

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DE ZIKA VÍRUS EM PRIMATAS
NÃO HUMANOS NEOTROPICAIS NOS ESTADOS DO PARANÁ,
SÃO PAULO E PARAÍBA, BRASIL

AMANDA HAISI

Botucatu – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DE ZIKA VÍRUS EM PRIMATAS
NÃO HUMANOS NEOTROPICAIS NOS ESTADOS DO PARANÁ,
SÃO PAULO E PARAÍBA, BRASIL

AMANDA HAISI

Dissertação apresentada junto
ao Programa de pós-graduação
em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre

Orientador: João Pessoa Araújo Junior
Coorientadora: Leila Sabrina Ullmann

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Haisi, Amanda.

Investigação laboratorial de Zika vírus em primatas não humanos neotropicais nos estados do Paraná, São Paulo e Paraíba, Brasil / Amanda Haisi. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Leila Sabrina Ullmann

Capes: 50502000

1. Primatas não humanos. 2. Arbovírus. 3. Zika vírus.
4. Sorologia. 5. Saúde pública.

Palavras-chave: Arbovírus; Ciclo silvestre; RT-qPCR; Saúde pública; Sorologia.

Nome do Autor: Amanda Haisi

Título: INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DE ZIKA VÍRUS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NEOTROPICAIS NOS ESTADOS DO PARANÁ, SÃO PAULO E PARAÍBA, BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/São Paulo

Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda

Membro Titular

Centro Interdisciplinar de Ciências da Vida

Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA – Foz do Iguaçu/Paraná

Prof. Dra. Juliana Arena Galhardo

Membro Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Data da defesa: 09/06/2021

AGRADECIMENTOS

“Todas as pessoas que passam em nossas vidas, deixam um pouco de si e levam um pouco de nós...”

Portanto, eu agradeço a todas essas pessoas que de alguma forma deixaram a minha vida um pouco mais alegre, um pouco mais mágica, e um pouco mais família... Espero ter contribuído com um pouquinho da minha essência na vida de vocês!

Neste momento gostaria de agradecer...

Aos meus pais, Rogério e Matilde, e ao meu irmão Vitor, por todo o amor e confiança. O apoio de vocês sempre foi e está sendo fundamental para meu crescimento profissional. Obrigado por sempre apoiarem minhas decisões e incentivarem meus sonhos. Amo vocês!

Aos meus avós, Edward Dwulatka, Elena Dwulatka Haisi, e Maria Rosa Haisi, por todo o amor e compreensão.

Aos meus professores da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos profissionais e acadêmicos, em especial ao meu orientador de iniciação científica e graduação Alexander Welker Biondo, por me incentivar a buscar novos horizontes ou “bons ares” em Botucatu-SP.

Aos meus amigos, Cintia Ferreira, Erick Zanello Milléo, Gabriela Regina Costa, Hendyel Pacheco, Lucas Galdioli, Mariana Melânia Cristofolini, Natalia Lara e Rafaela Kava, que mesmo à distância, estão torcendo pela minha felicidade. ‘Agradeço por estarem sempre presentes e me ajudando a superar desafios. Vocês são o presente que Deus colocou na minha vida.

A Hendyel Pacheco, Mariana Melânica Cristofolini, Melissa Garcia, Matheus Larry e Rauane Moura por se tornarem minha família de coração em Curitiba-PR. Nunca esqueçam que “LAR é onde o amor está”. Obrigada pelos anos que compartilhamos a nossa casinha, seja a 11B ou 12B.

Ao meu namorado, Samir Moura Kadri por todo o amor, carinho e incentivo. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Te amo!

Aos meus amigos de laboratório, que me ajudaram e continuam me auxiliando em todos os momentos! Obrigada pelo tempo dedicado à nossa amizade, desde aos trabalhos de bancada, os churrascos e até conversas mais animadas no café (com bolo, sempre). Obrigada!

Ao Médico Veterinário Zalmir Silvino Cubas e toda a equipe do Refúgio Biológico Bela Vista – ITAIPU-PR, por me acolherem tão bem durante as coletas dos primatas, e principalmente a Stacy Wu pela colaboração no trabalho a campo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e aos coordenadores do curso;

Ao financiamento concedido pela bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) (2019/05288-9);

Ao meu orientador Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior, por acreditar no meu potencial, por me apoiar no desenvolvimento desta pesquisa e nas próximas que ainda virão! Sou grata por fazer parte do seu grupo de pesquisa, esses dois anos foram de muito aprendizado! Meus sinceros agradecimentos!

A minha coorientadora, companheira de bancada e de boas risadas, Leila Sabrina Ullmann, obrigada por me apoiar nas eventuais dificuldades e incertezas mostrando que é possível superar qualquer problema com dedicação e esforço. Obrigada por nossa amizade!

O sonho

Sonhe com aquilo que você quiser.

*Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só se
tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que
passam por suas vidas.*

Clarice Lispector

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição por espécie, local de origem e sexo dos primatas neotropicais recolhidos no estado de São Paulo (2018).....	35
TABELA 2 - Distribuição das amostras de tecido dos primatas neotropicais provenientes de São Paulo (2018).	36
TABELA 3 - Distribuição por espécie, origem e sexo dos primatas neotropicais coletados no estado da Paraíba (2018 e 2019).....	36
TABELA 4 - Distribuição das amostras de tecido dos primatas neotropicais provenientes da Paraíba (2018 e 2019).	37
TABELA 5 - Distribuição por sexo dos primatas neotropicais de vida livre capturados na Área de Proteção Permanente - Itaipu Binacional, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).	40
TABELA 6 - Distribuição por espécie e sexo dos primatas neotropicais coletados no Zoológico Rogério Ribas Lange, município de Foz do Iguaçu-PR (2020)...	41
TABELA 7 - Distribuição por espécie e sexo dos primatas neotropicais coletados no Zoológico Bosque do Guarani, Foz do Iguaçu-PR (2020).	41
TABELA 8 – Resultado das análises sorológicas para Zika vírus de 58 primatas não humanos do município de Foz do Iguaçu-PR.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Macaco-prego (<i>Sapajus nigritus</i>) de vida livre capturado próximo ao recinto dos primatas não humanos na Área de Proteção Permanente da Itaipu-Binacional, Foz do Iguaçu – PR (2020).....	38
FIGURA 2 - Recinto dos macaco-pregos (<i>Sapajus nigritus</i>) no Zoológico Rogério Ribas Lange, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).....	38
FIGURA 3 - Recinto dos primatas não-humanos no Zoológico Bosque do Guarani, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).	39
FIGURA 4 - Coleta de sangue da veia femoral de um macaco-prego (<i>Sapajus nigritus</i>) macho de vida-livre da Área de Proteção Permanente - Itaipu Binacional, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).....	40
FIGURA 5 - Curva de dissociação dos amplicons na reação com SYBR® Green para detecção de Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.	49
FIGURA 6 - Amplificação do controle positivo de Zika vírus proveniente de cultivo celular referente à curva de eficiência com SYBR® Green.	49
FIGURA 7 - Temperaturas de dissociação dos controles positivos para DENV e ZIKV.....	50
FIGURA 8 - Amplificação do controle positivo para Zika vírus proveniente de cultivo celular referente à curva de eficiência com TaqMan®.	51

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Curva de Eficiência da reação com SYBR® Green para detecção do Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.	48
GRÁFICO 2 - Curva de Eficiência do ensaio com TaqMan® para detecção de Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
CAL	Calibrador
Cap	Nucleotídeo alterado (GMP metilado) localizado na extremidade 5' do genoma.
CHIKV	Vírus Chikungunya
cm	centímetros
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D.O	Densidade óptica
DENV	Vírus Dengue
dpi	dias pós infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês " <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> "
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática, do inglês " <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> "
GBS	Síndrome de Guillain –Barré
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFA	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	quilobase

Kg	quilograma
M	Molar
MAC-ELISA	<i>Immunoglobulin M antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção enzimática de captura para imunoglobulina M)
MEM 1x	<i>Minimum Essential Medium</i> (Meio de cultivo - Earle)
μL	microlitro
mg	miligramas
mL	mililitro
nm	nanômetro
Mtase	Metiltransferase
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
NS5	Proteína não estrutural 5
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
p.f.u	<i>plates forming units</i> (unidades formadoras de placa)
pM	picoMol
PNH	Primata não humano
Poli- A	Cauda poli A
prM	Proteína precursora pré-membrana
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i> (Teste de Neutralização por Redução de placas de lise)
R ²	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RpRd	RNA polimerase RNA dependente
RT	Transcriptase reversa

RT- PCR	Reação de Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeira da polimerase
RT-qPCR	Reação de Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeira da polimerase em tempo real
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SNC	Sistema nervoso central
TE	Tris-EDTA
TMB	3,3',5,5'- tetramethylbenzidine
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Região não-traduzida do genoma)
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow fever virus
ZIKV	Zika vírus
β-ME	β-mercaptoethanol

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O Zika Vírus	18
2.2 O Zika vírus: sua descoberta, emergência e consequências à saúde publica ..	19
2.3 Transmissão do Zika vírus.....	22
2.3.1 Transmissão vetorial	22
2.3.2 Transmissão não associada a vetores.....	25
2.4 Diagnóstico laboratorial	26
2.4.1 Diagnóstico molecular	26
2.4.2 Diagnóstico sorológico	27
2.5 A importância dos primatas não humanos no estudo das arboviroses	30
2.6 Primatas não humanos neotropicais e o Zika vírus	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Local do Estudo	34
4.2 Amostras.....	35
4.2.1 Amostras provenientes do estado de São Paulo.....	35
4.2.2 Amostras provenientes do estado da Paraíba	36
4.2.3 Amostras provenientes do estado do Paraná	37
4.2.3.1 Animais de vida livre	39
4.2.3.2 Animais de cativeiro	41
4.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA ZIKA VIRUS (ZIKV)	42
4.3.1 Extração de RNA	42
4.3.2 Reação de RT-PCR em tempo real	42
4.3.2.1 SYBR® Green RT-qPCR	42
4.3.2.2 TaqMan® RT-qPCR.....	43

4.3.3	Determinação da eficiência e especificidade das reações de RT-PCR em tempo real	43
4.4	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	44
4.4.1	ELISA indireto.....	44
4.4.2	Reação de Neutralização por redução de placas – PRNT	45
5.	ASPECTOS ÉTICOS	47
6.	RESULTADOS	48
6.1	Eficiência e especificidade das reações de SYBR® Green RT-qPCR e TaqMan® RT qPCR	48
6.2	Detecção molecular e análise sorológica para Zika vírus	52
7.	DISCUSSÃO	55
8.	CONCLUSÕES	58
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10.	TRABALHO CIENTÍFICO	73
11.	ANEXOS.....	86

HAISI, A., Investigação laboratorial de Zika vírus em primatas não humanos neotropicais nos estados do Paraná, São Paulo e Paraíba, Brasil, 2021. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, similar a outros arbovírus de interesse para a saúde pública. Sua descoberta ocorreu em 1947 com o isolamento em macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*), sentinela no controle de Febre Amarela na floresta de Uganda, África. Devido ao conhecimento limitado sobre o papel dos primatas neotropicais nos ciclos de transmissão do ZIKV, o objetivo deste trabalho foi obter evidências da circulação enzoótica do vírus Zika em PNH em amostras obtidas em três estados brasileiros: São Paulo, Paraíba e Paraná, especialmente na interface entre ambiente urbano e áreas florestais. Amostras de tecidos (baço, coração, fígado, pulmão, rim e cérebro) (n=75) foram coletadas *post mortem* de 34 carcaças de PNH nos estados de São Paulo e Paraíba, e amostras de sangue total (n=66) e soro sanguíneo (n=58) foram obtidas de 66 PNH visivelmente saudáveis em Foz do Iguaçu-PR, totalizando 100 primatas neotropicais. Todas as amostras de tecido e sangue total (n= 141) foram testadas no RT- qPCR TaqMan® utilizando como alvo o gene do envelope (E). Amostras de soro sanguíneo foram submetidas à detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV e anticorpos neutralizantes por ELISA comercial indireto e Teste de Redução de Placas de Lise (PRNT), respectivamente. Todas as amostras (141) testaram negativas no RT-qPCR TaqMan®, indicando a ausência de infecção ativa em 100 PNH coletados. Similarmente, todas as amostras de soro (n=58) foram consideradas negativas nas análises sorológicas para ZIKV, demonstrando ausência de exposição prévia dos PNH de cativeiro e vida livre de Foz do Iguaçu-PR. Em conclusão, não foram encontrados indícios de circulação viral nos PNH durante o período analisado. Estes resultados, mesmo que negativos, contribuem consideravelmente para a epidemiologia e vigilância de ZIKV em populações silvestres.

