p.92. 2006.

Henchal, E. A., S. L. Polo, *et al.* Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Am J Trop Med Hyg, v.45, p.418-428. 1990.

Holmes, E. C. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. Br Med Bull, v.54, n.3, p.533-43. 1998.

Howe, D. K., M. H. Vodkin, *et al.* Use of the polymerase chain reaction for the sensitive detection of St. Louis encephalitis viral RNA. J Virol Methods, v.36, n.1, Jan, p.101-10. 1992.

Iversson, L. C., Tlm; Travassos Da Rosa, Apa; Monath, Tp. Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of rocio encephalitis. . Ciência e Cultura, v.44, p.164-166. 1992.

Iversson, L. T. D. R., Apa; Rodrigues, Sg; Rosa, Mdb. Human disease caused by Venezuelan Equine Encephalitis sub-type IF in Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. New Orleans: Abstracts, v.39. 1990. 143 p. (Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene)

Iversson, L. T. D. R., Apa; Rosa, Mdb. Ocorrência recente de infecção humana por arbovírus rocio na região do Vale do Ribeira. Revista do Instituto de Medicina Tropical (São Paulo), v.v.31, p.28-31. 1989.

Iversson, L. T. D. R., Apa; Travassos Da Rosa, Jfs. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus na população humana na região do Vale do Ribeira. II. Inquérito sorológico em pacientes do Hospital Regional de Pariqueira-Açu, 1980. Revista de Saúde Pública (São Paulo), v.v.15, p.587-602. 1981.

Iversson, L. T. D. R., Apa; Travassos Da Rosa, Jfs; Pinto, Gh; Macedo, O. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus na população humana na região do Vale do Ribeira. IV. Inquérito sorológico em escolas residentes no município de Iguape, SP (Brasil). Revista de Saúde Pública (São Paulo), v.v.17, p.423-435. 1983.

Kao, C. K., Cc; Chao, D; Wu, H; Chang, Gj. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspective in clinical diagnosis and public health J Microbiol Immunol Infect, v.38, n.1, p.5-16. 2005.

Knipe, D. M. H., Peter M. Flaviviridae. In: Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.II. 2007. 1101-1303 p.

Kohl, A., E. F. Dunn, *et al.* Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. J Gen Virol, v.85, n.Pt 11, Nov, p.3269-78. 2004.

Komar, N. e G. G. Clark. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. Rev Panam Salud Publica, v.19, n.2, Feb, p.112-7. 2006.

Kotait, I. B., Pe; Carrieri, MI. Vigilância Epidemiológica das Encefalites Equinas. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA), v.ano 3, n.29. 2006.

Kramer, L. D. e L. J. Chandler. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. Arch Virol, v.146, n.12, Dec, p.2341-55. 2001.

Kramer, L. D., L. M. Styer, *et al.* A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. Annu Rev Entomol, v.53, Jan 7, p.61-81. 2008.

Kuhn, R. J. Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007. Togaviridae: The Viruses and Their Replication, p.1002-1022

Kuno, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. J Virol Methods, v.72, n.1, May, p.27-41. 1998.

Kuno, G., I. Gomez, *et al.* Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg, v.36, n.1, Jan, p.153-9. 1987.