Palavras-chave: Arbovírus; ciclo silvestre; RT-qPCR; saúde pública; sorologia.

HAISI, A. Laboratorial investigation of Zika virus in non-human primates from Paraná, São Paulo and Paraíba states, Brazil. 2021, 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The Zika virus belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, similar to other arboviruses of public health interest. Its discovery occurred in 1947 with the isolation in captive Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), sentinel in the control of yellow fever at the Uganda forest. Due to the limited knowledge about the role of neotropical primates in ZIKV transmission cycles, the aim of this work was to obtain evidence of enzootic circulation of ZIKV in NHPs from three Brazilian states: São Paulo, Paraíba and Paraná, especially at the interface between urban environment and forest areas. Tissue samples (spleen, heart, liver, lung, kidney and brain) (n=75) were collected post mortem from 34 NHP carcasses from São Paulo and Paraíba state, and blood (n=66) and serum samples (n=58) were obtained from 66 NHP visibility health from Foz do Iguaçu-PR, totaling 100 neotropical primates. All tissue and blood samples (n=141) were tested using a RT-qPCR TaqMan® targeting the envelope gene (E). Serum samples were subjected to detection of anti-ZIKV IgG antibodies and neutralizing antibodies by a commercial indirect ELISA and plaque reduction neutralization test (PRNT), respectively. All samples (n=141) tested negative in the RT-qPCR TaqMan® assay, suggesting the absence of active infection in 100 NHPs collected. Similarly, all serum (n=58) were negative in serological assays for ZIKV, demonstrating the absence of previous viral exposure of captive and free-ranging NHPs from Foz do Iguaçu-PR. In conclusion, no evidences of viral circulation were found in the NHPs during the analyzed period. These results, even if negative, considerably contribute to the epidemiology and surveillance of ZIKV in sylvatic populations.

Key words: Arboviruses; sylvatic cycle; RT-qPCR; public health; serology.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 60% das doenças emergentes infecciosas em humanos tiveram origem em ciclos enzoóticos. Além disso, cerca de 70% dos eventos zoonóticos tiveram origem em hospedeiros selvagens (JONES et al., 2008), como observado em algumas arboviroses de importância para a saúde pública (HANLEY et al., 2013).

Os arbovírus (*arthropod-borne viruses*) compõem um grupo diverso de vírus que causam grande impacto na saúde animal e pública a nível mundial. São transmitidos biologicamente por vetores hematófagos (mosquitos, moscas e carrapatos) aos hospedeiros vertebrados através do repasto sanguíneo. Por definição, a transmissão biológica envolve um ciclo replicativo do vírus no vetor artrópode antes da transmissão aos hospedeiros (WEAVER; REISEN, 2010).

Esse grupo de vírus é composto majoritariamente por vírus de RNA, incluindo a família viral *Flaviviridae* composta por quatro gêneros (*Flavivirus*; *Hepacivirus*; *Pegivirus* e *Pestivirus*). Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são transmitidos principalmente por mosquitos vetores e apresentam grande importância para a saúde pública como o vírus da Dengue (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV) e o Zika vírus (ZIKV) (VASILAKIS; WEAVER, 2018).

Uma abordagem interdisciplinar no estudo das arboviroses torna-se de grande importância para iniciativas de prevenção e controle. O conceito de Saúde Única enfatiza essa conexão entre a saúde humana e animal, levando em consideração os fatores ambientais, como mudanças climáticas, desmatamento e fragmentação de habitats, devido a associação direta desses fatores com a multiplicação de vetores artrópodes e transmissão de patógenos emergentes e re-emergentes (RABINOWITZ et al., 2018).

Além disso, a expansão populacional humana e o aumento das atividades dentro do habitat silvestre podem se tornar uma grande ameaça à saúde pública e à conservação da biodiversidade, por potencializar a troca multidirecional de patógenos entre humanos e fauna silvestre, inclusive envolvendo os primatas não-humanos (PNH) (CALVIGNAC-SPENCER et al., 2012; GILLESPIE; NUNN; LEENDERTZ, 2008).

Os PNH são os animais filogeneticamente mais próximos aos seres humanos e, apesar de representarem apenas 0,5% das espécies de vertebrados, contribuem com a origem de aproximadamente 20% das principais doenças humanas, incluindo as arboviroses, como a Dengue (DENV) , Febre Amarela (YFV) (WOLFE; DUNAVAN; DIAMOND, 2007), Chikungunya (CHIKV) e o vírus Zika (ZIKV) (WEAVER et al., 2018).

Na África, o vírus Zika manteve-se em um ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos e mosquitos do gênero *Aedes* spp. Durante muitos anos somente casos esporádicos foram descritos na população humana e pouca atenção foi dada a este novo patógeno emergente até a primeira grande epidemia na ilha Yap, exatamente 60 anos após a sua descoberta. Neste episódio epidêmico, estima-se que $\frac{3}{4}$ da população acima de 3 anos foram infectadas (DUFFY et al., 2009). Desde então, a circulação do vírus ocorre por meio de um ciclo urbano envolvendo seres humanos infectados, como hospedeiros amplificadores, e mosquitos antropofílicos, principalmente *Aedes aegypti* e secundariamente *Aedes albopictus* como principais transmissores vetoriais (BOYER et al., 2018; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Nas Américas, apesar dos relatos de detecção molecular do ZIKV em PNH (DE ALMEIDA et al., 2019; FAVORETTO et al., 2016; TERZIAN et al., 2018), pouco se conhece a respeito do potencial envolvimento dos primatas neotropicais no ciclo epidemiológico do vírus e sobre o potencial estabelecimento de um ciclo silvestre, semelhante ao que ocorre com o vírus da febre amarela e primatas neotropicais nas Américas (ALTHOUSE et al., 2016).

Esta ordem de mamíferos pode atuar também como “animais sentinela” predizendo informações importantes para a saúde única, seja por indicar superexposição humana a toxinas ambientais (ENGEL et al., 2010) ou até mesmo como indicadores da circulação de agentes infecciosos (CALVIGNAC-SPENCER et al., 2012), como o ZIKV (DE ALMEIDA et al., 2019; FAVORETTO et al., 2016; TERZIAN et al., 2018; VANCHIERE et al., 2018).

Portanto a proposta desta pesquisa foi buscar evidências da circulação do vírus Zika em um ciclo de transmissão envolvendo primatas neotropicais em três regiões dos estados do Paraná, São Paulo e Paraíba utilizando técnicas moleculares e sorológicas, especialmente na interface entre ambiente urbano e áreas florestais devido à proximidade destes mamíferos com os seres humanos

e pela possibilidade do estabelecimento de um ciclo silvestre do ZIKV no Brasil (FAVORETTO et al., 2016; TERZIAN et al., 2018).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.10 Zika Vírus

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, juntamente com outros arbovírus de importância para a saúde pública, como o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (VASILAKIS; WEAVER, 2018). Trata-se de um vírus RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11kb de tamanho, apresenta *cap* na extremidade 5' e ausência de cauda poli-A, além disso seu genoma codifica cerca de 3.419 aminoácidos (HAYES, 2009).

Possui uma única sequência de leitura aberta, do inglês “*open read frame*” (ORF) codificadora de uma grande poliproteína. Esta sequência está localizada entre duas regiões não traduzidas (UTRs) (KUNO; CHANG, 2007) e com o auxílio das proteases virais e hospedeiras são originadas 10 proteínas a partir da sua clivagem, das quais 7 são proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) que desempenham funções primordiais na replicação viral, processamento da poliproteína e manipulação da resposta imune do hospedeiro, e 3 proteínas estruturais que desempenham funções essenciais para a formação da partícula viral: proteína C, proteína M e proteína E (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; SHI; GAO, 2017; ZHAO et al., 2016).

Em especial, a proteína não-estrutural NS5 codifica aproximadamente 904 aminoácidos e compreende dois domínios conectados por um “*linker*”, um domínio RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) localizada no terminal C e o domínio da metiltransferase (MTase) localizada no terminal N, ambos atuam desempenhando papéis fundamentais da replicação viral.

A RpRd realiza a síntese *de novo* do genoma viral, onde os trifosfatos dos nucleotídeos servem como primer para a polimerização, já a MTase adiciona um *cap* na extremidade 5' facilitando a tradução da poliproteína e diminuindo a resposta humoral inata do hospedeiro (ZHAO et al., 2017).

A respeito das proteínas estruturais, a proteína C possui a capacidade de associar suas múltiplas cópias formando o nucleocapsídeo icosaédrico. Já a proteína E está intimamente correlacionada com a ligação ao receptor, fusão de membrana e reconhecimento imunológico do hospedeiro. A proteína estrutural M é originada da clivagem da proteína precursora pré-membrana – prM, sua interação com a proteína E tem a capacidade de mediar negativamente a ligação ao receptor e a fusão prematura do vírus com membrana do hospedeiro (SHI; GAO, 2017; ZHAO et al., 2016).

Com o intuito de compreender a expansão global do ZIKV, diversas análises evolutivas foram realizadas ao longo dos anos, entretanto ainda existem lacunas sobre a dispersão do vírus e suas linhagens, principalmente pela ausência de dados de sequência por quase 41 anos, desde a primeira cepa asiática isolada na Malásia chamada “P6-740” até a primeira epidemia na Ilha Yap em 2007 (GARCIA; MARCHETTE; RUDNICK, 1969).

As primeiras análises filogenéticas sugeriram a existência de três linhagens geograficamente distintas, a Leste Africana, Oeste Africana e a Asiática (LANCIOTTI et al., 2008), entretanto poucas sequências genéticas foram utilizadas no estudo e segundo análises mais recentes, são consideradas duas grandes linhagens, a Africana e a Asiática (HADDOW et al., 2012; SHAO et al., 2020; WANG et al., 2016), sendo a última considerada como a responsável pela cepa epidêmica de Zika vírus em 2015 (FARIA et al., 2016).

2.2 O Zika vírus: sua descoberta, emergência e consequências à saúde pública

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*) proveniente da Floresta Zika em Uganda (África) durante o programa de vigilância de epizootias para a Febre Amarela. Posteriormente, em 1948 mosquitos da espécie *Aedes africanus* foram encontrados naturalmente infectados na mesma região (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), subsequentemente na República Centro Africana (BERTHET; KAMGANG; SELEKON, 2014) e Senegal (DIALLO et al., 2014). Novos isolamentos virais foram relatados em uma variedade de *Aedes* spp. silvestres

na África como *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. vittatus* (DIALLO et al., 2014), *Ae. jamoti* e *Ae. opok* (FAYE et al., 2008) e *Ae. apicoargenteus* (MCCRAE; KIRYA, 1982).

Os primeiros casos humanos foram descritos em 1954 durante a epidemia de uma doença semelhante à dengue na Nigéria, dos três pacientes descritos, apenas um dos casos houve sucesso no isolamento do vírus Zika em camundongos (MACNAMARA, 1954). Após, apenas casos esporádicos e evidências sorológicas foram relatadas na África e Ásia (FAGBAMI, 1979; MACNAMARA, 1954; OLSON et al., 1981).

A primeira evidência da transmissão por vetor doméstico ocorreu com o isolamento do vírus Zika em *Aedes aegypti* na península da Malásia em 1966, sendo considerada também a primeira detecção do vírus fora do continente africano (GARCIA; MARCHETTE; RUDNICK, 1969).

Apenas casos esporádicos foram relatados em humanos até o surgimento de um cenário epidêmico em 2007 envolvendo aproximadamente 5.000 pessoas na ilha-estado Yap, uma pequena ilha da Micronésia (DUFFY et al., 2009). Este foi considerado o primeiro e grande surto envolvendo humanos e a linhagem asiática do vírus. Nesta ocasião, o mosquito *Aedes hensilli* foi o possível vetor responsável pela transmissão de ZIKV na ilha, e apesar de não haver o isolamento do vírus na população de mosquitos durante o surto, as evidências de que a espécie era o vetor mais provável de transmissão de dengue na ilha em 1995, sugerem que possivelmente este foi o vetor envolvido na transmissão de ZIKV durante a epidemia (DUFFY et al., 2009; SAVAGE et al., 1998).

Em outubro de 2013 na Polinésia Francesa houve o primeiro grande surto envolvendo pela primeira vez complicações neurológicas e autoimunes, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (IOOS et al., 2014). Surtos foram posteriormente relatados em outras ilhas do Oceano Pacífico (WIKAN; SMITH, 2016), incluindo a Nova Caledônia devido à introdução de casos importados oriundos da Polinésia Francesa durante novembro de 2013 (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015).

Na América do Sul, a transmissão autóctone foi confirmada na Ilha de Páscoa (Chile) em 2014 (TOGNARELLI et al., 2016). Curiosamente, o primeiro caso autóctone brasileiro foi detectado molecularmente no nordeste brasileiro em 2015 (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Segundo Thezé et al. (2018), a rota de entrada do ZIKV nas Américas ainda permanece incerta, principalmente devido à escassez de dados genéticos que dificulta ainda mais a compreensão da epidemiologia genômica da emergência do vírus na América do Sul. Até o momento, existem quatro hipóteses levantadas para explicar a introdução do vírus no Brasil. A primeira sugere que a entrada do vírus no país havia ocorrido em 2014 durante o campeonato da Copa do Mundo (ZANLUCA et al., 2015). Na segunda hipótese, sugere-se o Campeonato Mundial de Canoagem Sprint (MUSSO; CAO-LORMEAU; GLUBER, 2015) realizando no mesmo ano no Rio de Janeiro, o que não explica o número de casos concentrados no Nordeste do país (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Já a terceira hipótese sugere a introdução da cepa asiática do vírus durante a Copa das Confederações entre junho a agosto de 2013, teoria sustentada pela homologia entre a amostra brasileira com a cepa circulante na Polinésia e pela técnica do relógio molecular, que avalia a relação entre taxa de mutação com o tempo necessário para a divergência da cepa viral (FARIA et al., 2016; PINTO JUNIOR et al., 2015).

Por fim, sugere-se ainda que o vírus provavelmente circulou na Oceania e Ilha de Páscoa, chegando à América Central e Ilhas do Caribe antes de ser introduzido no Brasil e outros países da América do Sul (DE LIMA CAMPOS et al., 2018). Em contrapartida, implica-se também a possível introdução a partir do Brasil para a América Central, emergindo em Honduras entre julho a setembro de 2014 e, posteriormente se espalhando pela Guatemala, Nicarágua e México (THÉZÉ et al., 2018).

Além da SGB, outra apresentação clínica desafiadora foi observada no território brasileiro, a Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017; OLIVEIRA et al., 2016) caracterizada pela infecção fetal durante a vida intrauterina, causando danos neurológicos estruturais como morfologia craniana alterada, anomalias cerebrais e oculares, contraturas congênitas e danos funcionais relacionados ao comprometimento neurológico (MOORE et al., 2018).

No Brasil, o aumento de casos de microcefalia em recém-nascidos foi identificado em setembro de 2015, correlacionando temporalmente e geograficamente com os casos de infecção materna em Pernambuco (OLIVEIRA

et al., 2016). O mesmo foi observado em estudo retrospectivo na Polinésia Francesa, entretanto não foi estabelecido onexo causal durante a ocorrência do surto durante os anos de 2013 a 2014 (CAUCHEMEZ et al., 2016), o que impossibilitou medidas de monitoramento adequadas.

Haviam sido notificados cerca de 30 mil casos prováveis de Zika vírus no Brasil até janeiro de 2016, sendo 93% provenientes do nordeste do país (FARIA et al., 2016). Portanto, com a disseminação do vírus e relatos de doenças neurológicas e malformações neonatais, a Organização Mundial da Saúde declarou, em fevereiro de 2016, situação de emergência de saúde pública de preocupação internacional (WHO, 2016).

Em relação à situação epidemiológica do Zika vírus no Brasil, durante o ano de 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis de infecção e durante o ano de 2017 cerca de 17.593 casos prováveis foram registrados. Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, no ano de 2018 foram notificados 8.060 casos prováveis de infecção, correspondendo a uma taxa de infecção e 4,2 casos por 100 mil habitantes. A região Sudeste apresentou a maior porcentagem de casos prováveis (3.149; 36,3%), seguido das regiões nordeste (2.425; 27,9%) e a região sul (47; 0,5%) com o menor número de registros prováveis de infecção por ZIKV (BRASIL, 2019).

Um decréscimo ainda maior no número de notificações dessa arbovirose está sendo observada no Brasil. Em 2021 foram notificados até a semana epidemiológica 17, que compreende os meses de fevereiro a abril, aproximadamente 1.431 casos prováveis correspondendo a uma taxa de incidência de 0,7 casos por 100 mil habitantes, e em relação ao ano de 2020 houve uma diminuição de 38,9% no número de casos (BRASIL, 2021).

2.3 Transmissão do Zika vírus

2.3.1 Transmissão vetorial

São reconhecidos dois ciclos de transmissão vetorial, o primeiro denominado de ciclo silvestre enzoótico com a participação de primatas não-humanos (PNH) e mosquitos silvestres, principalmente na África; e o segundo

chamado de ciclo urbano envolvendo seres humanos, que podem atuar como hospedeiros reservatórios e/ ou de amplificação, e mosquitos antropofílicos principalmente *Aedes aegypti* e, secundariamente, *Aedes albopictus* (BOYER et al., 2018).

O Zika vírus, assim como outros *Flavivirus*, são transmitidos por mosquitos, principalmente do gênero *Aedes* spp. (IOOS et al., 2014; MARCONDES; XIMENES, 2016). Dentre as espécies, o *Ae. aegypti* é considerado o principal vetor transmissor no ciclo urbano (WEAVER et al., 2018), apoiado pelo isolamento repetido do vírus em mosquitos coletados a campo (DIALLO et al., 2014; DÍAZ- QUIÑONEZ et al., 2016; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; GARCIA; MARCHETTE; RUDNICK, 1969; GUERBOIS et al., 2016), e pela competência vetorial em transmitir ZIKV em ensaios laboratoriais (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; CIOTA et al., 2017; LI et al., 2012; POMPON et al., 2017; RICHARD; PAOAAFAITE; CAO-LORMEAU, 2016; WEGER-LUCARELLI et al., 2016).

Além do *Ae. aegypti*, sugere-se a participação do *Ae. albopictus* no ciclo epidemiológico do ZIKV. Em 2007, esta espécie foi encontrada naturalmente infectada durante o surto de Zika vírus no país de Gabão na África Central (GRARD et al., 2014) assim como no México em 2016 (WHO, 2016). Ademais, uma população de *Ae. albopictus* (Vero Beach, Florida, EUA) proveniente do Norte dos Estados Unidos, foi capaz de transmitir o vírus laboratorialmente e embora com baixa eficiência, apresentou pelo menos duas vezes mais susceptibilidade à infecção que os exemplares coletados no estado do Rio de Janeiro (município de Jurujuba, Rio de Janeiro) (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

Assim como outros arbovírus, o ZIKV pode ser adquirido pela progênie de mosquitos, através da transmissão vertical de fêmeas infectadas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (CIOTA et al., 2017; DIALLO et al., 2014; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; SMARTT et al., 2018; THANGAMANI et al., 2016), tanto pela transmissão transovariana resultante da infecção dos tecidos ovarianos, quanto pela transmissão trans-ovo durante a fertilização (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

Estudos sugerem ainda a participação do gênero *Culex* na transmissão do ZIKV (ALANIZ et al., 2018; GUO et al., 2016). No Brasil, especificamente na

cidade de Rio de Janeiro, pesquisadores demonstraram que o vírus foi capaz de replicar em glândulas salivares e intestino médio e ser detectado na saliva de *Cx. quinquefasciatus* (GUEDES et al., 2017), entretanto a espécie foi incapaz de transmitir laboratorialmente isolados locais do vírus Zika (FERNANDES et al., 2016). Desta maneira, a participação do gênero *Culex* como vetor de ZIKV ainda permanece em discussão.

Em 2020, a linhagem africana do vírus Zika foi detectada em duas espécies de mosquitos distintas coletadas em áreas de floresta no estado do Rio de Janeiro, o *Aedes albopictus* que ecologicamente podem interagir facilmente entre áreas de floresta e peridomésticas facilitando a dispersão viral entre estes habitats, e em *Haemagogus leucocelaenus* que é considerado um dos principais vetores da febre amarela nas Américas (ALENCAR et al., 2019). Desta maneira, estudos são encorajados para verificar a capacidade vetorial dessas espécies à linhagem africana do vírus, uma vez que há preocupação do estabelecimento de um ciclo silvestre no Brasil.

A competência vetorial ao genótipo asiático do vírus Zika foi avaliada em cinco espécies de mosquitos silvestres, *Haemagogus leucocelaenus*, *Sabethes albiprivus*, *Sabethes identicus*, *Aedes terreus* e *Aedes scapularis*, por meio de repasto sanguíneo ou inoculados intratoracicamente com uma suspensão viral dos isolados (Rio-U1 e Rio-S1). Em especial, apenas a espécie *H. leucocelaenus* apresentou disseminação viral em taxas muito baixas, além disso, o vírus não foi capaz de ser detectado na saliva de nenhum mosquito desafiado e independente do período de incubação (FERNANDES et al., 2019).

Além do aumento das infestações por vetores antropofílicos, como o *Aedes* spp., as mudanças evolutivas do ZIKV também desempenham valor significativo na transmissão e estão diretamente correlacionadas com a propagação do vírus pelas ilhas do Pacífico e na América. A cepa pandêmica do ZIKV difere da cepa africana principalmente nas regiões NS1 e NS4 do genoma, proporcionando o aumento da aptidão de replicação em hospedeiros humanos, além de potencialmente proporcionar maior viremia e infectividade nos mosquitos vetores (FREIRE et al., 2015; RUSSELL, 2016). Entretanto, até o presente momento, não foi determinado se estas alterações influenciariam também a infecciosidade em espécies de PNH (RUSSELL, 2016).

2.3.2 Transmissão não associada a vetores

Em 2008, foi proposto pela primeira vez a possibilidade de transmissão sexual do ZIKV (FOY et al., 2011), entretanto pouco se conhecia sobre este modo de transmissão não usual para a família *Flaviviridae*. Casos posteriores foram relatados, tanto pela transmissão de homens infectados para mulheres (BROOKS et al., 2016; HARROWER et al., 2016; MUSSO et al., 2015a), quanto entre homens (DECKARD et al., 2016), coincidentemente, todos os casos envolveram parceiros que viajaram a regiões endêmicas para Zika e encontros sexuais em poucas semanas do retorno.

A transmissão não associada a vetores contrasta de maneira exorbitante com as outras arboviroses urbanas, como a Dengue e o Chikungunya, pois estas possuem a característica de serem transmitidas exclusivamente através do repasto sanguíneo por mosquitos infectados (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016), em contrapartida o ZIKV possui similaridade com o vírus da febre do Nilo ocidental (WNV, sigla em inglês), pois ambos possuem tropismo pelo sistema genitourinário (MURRAY et al., 2010).