- Lam, W. E. A. Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, v.45, n.11, p.3631–3640. 2007.
- Lindenbach, B. D., H. Thiel, *et al.* Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, p.1101-1152
- Lopes, O. Rocio (ROC) strain SPH 34675. American Journal of Tropical Medical Hygiene, v.27, p.418-419. 1979.
- Lopes, O. S., La; Coimbra, Tlm; Pinto, Ga; Classer, Cm. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. American Journal of Epidemiology, v.108, p.394-401. 1978.
- Lopes, O. S., L. A. Sacchetta, *et al.* Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. American Journal of Tropical Medical Hygiene, v.28, p.583-585. 1979.
- Miagostovich, M. P., R. G. Ramos, *et al.* Retrospective study on dengue fatal cases. Clin Neuropathol, v.16, n.4, Jul-Aug, p.204-8. 1997.
- Monath, T. P. Yellow fever: an update. Lancet Infect Dis, v.1, n.1, Aug, p.11-20. 2001.
- Mondini, A., R. V. Bronzoni, *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. J Clin Virol, v.40, n.1, Sep, p.84-6. 2007.
- Mondini, A., I. L. Cardeal, *et al.* Saint Louis encephalitis virus, Brazil. Emerg Infect Dis, v.13, n.1, Jan, p.176-8. 2007.
- Morales-Betoulle, M. E., H. Morales, *et al.* West Nile virus in horses, Guatemala. Emerg Infect Dis, v.12, n.6, Jun, p.1038-9. 2006.
- Morales, M. A., M. Barrandeguy, *et al.* West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. Emerg Infect Dis, v.12, n.10, Oct, p.1559-61. 2006.
- Murray, P. R., Ks; Pfaller, Ma. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006
- Nathanson, N. Epidemiology. In: D. M. H. Knipe, P. M. (Ed.). Fields Virology, v.1, 2007. Epidemiology, p.424-446
- Navarro, J. C., G. Medina, *et al.* Postepizootic persistence of Venezuelan equine encephalitis virus, Venezuela. Emerg Infect Dis, v.11, n.12, Dec, p.1907-15. 2005.
- Nunes, M. C., Itmm; Rodrigues, Sg; Cruz, Acr; Travassos Da Rosa, Apa; Shope, Re; Tesh, Rb; Vasconcelos, Pfc. Nucleotide sequence determination of the SRNA segment of oropouche virus strain isolated from a monkey in Minas Gerais state (abstract). Virus Review and Research, v.7, p.91. 2002.
- Nunes, M. R., L. C. Martins, *et al.* Oropouche virus isolation, southeast Brazil. Emerg Infect Dis, v.11, n.10, Oct, p.1610-3. 2005.
- Osorio, J. Y., Tm. Venezuelan Equine Encephalitis In: (Ed.). BERAN, GW. Handbook of Zoonoses. Boca Raton: CRC Press, 1997. Venezuelan Equine Encephalitis p.33-46
- Peters, C. J. Emerging Viral Diseases. In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2007. Emerging Viral Diseases, p.605-625
- Pinheiro, F. P., R. B. Freitas, *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. Am J Trop Med Hyg, v.30, n.3, May, p.674-81. 1981.
- Pinheiro, F. P., J. W. Leduc, *et al.* Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.30, n.1, Jan, p.145-8. 1981.
- Pinheiro, F. P., A. P. Travassos Da Rosa, *et al.* Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. Am J Trop Med Hyg, v.30, n.1, Jan, p.149-60. 1981.