A respeito deste tropismo, estudos demonstraram altas cargas de RNA viral no sêmen de pacientes humanos infectados (BARZON et al., 2016; MANSUY et al., 2016; MEAD et al., 2018) associados a relatos de permanência de RNA viral detectável por um período de 6 a 8 meses pós doença clínica (BARZON et al., 2016; MANSUY et al., 2016; MEAD et al., 2018). Em pacientes do sexo feminino, o ZIKV também foi isolado em fluídos vaginais por até 14 dias (MURRAY et al., 2017), sendo que o RNA viral permaneceu detectável de 60-180 dias após o início dos sintomas e de maneira intermitente (REYES et al., 2019).

Um estudo experimental realizado com camundongos, evidenciou a replicação produtiva do vírus em células da mucosa genital após exposição vaginal das fêmeas ao vírus, evoluindo para a infecção cerebral dos fetos com consequências que variaram com o estágio de gestação em que o vírus foi inoculado (YOCKEY et al., 2016).

Outros meios secundários de transmissão também foram descritos como formas de infecção em seres humanos, dentre eles incluem-se a transmissão perinatal (BESNARD; LASTERE; TEISSIER, 2014) e a transfusão sanguínea (MUSSO et al., 2014).

2.4 Diagnóstico laboratorial

As recomendações para o diagnóstico laboratorial envolvem a detecção do material genético do ZIKV, por meio da reação da cadeia da polimerase antecederida pela transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) ou pela reação convencional (RT-PCR), pela detecção sorológica de anticorpos ZIKV específicos para a imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) por meio do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) ou pelo Teste de Redução em Placa (do inglês, *plaque reduction neutralization test* – PRNT) (CORDEIRO, 2019; LANCIOTTI et al., 2008).

2.4.1 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular por meio da RT-PCR é considerado o “padrão ouro” para a detecção de ZIKV, por ser altamente sensível e específico (MAUK et al., 2017) durante a fase aguda da doença, podendo ser aplicado a diversos fluidos biológicos, como soro, plasma, urina, saliva e líquido amniótico (WAGGONER; PINSKY, 2016). Os alvos aplicados para a detecção por meio da RT-PCR em tempo real e convencional são direcionados aos genes prM, envelope (E) e proteínas não estruturais (NS1, NS3, NS4 E NS5) (FAYE et al., 2008, 2013; LANCIOTTI et al., 2008).

Embora as técnicas de detecção molecular possuam uma sensibilidade analítica alta, uma queda na sensibilidade clínica é percebida quando as técnicas são aplicadas em amostras biológicas, portanto a escolha da amostra e o estágio da doença podem influenciar na probabilidade de detecção do ZIKV. As diretrizes internacionais para o diagnóstico de ZIKV combinam testes moleculares de detecção em plasma e urina, juntamente com a sorologia, entretanto foi observado em um estudo comparativo que a utilização de amostras de sangue em paralelo aumentou em 34% os casos confirmados de infecção pelo vírus em humanos, melhorando a sensibilidade do diagnóstico (VOERMANS et al., 2019).

Segundo Mansuy et al. (2016) o RNA do vírus foi capaz de persistir por mais tempo no sangue total que no plasma, com duração média de 22 dias no

sangue total e 10 dias no plasma, demonstrando ser uma amostra mais sensível para o diagnóstico. Esta característica, possivelmente ocorre pela potencial característica do vírus em se aderir ao componente eritrocitário no sangue, utilizando as hemáceas como transporte (MURRAY et al., 2017), assim como visualizado com o vírus do Nilo Ocidental (LANTERI et al., 2014).

Amostras de urina também podem ser utilizadas para o diagnóstico de ZIKV, pois permanecem com carga viral mais alta em comparação com amostras de soro e a virúria (eliminação de vírus pela urina) persiste por aproximadamente 20 dias. Além disso, conferem uma alternativa de colheita de amostras não invasiva em humanos (GOURINAT et al., 2015).

Estudos sugerem que há um curto período de viremia nas infecções agudas pelo Zika vírus em seres humanos (LANCIOTTI et al., 2008; MUSSO et al., 2015b). Em primatas do velho mundo foi observado após a inoculação experimental em macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) um curto período de viremia no plasma sanguíneo, chegando ao pico virêmico entre os 2º e 6º dias pós-infecção (dpi) com $8,2 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^6$ cópias virais por mL, e tornando-se indetectável aos 10 dpi e apresentando menos de 100 cópias virais por mL. (DUDLEY et al., 2016).

Amostras de órgãos também podem ser utilizadas no diagnóstico de arboviroses, principalmente como uma ferramenta para a vigilância passiva de animais selvagens, inclusive dos PNH. Um estudo recente realizado nos estados de São Paulo e Minas Gerais detectou ZIKV em carcaças de saguis (*Callithrix* sp.) e macacos-prego (*Sapajus* sp.) de vida livre. Dentre os tecidos avaliados, a maior positividade foi indiretamente correlacionada com os valores de Ct (*cycle threshold*) na RT-qPCR, sendo positiva em ordem decrescente, no tecido renal e fígado (n=18), encéfalo (n=15), baço (n=13), pulmões (n=11), coração (n=9) e gônadas (n=1) (TERZIAN et al., 2018).

2.4.2 Diagnóstico sorológico

Interpretações sorológicas devem ser realizadas com cautela, principalmente pela reatividade cruzada entre vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* (particularmente DENV) e outros vírus da família *Flaviviridae* (em

especial, CHIKV), e também pela possibilidade de resultados falso negativos devido à janela imunológica observada durante a fase aguda da doença (HAYES, 2009; PLOURDE; BLOCH, 2016).

Dentre outros vírus do gênero *Flavivirus*, o vírus da Dengue e o Zika compartilham alto grau de identidade estrutural em regiões altamente conservadas, como a glicoproteína de superfície E, responsável pela ligação do receptor, fusão e entrada viral na célula hospedeira, e, portanto, é um dos principais alvos do sistema imune para a produção de anticorpos neutralizantes. Consequentemente, esta homologia resulta em reatividade cruzada humoral, podendo produzir resultados sorológicos indistinguíveis ou falso positivos (PRIYAMVADA et al., 2017).

Dentre as técnicas sorológicas disponíveis o ELISA é o mais utilizado, sendo seu princípio básico a detecção da ligação do antígeno (Ag) ao anticorpo (Ac), por meio da conversão enzimática de um substrato incolor (cromógeno) em um produto com coloração. Esta técnica pode ser utilizada tanto para a detecção de antígenos quanto anticorpos. Em especial, o ELISA indireto, envolve a adsorção de um antígeno na fase sólida, e a detecção dos anticorpos alvo com um anti-anticorpo marcado com uma enzima, acompanhada de uma reação colorimétrica devido à degradação de um substrato específico, cuja medida é diretamente proporcional à concentração de anticorpo na amostra (GRIFFIN; SAFRONETZ; KOBASA, 2016).

Em especial, anticorpos IgM tornam-se detectáveis de 6 a 14 dias após a infecção primária por *Flavivirus*, entretanto podem ser observadas respostas baixas ou até mesmo indetectáveis de IgM resultantes de infecções secundárias por outros vírus do gênero. O teste diagnóstico para Zika vírus mais utilizado nesta fase é o teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina M (do inglês, *Immunoglobulin M antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay* – denominado de MAC-ELISA) (GRIFFIN; SAFRONETZ; KOBASA, 2016).

Durante os estágios posteriores, ocorre o aumento dos anticorpos IgG, podendo ser detectados anos após a infecção inicial, portanto sua presença em amostras clínicas pode indicar a imunidade adquirida a longo prazo por uma infecção anterior pelo vírus (LANDRY; GEORGE, 2017). Para a detecção desta classe de imunoglobulinas podem ser realizados o teste de imunofluorescência indireta (IFA) ou ELISA indireto (GRIFFIN; SAFRONETZ; KOBASA, 2016).

Uma alternativa rápida e de fácil execução para a detecção de imunoglobulinas das classes IgG e IgM são os ELISAS comerciais, que apesar de serem desenvolvidos para o diagnóstico humano, têm sido frequentemente utilizados em amostras de PNH, principalmente na detecção de anticorpos em estudos experimentais com infecção de ZIKV em PNH (OSUNA et al., 2016), assim como para a avaliação de reações cruzadas por outros arbovírus (MANI et al., 2018), e inclusive para pesquisas epidemiológicas em PNH neotropicais para ZIKV (DE ABREU et al., 2020) e DENV (EASTWOOD et al., 2017; KATO et al., 2013).

Nominalmente os PNH possuem as mesmas subclasses de IgG que os seres humanos, sendo elas o IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, entretanto apresentam-se muito menos diversificadas estruturalmente (CROWLEY; ACKERMAN, 2019) e quanto à similaridade genética foi observada em um estudo com Macacos-cinomolgos (*Macaca fascicularis*), a homologia de aproximadamente 93% a 98% com os anticorpos humanos (LEWIS et al., 1993).

Devido à ampla reatividade cruzada entre os antígenos presentes no ZIKV e em outros *Flavivírus*, amostras humanas que testaram positivo, ou que geraram resultados inconclusivos ou equívocos para IgM, devem ser testadas quantitativamente pelo ensaio *in vitro* PRNT (RABE et al., 2016). Esta técnica é amplamente utilizada em amostras animais, como observado em infecções experimentais com saguis (TERZIAN et al., 2018) e em estudos epidemiológicos com diversas espécies de primatas do novo mundo (KATO et al., 2013; MOREIRA-SOTO et al., 2018; TERZIAN et al., 2018).

O teste de neutralização por redução de placa tem como objetivo mensurar *in vitro* a capacidade de neutralização dos anticorpos presentes nas diluições seriadas de uma amostra, portanto é considerado um teste de quantificação indireta de anticorpos contra um vírus específico (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008).

Para a quantificação, são realizadas diluições seriadas da amostra a ser testada, em seguida uma incubação inicial com uma dose padrão de vírus infeccioso é realizada para que ocorra uma interação inicial dos anticorpos presentes na amostra com o vírus. Em seguida, essa suspensão é vertida em uma monocamada de células permissíveis, que será revestida com um meio

semissólido com o intuito de impedir a disseminação rápida do vírus (LANDRY; GEORGE, 2017).

Após um período de incubação predeterminado para o ensaio, as placas são analisadas e, se o anticorpo neutralizante estiver presente, o número de placas de lise estará reduzido, indicando a neutralização viral. Considera-se o título de anticorpos como a última diluição do soro que resulta em neutralização das placas virais, definido como “*end-point*” (por exemplo, 80%; expresso como PRNT_{80%}) (LANDRY; GEORGE, 2017; ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008).

Apesar do PRNT aumentar a especificidade do diagnóstico, evidências sugerem que o ensaio não exclui a reatividade cruzada proveniente de infecções anteriores ou vacinações por outros *Flavivírus*, levando a resultados não interpretativos ou duvidosos (BARZON et al., 2016; HAYES, 2009; LANCIOTTI et al., 2008; LANDRY; ST GEORGE, 2017).

2.5A importância dos primatas não humanos no estudo das arboviroses

A ordem *Primates* é um dos grupos mais ricos em espécies e segundo a última atualização da “*International Union for Conservation of Nature –IUCN*” são reconhecidas atualmente 17 famílias, 512 espécies e um total de 702 táxons distribuídos no mundo (IUCN, 2020). Esta ordem de mamíferos está subdividida em duas subordens, a Prossimi, e a Antropoidea, sendo a última subdividida em Catarrhini (Velho Mundo) e Platyrrhini (Novo Mundo) (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Os Platyrrhini são representados por cinco famílias distintas: *Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae* e *Atelidae* (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010), e distribuídas do sul do México até o norte da Argentina, correspondendo à região neotropical, sendo que das 176 espécies conhecidas nos neotrópicos, aproximadamente 42% encontram-se ameaçadas de extinção e 122 pertencem exclusivamente à região amazônica (IUCN, 2020).

Estima-se que aproximadamente 60% das doenças emergentes infecciosas humanas tiveram origem em ciclos enzoóticos. Ademais, 72% das

doenças emergentes tiveram origem em ciclos enzoóticos envolvendo a vida selvagem (JONES et al., 2008), como evidenciado nos ciclos de manutenção do DENV e ZIKV na África e YFV na Ásia, envolvendo primatas do velho mundo e mosquitos silvestres (HANLEY et al., 2013).

A vigilância epidemiológica de arboviroses emergentes e reemergentes em PNH neotropicais podem fornecer indícios do transbordamento de arbovírus com ciclos de transmissão endêmica humana para um ciclo silvestre de manutenção (ALTHOUSE et al., 2016; WEAVER et al., 2018), como observado nas mudanças na transmissão do vírus da febre amarela, anteriormente propagado por mosquitos antropofílicos e seres humanos para um ciclo silvestre de manutenção envolvendo mosquitos silvestres e primatas neotropicais (HENDY et al., 2020).

Segundo o Manual de Vigilância de Epizootias em PNH são reconhecidas duas vigilâncias, uma envolve a investigação de óbito ou adoecimento de animais de vida livre ou cativeiro, sendo designada de vigilância passiva, e a vigilância ativa que envolve a identificação da circulação viral de maneira precoce, por meio da colheita de material biológico de animais vivos, desempenhando desta maneira a função de “sentinelas naturais” para a saúde pública, e atuando simultaneamente em alertar ameaças potenciais à saúde e conservação de espécies silvestres que coabitam aquele *habitat* (BRASIL., 2017).

Apesar de serem subutilizados para a vigilância de doenças infecciosas, os PNH possuem grande potencial para atuarem como animais sentinelas, por habitarem o mesmo ambiente ou locais próximos aos seres humanos, e responderem de maneira semelhante à infecções por agentes patogênicos (HALLIDAY et al., 2007) ou até mesmo por serem mais sensíveis a determinados agentes, manifestando sinais clínicos de maneira mais precoce que os seres humanos, como ocorre com as epizootias de febre amarela em PNH que antecedem aos casos humanos (BRASIL., 2017).

2.6 Primatas não humanos neotropicais e o Zika vírus

Na África, primatas não-humanos do velho mundo estão envolvidos na manutenção do ciclo enzoótico do ZIKV (VASILAKIS; WEAVER, 2018), como evidenciado a partir do isolamento viral em amostras de macacos *Rhesus* e de mosquitos arborícolas da mesma região da África (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Entretanto os hospedeiros envolvidos no ciclo silvestre nas Américas, ainda permanecem desconhecidos (TERZIAN et al., 2018).

Os PNH neotropicais merecem atenção especial na transmissão do ZIKV, principalmente pela sua estreita relação com seres humanos (FAVORETTO et al., 2016). Existem evidências crescentes acerca da susceptibilidade de PNH do novo mundo ao vírus (TERZIAN et al., 2018), sendo que a primeira detecção de RNA viral nestes mamíferos ocorreu em 2016 na região nordeste do Brasil, envolvendo quatro saguis (*Callithrix jacchus*) e três macacos pregos (*Sapajus libidinosus*). O sequenciamento do material genético do vírus resultou em 100% de similaridade com outros ZIKV detectados em humanos na América do Sul (FAVORETTO et al., 2016).

Em carcaças, o vírus foi detectado em 39,02% (32/82) dos animais recolhidos durante o período de janeiro a julho de 2017, sendo 31 saguis (*Callithrix* sp.) e 01 macaco-prego (*Sapajus* sp.) de vida livre provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Durante o mesmo período e na mesma região de São Paulo, *Ae. aegypti* foram positivos para ZIKV (TERZIAN et al., 2018).

Recentemente, um estudo realizado no Sul do Brasil identificou nove bugios de vida livre (*Alouatta guariba*) infectados por uma linhagem altamente correlacionada com a cepa africana MR766, diferentemente do observado por Terzian et al. (2018), que identificou sequências filogeneticamente relacionadas com a linhagem americana do ZIKV (TERZIAN et al., 2018), sugerindo portanto a circulação de uma linhagem africanizada nos PNH em ambiente silvestre (DE ALMEIDA et al., 2019).

Para avaliar a susceptibilidade dos primatas aos vírus e sua potencialidade em atuarem como hospedeiros reservatórios, exemplares de macaco-de-cheiro (*Saimiri* sp.) e macaco-da-noite (*Aotus* sp.) foram inoculados com uma suspensão viral da linhagem MEX_1_44. Ambas as espécies

demonstraram-se susceptíveis à infecção, mantendo viremia na ausência de sinais clínicos e com soroc conversão no vigésimo oitavo dia pós infecção. Segundo os autores, a concentração de vírus circulantes no sangue nestas espécies, seria suficiente para suportar a transmissão para mosquitos (VANCHIERE et al., 2018).

Primatas do novo mundo, em especial os saguis (família Callitrichidae), são amplamente utilizados como modelos experimentais em estudos de patogênese viral (FERREIRA et al., 2014), inclusive para ZIKV. Um estudo com saguis machos demonstrou similaridade nas características da infecção por Zika em seres humanos, incluindo a ausência de sinais clínicos, viremia breve com duração de uma semana, liberação intermitente do vírus no sêmen e fezes e persistência de RNA viral detectável na urina e saliva. Ademais, uma imunidade esterilizadora foi observada em infecções secundárias por ZIKV (CHIU et al., 2017), assim como observado por Terzian et al. (2018).

Foram observadas sintomatologia semelhante em saguis fêmeas após inoculação experimental com vírus e ocorrendo a perda espontânea da prenhez com aproximadamente duas semanas após a infecção, e provocando alterações neurocelulares no feto (SEFEROVIC et al., 2018). Achados semelhantes foram observados em um macaco bugio (*Alouatta guariba*) neonato, naturalmente infectado, positivo para ZIKV na RT-qPCR, apresentando lesões macroscópicas e histopatológicas semelhantes à Síndrome Congênita do Zika (SCZ), como tamanhos craniofaciais desproporcionais, fechamento craniano defeituoso e áreas de mineralização na substância branca do cérebro (DE ALMEIDA et al., 2019).

O estabelecimento de um ciclo silvestre envolvendo PNH no Brasil, dificultaria as estratégias de controle da doença e proporcionaria uma nova dinâmica de transmissão com impactos desconhecidos tanto para a biodiversidade quanto para os seres humanos (ALTHOUSE et al., 2016). Alguns fatores em potencial tornam esta teoria plausível na América do Sul, em especial no Brasil, principalmente pela proximidade de algumas espécies com os seres humanos e pela ampla diversidade de espécies neotropicais (IUCN, 2020). Por ser um país tropical, além de possuir vetores susceptíveis e competentes, ainda propicia fatores climáticos e ambientais favoráveis a proliferação vetorial (TERZIAN et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a circulação enzoótica de Zika vírus (ZIKV) em primatas não-humanos (PNH) provenientes dos estados de São Paulo, Paraíba e Paraná.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar a pesquisa molecular de Zika vírus em amostras de tecidos de PNH provenientes de regiões de São Paulo e da Paraíba;
- 2) Investigar a circulação de Zika vírus em amostras de PNH provenientes de uma área de proteção permanente e em ambiente urbano na cidade de Foz do Iguaçu-PR, por meio de técnicas moleculares e sorológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Estudo

As amostras utilizadas nessa pesquisa foram coletadas em três estados brasileiros: São Paulo, Paraíba e Paraná entre os anos de 2018 a 2020.

As amostras de PNH do estado de São Paulo foram coletadas durante a epizootia de febre amarela em São Paulo e são provenientes dos municípios de Sarapuí, Tapiraí, Itu, Araçoiaba da Serra e Capela do Alto durante 2018. Entretanto, dois animais da espécie *Sapajus nigritus* permaneceram sem identificação do município de origem.

As amostras dos animais de vida livre e cativeiro do estado da Paraíba foram coletadas na cidade de João Pessoa-PB durante o período de 2018 a 2019. Os animais de vida livre foram recolhidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) em áreas urbanas do município, e os animais de cativeiro eram provenientes do Parque Zoológico Arruda Câmara (Bica) localizado ao centro do município de João Pessoa-PB.

No estado do Paraná as amostras de animais de vida livre e cativeiro foram obtidas no município de Foz do Iguaçu-PR. As amostras dos animais de cativeiro foram obtidas dos PNH coletados no Zoológico Rogério Ribas Lange localizado dentro da unidade de conservação do Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), e no Zoológico Bosque do Guarani localizado ao centro da cidade. Já os animais de vida livre foram capturados na Área de Proteção Permanente da Itaipu-Binacional (APP-IB).

4.2 Amostras

4.2.1 Amostras provenientes do estado de São Paulo

Foram coletadas amostras de 12 carcaças de PNH provenientes do estado de São Paulo e oriundas da vigilância passiva de febre amarela durante o ano de 2018 (Tabela 1). Ao total, 38 amostras de tecidos (Tabela 2) foram obtidas e armazenadas em microtubos a -80°C até o processamento. Concomitantemente à coleta de amostras foram preenchidas fichas individuais dos PNH, contendo dados relativos à localidade e ao animal capturado.

TABELA 1 - Distribuição por espécie, local de origem e sexo dos primatas neotropicais recolhidos no estado de São Paulo (2018).

Espécie	Origem	Sexo			Total
		F	M	I	
Bugio (<i>A. clamitans</i>)	Sarapuí-SP	0	3	0	3
Bugio (<i>A. clamitans</i>)	Tapiraí-SP	1	0	0	1
Macaco Prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	Itu-SP	0	1	0	1
Macaco Prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	São Paulo	0	0	1	1
Macaco Prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	São Paulo	0	0	1	1
Sagui de Tufo Branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	Araçoiaba da Serra-SP	1	0	0	1
Sagui de Tufo Branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	Capela do Alto-SP	2	1	0	3
Sagui de Tufo Preto (<i>Callithrix penicillata</i>)	Itu-SP	0	1	0	1
Total		4	6	2	12

Legenda: (F) Fêmea; (M) Macho; (I) Indeterminado.

Fonte: O autor (2021).

TABELA 2 - Distribuição das amostras de tecido dos primatas neotropicais provenientes de São Paulo (2018).

Amostras							
Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Rim	Cérebro	SI	Total
2	11	11	5	3	2	4	38

Legenda: (SI) sem identificação.

Fonte: O autor (2021).

4.2.2 Amostras provenientes do estado da Paraíba

Foram coletadas amostras de 22 PNH provenientes do estado da Paraíba, oriundas da vigilância passiva de febre amarela durante o ano de 2018 a 2019 (Tabela 3). Ao total foram coletadas 37 amostras de tecidos obtidas “*post mortem*” (Tabela 4).

Dos 22 animais coletados, 19 PNH foram recolhidos “*post mortem*” pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) em fragmentos de Mata Atlântica urbana do município de João Pessoa-PB, e três PNH eram cativos do Parque Zoológico Arruda Câmara (Bica) localizado no mesmo município. As amostras foram acondicionadas em microtubos contendo RNAlater e armazenadas a -80°C até o processamento. Concomitantemente à coleta de amostras foram preenchidas fichas individuais dos PNH, contendo dados relativos à localidade e ao animal capturado.

TABELA 3 - Distribuição por espécie, origem e sexo dos primatas neotropicais coletados no estado da Paraíba (2018 e 2019).

Espécie	Origem	Sexo			Total
		F	M	I	
Macaco de cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>)	João Pessoa-PB	0	0	1	1
Macaco-prego (<i>Sapajus sp.</i>)	João Pessoa-PB	0	0	1	1
Sagui-do-tufo-branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	Zoológico Bica João Pessoa-PB	3	0	0	3
Sagui-do-tufo-branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	João Pessoa-PB	0	0	17	17
Total		3	0	19	22

Legenda: (F) Fêmea (M) Macho (I) Indeterminado.

Fonte: O autor (2021).

TABELA 4 - Distribuição das amostras de tecido dos primatas neotropicais provenientes da Paraíba (2018 e 2019).

Espécie	Amostras						
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Rim	Cérebro	Total
Macaco de cheiro (<i>Saimiri sciureus</i>)	0	0	1	0	0	0	1
Macaco-prego (<i>Sapajus sp.</i>)	1	0	0	0	0	0	1
Sagui-do-tufo-branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	3	1	11	5	4	11	35
Total	4	1	12	5	4	11	37

Fonte: O autor (2021).