- Pinheiro, F. P., A. P. A. Travassos Da Rosa, *et al.* Febre por Oropouche. In: R. N. Q. D. L. (Coordenador) (Ed.). Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: UEPA: Instituto EvandroChagas, 1997. Febre por Oropouche, p.285-298
- Pupo, M., M. G. Guzman, *et al.* West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. Emerg Infect Dis, v.12, n.6, Jun, p.1022-4. 2006.
- Puri, B., E. A. Henchal, *et al.* A rapid method for detection and identification of flaviviruses by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Arch Virol, v.134, n.1-2, p.29-37. 1994.
- Reina, M. F., Ac; Fernandes, Fc; Silva, Jam; Garcia, Mho; Lise, Mlz; Katz, G; Spinola, R. Investigação de casos de Encefalite Viral de Saint Louis, notificados no município de São José do Rio Preto – SP, agosto de 2006. Nota técnica – Secretária de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controles de Doenças/ Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. 2006.
- Ribeiro, A. F., G. R. Marques, *et al.* [Association between dengue incidence and climatic factors]. Rev Saude Publica, v.40, n.4, Aug, p.671-6. 2006.
- Rocco, I. M., C. L. Santos, *et al.* St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.47, n.5, Sep-Oct, p.281-5. 2005.
- Saeed, M. F., L. Li, *et al.* Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus Bunyavirus. J Gen Virol, v.82, n.Pt 9, Sep, p.2173-81. 2001.
- Saeed, M. F., H. Wang, *et al.* Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. J Gen Virol, v.81, n.Pt 3, Mar, p.743-8. 2000.
- Samuel, P. P. e B. K. Tyagi. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. Indian J Med Res, v.123, p.615-628. 2006.
- Scandar, S. A. S., R. P. Cardoso Junior, *et al.* Serological survey after Dengue outbreak Paraiso city - São Paulo state. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.62, n.2, p.83-89. 2003.
- Schaeffer, M., Gajdusek, Dc, Lema, Ab, Eichesewald, H. Epidemic jungle fevers among Okinawan colonists in the Bolivian rain forest. I. Epidemiology. Am J Trop Med Hyg, v.8, p.372-396. 1959.
- Schmaljohn, C. S. N., S.T. Bunyaviridae. In: (Ed.). Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007. Bunyaviridae, p.1741 - 1789
- Shope, R. E. e G. E. Sather. Arboviruses. In: F. H. Lennet e N. J. Schmidt (Ed.). Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Washington: American Public Health Association, 1979. Arboviruses, p.767-814
- Silva-Nunes, M., S. Malafronte Rdos, *et al.* The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. Cad Saude Publica, v.22, n.6, Jun, p.1325-34. 2006.
- Storch, G. Diagnostic Virology. In: D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.). Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2007. Diagnostic Virology, p.566-604
- Straatmann, A., S. Santos-Torres, *et al.* [Serological evidence of the circulation of the Rocio arbovirus (Flaviviridae) in Bahia]. Rev Soc Bras Med Trop, v.30, n.6, Nov-Dec, p.511-5. 1997.
- Strauss, J. H. e E. G. Strauss. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol Rev, v.58, n.3, Sep, p.491-562. 1994.
- Talarmin, A., Chandler, Lj Et Al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification and seroprevalence. Am Soc J Trop Med Hyg, v.59, n.3, p.452-456. 1981.
- Travassos Da Rosa, A. P., S. G. Rodrigues, *et al.* [Outbreak of oropouche virus fever in Serra Pelada, municipality of Curionopolis, Para, 1994]. Rev Soc Bras Med Trop, v.29, n.6, Nov-Dec, p.537-41. 1996.

Travassos Da Rosa, A. T. D. R., Jfs; Pinheiro, Fp; Vasconcelos, Pfc. Arboviroses. In: (Ed.). de LEÃO, RNQ. Doenças Infeciosas e Parasitárias: enfoque amazônico. Belém: CEJUP, 1997. Arboviroses, p.207-22

Travassos Da Rosa, J. T. D. R., Apa; Vasconcelos, Pfc; Pinheiro, Fp; Rodrigues, Sg; Travassos Da Rosa, Es Et Al. Arboviroses isolates in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology form man. In: (Ed.). An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute, 1998. Arboviroses isolates in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology form man, p.19-31

Vasconcelos, P. F. [Yellow Fever]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.2, Mar-Apr, p.275-93. 2003.

Vasconcelos, P. F., J. F. Da Rosa, *et al.* [Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.33, n.6, Nov-Dec, p.465-76. 1991.

Vasconcelos, P. F. C., A. P. A. Travassos Da Rosa, *et al.* Arboviruses pathogenic for man in Brazil In: (Ed.). TRAVASSOS da ROSA, APA; VASCONCELOS, PFC; TRAVASSOS da ROSA, JFS. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute, 1998. Arboviruses pathogenic for man in Brazil p.72-99

_____. Arboviroses. In: (Ed.). VERONESI: Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 2005. Arboviroses, p.289-302

Vasconcelos, P. T. D. R., Apa; Degallier, N; Travassos Da Rosa, Jfs; Pinheiro, Fp. Ciência e Cultura, v.44, p.117-124. 1992.

Zusinaite, E., K. Tints, *et al.* Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. J Gen Virol, v.88, n.Pt 7, Jul, p.1977-85. 2007.