4.2.3 Amostras provenientes do estado do Paraná

Ao total foram obtidas 66 amostras de sangue total e 58 amostras de soro sanguíneo durante o período de outubro de 2019 a março de 2020. Os PNH da cidade de Foz do Iguaçu - PR foram obtidos de dois grupos: (1) animais de vida livre capturados na Área de Proteção Permanente da Itaipu-Binacional (APP-IB) (Figura 1); (2) animais de cativeiro provenientes do Zoológico Rogerio Ribas Lange (Figura 2) e Zoológico Bosque do Guarani (Figura 3).

As amostras de sangue total foram coletadas em dois tubos, um contendo EDTA para a obtenção do sangue total e realização do diagnóstico molecular, e outro tubo contendo gel separador e sem EDTA para a obtenção do soro sanguíneo e realização da análise sorológica. Para a obtenção do soro, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. As amostras de sangue total e soro, foram armazenadas a -80°C e -20°C respectivamente, até o processamento.

FIGURA 1 - Macaco-prego (*Sapajus nigritus*) de vida livre capturado próximo ao recinto dos primatas não humanos na Área de Proteção Permanente da Itaipu-Binacional, Foz do Iguaçu – PR (2020).



Fonte: O Autor (2021).

FIGURA 2 - Recinto dos macaco-pregos (*Sapajus nigritus*) no Zoológico Rogério Ribas Lange, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).



Fonte: O autor (2021).

FIGURA 3 - Recinto dos primatas não-humanos no Zoológico Bosque do Guarani, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).



Fonte: O autor (2021).

4.2.3.1 Animais de vida livre

Dos 66 animais coletados no município de Foz do Iguaçu-PR, 28 eram macacos-pregos (*Sapajus nigritus*) de vida livre (Tabela 5), capturados na Área de Proteção Permanente da Itaipu Binacional (APP-IB). A metodologia utilizada para a captura foi descrita por Rocha et al. (2007). Foram utilizadas armadilhas do estilo Tomahawk instaladas em pontos estratégicos da APP-IB, após levantamento da área que o bando de primatas frequentemente utilizava, facilitando a captura dos mesmos.

Durante o período de ceva inicial, as armadilhas não foram ativadas para a captura, servindo apenas como atrativo, contendo frutas (banana, mamão, laranja) e ovo cozido como ceva das armadilhas. Após o período de ambientação, as armadilhas foram instaladas e armadas diariamente às 9h00 e desativadas até às 15h00 do mesmo dia, como forma de controle e para evitar intercorrências.

Após a captura, os animais foram transportados para o hospital veterinário do Refúgio Biológico da Itaipu e contidos com um protocolo farmacológico com a combinação de cloridrato de cetamina (10mg/kg), xilazina (0,5mg/kg) e maleato de midazolam (0,2 mg/kg). Após anestesiados, foram realizados exame físico e coleta de amostras de sangue por punção venosa utilizando vacutainer® (BD) e priorizando como primeira escolha a veia safena (Figura 4). Os animais capturados foram individualmente identificados com marcação eletrônica (microchip) na região interescapular, com aplicação subcutânea. Além disso, uma marcação visual foi realizada na cauda dos animais, tricotomia de aproximadamente 10 cm, a fim de evitar a recaptura do mesmo animal. Após o procedimento e com o completo retorno anestésico, estes foram devolvidos para o ambiente natural.

TABELA 5 - Distribuição por sexo dos primatas neotropicais de vida livre capturados na Área de Proteção Permanente - Itaipu Binacional, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).

Espécie	Sexo		Total
	Fêmeas	Machos	
Macaco-prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	7	21	28

Fonte: O autor (2021).

FIGURA 4 - Coleta de sangue da veia femoral de um macaco-prego (*Sapajus nigritus*.) macho de vida-livre da Área de Proteção Permanente - Itaipu Binacional, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).



Fonte: O autor (2021).

4.2.3.2 Animais de cativeiro

Dentre os animais provenientes de cativeiro (n=38), 14 pertenciam ao Zoológico Rogério Ribas Lange – Itaipu Binacional (Tabela 6) e 24 ao Zoológico Municipal do Bosque do Guarani (Tabela 7). Da mesma maneira, os PNH foram contidos com o protocolo anestésico supracitado para os animais de vida livre e avaliados fisicamente pelo exame físico seguido da colheita de sangue e soro.

A respeito da obtenção das amostras, das 66 amostras de PNH oriundas do estado do Paraná, apenas 58 foram utilizadas para os testes sorológicos excluindo os três exemplares de Mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e quatro exemplares de Sagui-do-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), pois não foram coletadas amostras suficientes para a obtenção do soro destes animais, priorizando o uso da amostra para a detecção molecular pelo RT-qPCR.

Por fim, os animais que ainda não possuíam microchip foram identificados e após o procedimento e retorno da anestésico, foram devolvidos para o cativeiro.

TABELA 6 - Distribuição por espécie e sexo dos primatas neotropicais coletados no Zoológico Rogério Ribas Lange, município de Foz do Iguaçu-PR (2020).

Espécie	Sexo		Total
	Fêmeas	Machos	
Bugio-ruivo (<i>Alouatta guariba</i>)	3	3	6
Macaco-prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	3	5	8
Total	6	8	14

Fonte: O autor (2021).

TABELA 7 - Distribuição por espécie e sexo dos primatas neotropicais coletados no Zoológico Bosque do Guarani, Foz do Iguaçu-PR (2020).

Espécie	Sexo		Total
	F	M	
Bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>)	1	0	1
Macaco-prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	9	6	15
Mico-leão-da-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	1	2	3
Sagui-do-tufo-preto (<i>Callithrix penicillata</i>)	4	1	5
Total	14	9	24

Legenda: (F) Fêmea; (M) Macho

Fonte: O autor (2021).

4.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA ZIKA VIRUS (ZIKV)

4.3.1 Extração de RNA

As amostras de tecidos foram pesadas individualmente (25 mg) e maceradas com o homogeneizador (Bullet Blender®, Next advance, Troy NY EUA) com o auxílio das beads de zircônio de 1.4 mm ou 3.0 mm (Loccus®, Cotia, SP, Brasil) e 600 µL de tampão de lise (Buffer RLT) previamente preparado com 10µL/1 mL de β-mercaptoethanol (β-ME) (Amresco Inc, Ohio, USA). Após maceradas, as amostras foram extraídas utilizando o kit RNeasy (Qiagen, Germany).

As amostras de sangue foram extraídas com o kit ReliaPrep Viral TNA MiniPrep (Promega), utilizando 200µL de amostra. Em ambos os protocolos foram seguidas as recomendações do fabricante e controles de extração (água livre de nucleases) foram adicionados a cada ciclo de extração. Por fim, em ambos os protocolos o RNA foi eluído em 50µL de água livre de nucleases e armazenadas a -80°C até o processamento.

4.3.2 Reação de RT-PCR em tempo real

Dois ensaios de RT-PCR em tempo real foram testados, um contendo SYBR® Green RT-qPCR utilizando os *primers* direcionados ao gene E (ZIKV 1086; ZIKV1162) e outro com TaqMan® RT-qPCR utilizando o conjunto de *primers* (ZIKV 1086; ZIKV1162) e sonda (ZIKV1107) (LANCIOTTI, et al., 2008).

As reações foram testadas inicialmente com RNA de ZIKV proveniente de cultivo celular para avaliar a eficiência e especificidade das reações, com o intuito de verificar qual seria o melhor ensaio para a detecção do vírus nas amostras de PNHs.

4.3.2.1 SYBR® Green RT-qPCR

A reação de RT-qPCR foi realizada com os *primers* ZIKV1086 e ZIKV 1162c (LANCIOTTI et al., 2008). A reação foi padronizada para o volume final de 20 µL, contendo 10µL de 2x GoTaqMix (Promega, Madison, USA), 0,4µL de RT

Mix for 1-Step RT-qPCR 50x (Promega), 0,3 μL de cada *primer* (10pmol/ μL) e 2 μL de RNA.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento AriaMX real time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), sendo conduzida da seguinte maneira: 50°C por 15 minutos para ação da enzima transcriptase reversa (RT), seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto, por fim a curva de dissociação.

4.3.2.2 TaqMan® RT-qPCR

A reação de TaqMan® RT-qPCR foi realizada com o conjunto de *primers* (ZIKV 1086; ZIKV1162) e a sonda (ZIKV1107) (LANCIOTTI et al., 2008). As reações foram realizadas em um volume final de 20 μL , contendo 10 μL de KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ 2X (Sigma - Aldrich), 0,4 μL (10pmol/ μL) de cada *primer*, 0,4 μL (10pmol/ μL) da sonda e 2 μL de RNA.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento AriaMX real time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), sendo conduzida da seguinte maneira: 50°C por 15 minutos para ação da enzima transcriptase reversa (RT) seguido de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto.

4.3.3 Determinação da eficiência e especificidade das reações de RT-PCR em tempo real

A eficiência das reações com SYBR® Green e TaqMan® foram analisadas através de uma curva de diluição seriada na proporção de 1:5 de um controle positivo para ZIKV proveniente de cultivo celular. Após a extração do RNA com o Kit Total Purification (Norgen, Biotek. Corp, Canadá), foram realizadas 10 diluições seriadas do RNA viral utilizando tampão TE (Tris-EDTA).

As diluições foram analisadas em triplicata por meio da reação de RT-qPCR para as reações descritas para SYBR® Green e TaqMan®. Os dados foram analisados com o auxílio de software OriginPro versão 8.5, por meio de

um gráfico de regressão linear onde o eixo X corresponde à quantificação relativa e o eixo Y corresponde ao valor de Ct.

Ao analisar o desempenho da reação, foram consideradas ótimas quando o valor de eficiência estiver entre 90% a 110%. Para se obter esse valor de eficiência, valores de *slope* (inclinação da curva) devem ser levados em consideração, pois estão intimamente correlacionados com o cálculo da eficiência: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Portanto, são considerados valores de *slope* entre -3,58 e -3,10, sendo o ideal -3,32. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

Já os valores de R^2 correspondem ao coeficiente de correlação entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das diluições, portanto valores inferiores a 0,99 podem indicar erros durante a elaboração do teste, levando ao questionamento dos resultados (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

A especificidade analítica foi avaliada para ambos os ensaios, utilizando amostras de cultivo celular para Chikungunya (CHIKV) e Dengue (DENV) sorotipos 1, 2, 3 e 4, sendo observada a temperatura de dissociação dos *amplicons* na reação com SYBR® Green e a curva de amplificação na reação com TaqMan®.

O limite de detecção para ZIKV foi determinado por meio da curva de diluição, correspondendo à maior diluição do controle e, conseqüentemente, a menor concentração de RNA que pode ser detectado nos dois ensaios moleculares.

4.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

4.4.1 ELISA indireto

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas à técnica de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-IgG, por meio do teste comercial de ELISA-indireto, Anti-ZIKV ELISA IgG (Euroimmun, Germany), cujas microplacas são revestidas com a proteína não-estrutural NS1 recombinante. Todos os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante.

Inicialmente as amostras foram diluídas 1:101 em uma microplaca de diluição com o *buffer* de diluição “*sample buffer*”. Os soros diluídos foram

transferidos para a placa de ELISA, juntamente com 100 µL dos controles positivos, negativos e os calibradores não diluídos (CAL), estes últimos em duplicata. Após a placa ser incubada por 60 minutos a 37°C em estufa, foram realizados dois ciclos de lavagem com tampão de lavagem “*wash buffer 10x*”, e retirada do excesso por inversão da placa. Todos os poços foram incubados com 100 µL do conjugado enzimático contendo anti-IgG humano acoplado a peroxidase, por 30 minutos em temperatura ambiente (22°C).

Novamente, foram realizados dois ciclos de lavagem com tampão de lavagem no equipamento AquaMax® 2000 (Molecular Devices, San Jose, CA) e retirada do excesso por inversão da placa, aplicando batidas fortes e únicas no papel toalha. Todos os poços foram incubados com 100 µL da solução substrato/cromógeno contendo 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em temperatura ambiente (22°C). A placa permaneceu em câmara escura por 15 minutos, seguido de bloqueio da reação colorimétrica com 100µl da solução de parada contendo 0,5 M de ácido sulfúrico.

Após 10 minutos de incubação em câmara escura e temperatura ambiente (22°C), a leitura das densidades ópticas (D.O.) foram realizadas no espectrofotômetro de placa Spectra max PLUS 384 (Molecular Devices, USA) no comprimento de onda de 450 nm.

O resultado foi calculado por meio da razão entre a média das D.O. dos calibradores pelas D.O. das amostras testadas, sendo considerado positivo quando a razão resultou em D.O. maior ou igual 1,1 ($\geq 1,1$), indeterminado ou “*borderline*” quando a D.O. estiver no intervalo entre maior ou igual a 0,8 a menor que 1,1 ($\geq 0,8$ a $<1,1$), e negativas quando a razão for menor que 0,8 ($<0,8$).

4.4.2 Reação de Neutralização por redução de placas – PRNT

O teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise – PRNT foi realizado no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, conforme descrito por Roehrig et al. (2008) para a pesquisa de anticorpos neutralizantes para ZIKV.

Para a confecção do PRNT foram utilizadas células Vero mantidas em garrafas de cultivo contendo meio MEM 1x (*Earle*) – *Minimum Essential Medium*

(Cultilab, São Paulo, Brasil), antibiótico e suplementadas com soro fetal bovino a 10% (Cultilab) a 37°C com 5% de CO₂.

Inicialmente foram semeadas 10⁵ células Vero/poço em placas estéreis de poliestireno de 24 poços (Costar®, Corning Incorporated, NY, USA), seguido de incubação por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. As placas foram avaliadas com um microscópio de luz para garantir que as células atingiram aproximadamente 90-100% de confluência para a realização do PRNT.

Para o teste, as amostras de soro foram inativadas a 56°C por 30 minutos em banho seco no equipamento Provocell (Esco, EUA). Após o procedimento de inativação, os soros foram diluídos serialmente nas proporções 1:5; 1:10; 1:20; 1:40 e 1:80 utilizando o meio MEM 1x sem adição de soro fetal bovino em placas de 96 poços estéreis de poliestireno.

O vírus estoque ZIKV^{BR} com título de 3x10⁶/mL foi diluído em meio MEM 1x sem soro fetal bovino, de maneira que contivesse 50 unidades formadoras de placa (p.f.u) em um volume final de 100 µL por poço da placa (50 p.f.u/100 µL).

Para a execução do teste, 100 µL dos soros diluídos foram incubados com 100 µL da suspensão viral contendo 50 p.f.u por uma hora a 37°C – 5% CO₂, para a formação do complexo vírus-anticorpo. A cada intervalo de 15 minutos, a placa foi homogeneizada lentamente.

Foram utilizados como controles positivo e negativo, uma amostra sabidamente positiva para a presença de anticorpos neutralizantes e uma amostra negativa para a presença de anticorpos, respectivamente. Além disso, foi incluído também um controle celular apenas com suspensão do meio de cultura e o controle viral que contém a suspensão do meio de cultura mais a suspensão viral.

Após o período de incubação, o meio de cultivo das placas foi retirado e o tapete celular foi lavado com tampão PBS 1x (Gibco®). Em seguida, a solução de soro e vírus foi adicionada na placa contendo a monocamada de células e incubada por uma hora a 37°C com 5% de CO₂, homogeneizando a cada quinze minutos, para que a distribuição da solução tivesse contato com toda a camada celular. Por fim, a placa foi lavada novamente com solução de PBS 1x (Gibco®), seguido de adição de 1 mL de carboximetilcelulose - CMC 2,0% com meio MEM 2x (Cultilab), seguido de incubação por 4 dias a 37°C com 5% de CO₂.

Para a fixação das células na placa, a camada de CMC foi removida e três lavagens do tapete celular com tampão PBS 1x (Gibco®) foram realizadas. Posteriormente, foi adicionado uma solução de Formol 10% e a placa permaneceu em uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação das células, a solução de formol foi retirada vertendo as placas em recipiente contendo solução de hipoclorito de sódio a 1%, seguido de lavagem das placas com PBS 1x.

Após todo o excesso de líquido ser retirado da placa, foi realizada a coloração do tapete celular por meio da incubação com 500µL de solução cristal violeta 2% por 10 minutos. Por fim, a solução foi retirada vertendo as placas em recipiente contendo solução de hipoclorito de sódio a 1%, lavadas em água corrente e secadas a temperatura ambiente por 24 horas.

O resultado foi analisado contabilizando a média das partículas virais presente nos controles e a proporção necessária de neutralização, utilizando um fator de 80% de redução de placas de lise (PRNT_{80%}), ou seja, o título de anticorpos no qual a diluição do soro promoveu 80% de neutralização do vírus. O teste foi considerado válido quando todos os controles apresentaram resultados compatíveis com o esperado.

5. ASPECTOS ÉTICOS

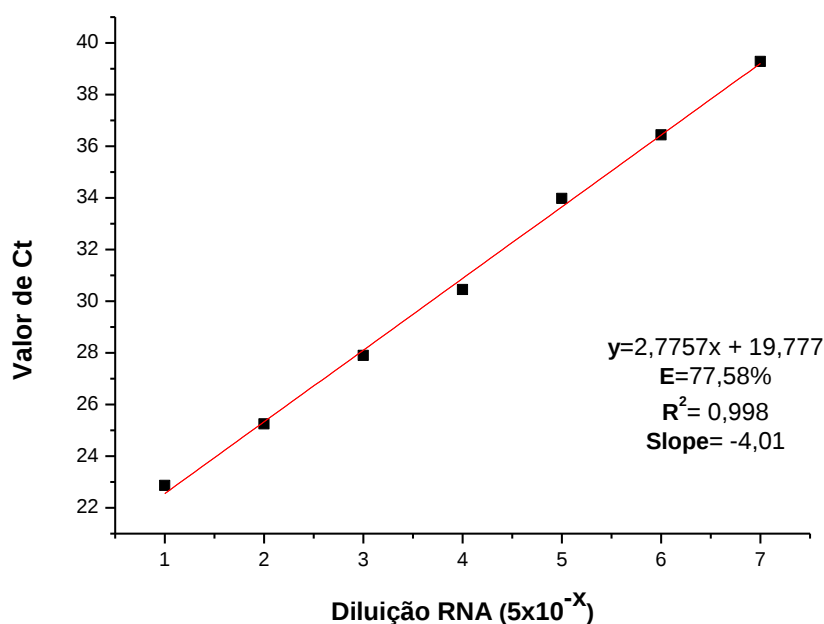
A captura e os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA (licença nº 67891-1/2019) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Registro: 0206/2019).

6. RESULTADOS

6.1 Eficiência e especificidade das reações de SYBR® Green RT-qPCR e TaqMan® RT qPCR

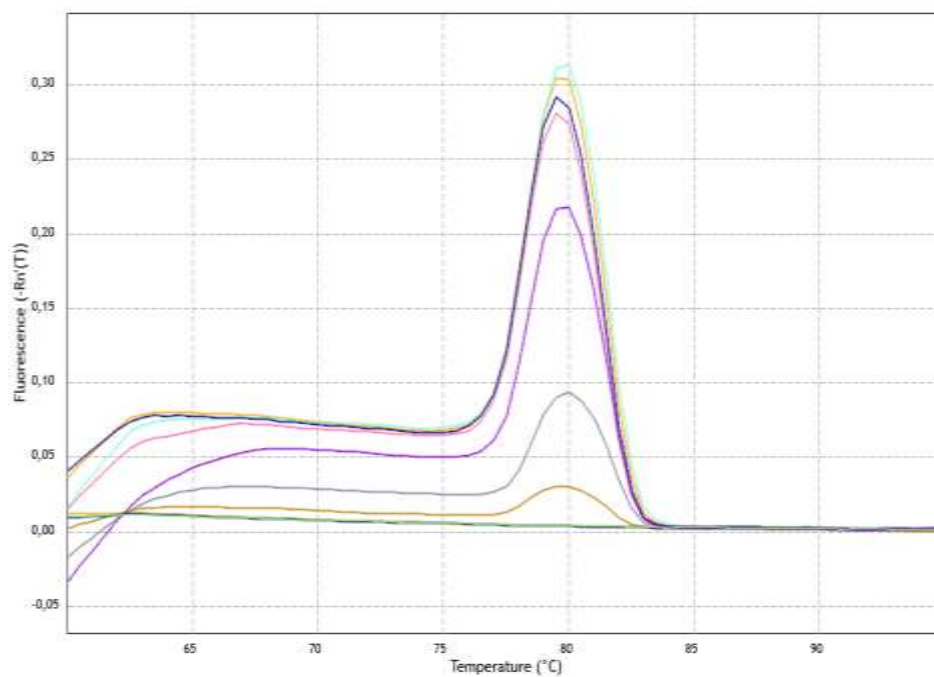
A equação de regressão obtida para o ensaio com SYBR® Green, apresentou valor de inclinação da curva (*Slope*) de - 4,01 e correlação positiva entre as replicatas, com valor de R^2 : 0,998. Na análise dos dados gerados na curva padrão relativa, foi observada uma eficiência de amplificação de 77,58%, abaixo do recomendado (Gráfico 1). A temperatura de dissociação do controle positivo variou de 79,5°C a 80°C (Figura 5). Além disso, o conjunto de *primers* amplificou de maneira inespecífica os controles positivos para dengue, entretanto foi possível diferenciar pelas temperaturas de dissociação dos *amplicons*, não comprometendo o diagnóstico (Figura 7).

GRÁFICO 1 - Curva de Eficiência da reação com SYBR® Green para detecção do Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.



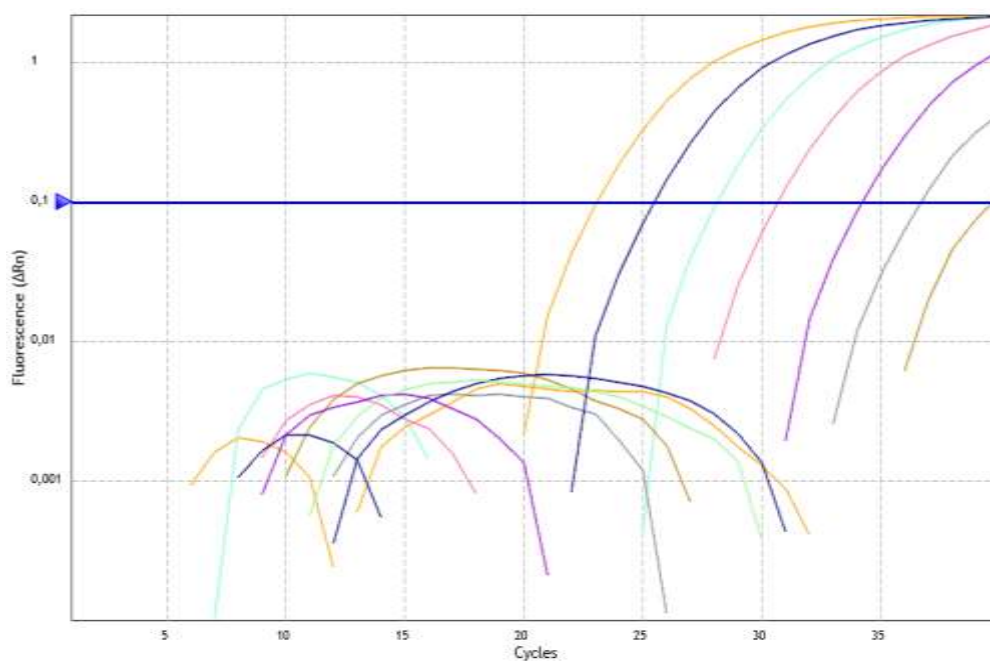
Fonte: O autor (2021).

FIGURA 5 - Curva de dissociação dos *amplicons* na reação com SYBR® Green para detecção de Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.



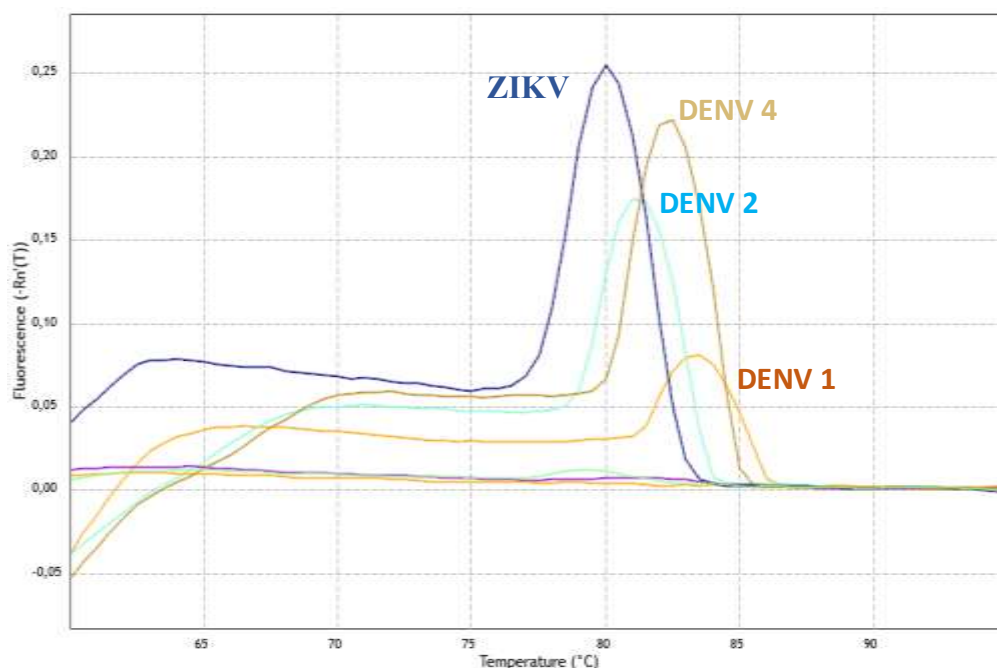
Fonte: O autor (2021).

FIGURA 6 - Amplificação do controle positivo de Zika vírus proveniente de cultivo celular referente à curva de eficiência com SYBR® Green.



Fonte: O autor (2021).

FIGURA 7 - Temperaturas de dissociação dos controles positivos para DENV e ZIKV.

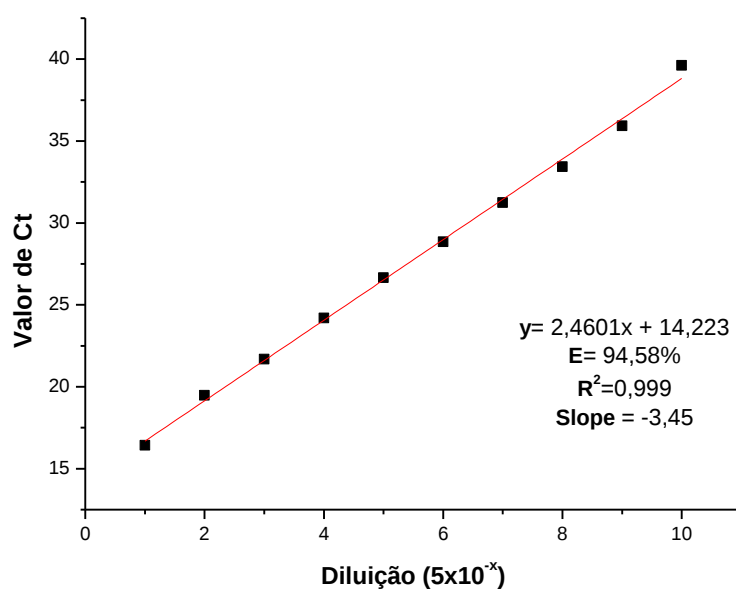


Fonte: O autor (2021).

Em contrapartida, a reação de TaqMan® apresentou uma melhor eficiência de amplificação (94,58%) em relação ao ensaio com SYBR® Green. Além disso, houve correlação positiva entre as variáveis, com valor de R^2 : 0,999, e valores ideais de inclinação da curva padrão, conforme o Gráfico 2.

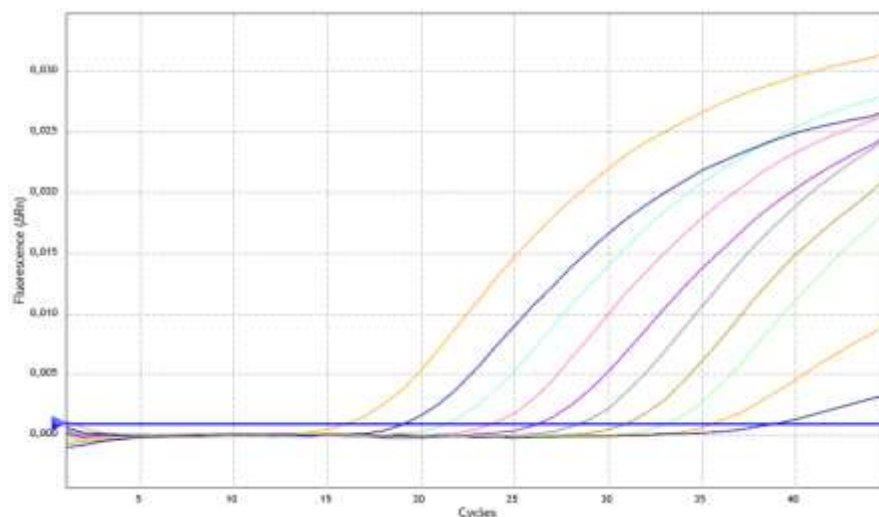
O conjunto de *primer* e sonda não foi capaz de amplificar amostras de cultivo para dengue (DENV) tipo 1, 2, 3 e 4, assim como para o vírus Chikungunya (CHIKV), demonstrando especificidade da reação com esta metodologia. O limite de detecção para ambos os ensaios foi determinado com base no C_t de amplificação, sendo considerados positivos os resultados menores ou iguais a 37 (≤ 37) e indeterminados quando maior que 37 (> 37) (Figura 6 e 8).

GRÁFICO 2 - Curva de Eficiência do ensaio com TaqMan® para detecção de Zika vírus utilizando um controle positivo de cultivo celular.



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 8 - Amplificação do controle positivo para Zika vírus proveniente de cultivo celular referente à curva de eficiência com TaqMan®.



Fonte: O autor (2021).

A partir dessas análises, concluiu-se que os dois ensaios de RT-qPCR realizados para a detecção de ZIKV com SYBR® Green e TaqMan® apresentaram desempenhos semelhantes, como observado em um estudo

anterior (COLOMBO et al., 2018), entretanto, a reação com TaqMan®, apresentou uma eficiência de amplificação mais adequada quando comparada com o ensaio de SYBR® Green e também ausência de amplificações inespecíficas, por esta razão, este foi o método utilizado para a detecção de ZIKV nas amostras de PNHs deste estudo.

6.2 Detecção molecular e análise sorológica para Zika vírus

Todas as 141 amostras de PNH foram testadas no ensaio de RT-PCR TaqMan® e foram consideradas negativas para a presença de RNA viral, sugerindo a ausência de infecção aguda e/ou presença do ZIKV durante a amostragem destes animais (n=100).

Não foram detectados em nenhuma das técnicas utilizadas anticorpos neutralizantes contra o vírus Zika, assim como anticorpos específicos IgG nas amostras dos PNH provenientes da vigilância ativa na cidade de Foz do Iguaçu-PR, como demonstrado na Tabela 8. Apesar de um indivíduo da espécie *Sapajus nigritus* apresentar título de neutralização cinco (título PRNT_{80%}: 5), esta reação foi considerada como inespecífica.

No teste de ELISA indireto, os controles negativos, positivos e calibradores apresentaram D.O. de 0,093, 0,889 e 0,372, esta última resultante da média entre os controles de calibração (0,383 e 0,361).

TABELA 8 – Resultado das análises sorológicas para Zika vírus de 58 primatas não humanos do município de Foz do Iguaçu-PR.

ID	Nome científico	Título ZIKV 80%	ELISA D.O.	Conclusão
MP1	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,22	Negativo
MP2	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,21	Negativo
MP3	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP4	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,17	Negativo
MP5	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP6	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP7	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP8	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP9	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,15	Negativo
MP10	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP11	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,187	Negativo
MP12	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP13	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,28	Negativo
MP14	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP15	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP16	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,17	Negativo
MP17	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,18	Negativo
MP18	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,18	Negativo
MP19	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,26	Negativo
MP20	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP21	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,15	Negativo
MP22	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP23	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP24	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,15	Negativo
MP25	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP26	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,18	Negativo
MP27	<i>Sapajus nigritus</i>	5	0,28	Negativo
MP28	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,24	Negativo
MP29	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP30	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,17	Negativo

TABELA 8 – Resultado das análises sorológicas para Zika vírus de 58 primatas não humanos do município de Foz do Iguaçu-PR (continuação).

ID	Nome científico	Título ZIKV 80%	ELISA D.O.	Conclusão
MP31	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP32	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP33	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP34	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP35	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP36	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP37	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP38	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,140	Negativo
MP40	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP41	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,16	Negativo
MP42	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,133	Negativo
MP44	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP45	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP46	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,22	Negativo
MP47	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,15	Negativo
MP48	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,19	Negativo
MP49	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,17	Negativo
MP50	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,24	Negativo
MP51	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,13	Negativo
MP52	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
MP53	<i>Sapajus nigritus</i>	Negativo	0,14	Negativo
B1	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,15	Negativo
MB2	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,13	Negativo
MB3	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,17	Negativo
MB4	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,14	Negativo
MB5	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,15	Negativo
MB6	<i>Alouatta guariba</i>	Negativo	0,13	Negativo
MB7	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	0,15	Negativo

*Os dados do ELISA foram calculados a partir da razão entre a média das D.O. dos calibradores pelas D.O. das amostras testadas.

7. DISCUSSÃO

Segundo Althouse et al. (2016), dentre as prioridades chave para avaliar o risco de um potencial estabelecimento da transmissão silvestre de ZIKV nas Américas, citam-se o monitoramento ecológico de populações de primatas para a detecção da circulação viral, assim como o monitoramento sorológico em áreas urbanas e peri-urbanas para a detecção de um transbordamento inicial do vírus, ou seja, de um ciclo endêmico humano para um ciclo enzoótico de manutenção envolvendo primatas não humanos.

Não houveram evidências sorológicas e/ou moleculares da circulação do ZIKV em PNH, utilizando o ensaio de TaqMan® RT-qPCR nas três regiões dos estados de São Paulo, Paraíba e Paraná. Resultados semelhantes com a coleta e pesquisa de ZIKV em 2064 vertebrados, incluindo animais domésticos e selvagens provenientes do Centro-Oeste do Brasil durante o período de 2017 a 2018 foram reportados, dentre os mamíferos, os primatas neotropicais corresponderam a 6% (78/1335) das amostras negativas (ALEX PAUVOLID-CORRÊA et al., 2019).

A ausência de exposição prévia e de infecção por ZIKV em primatas neotropicais também foi observada no estudo de Abreu et al. (2020) com 144 PNH capturados antes e após surto de ZIKV no Brasil e também antes e após surto de Febre Amarela no Sudeste do país, não apresentaram RNA viral detectável para o vírus Zika no diagnóstico molecular, além disso não apresentaram sorologia detectável para IgG utilizando um teste de ELISA comercial (DE ABREU et al., 2020).

Dentre os fatores que podem dificultar a detecção do ZIKV em estudos como o proposto, destacam-se as técnicas de detecção, tipo da amostra e armazenamento da mesma. De maneira geral, a técnica molecular utilizada para a detecção do ZIKV nas amostras de PNH deste estudo, apresentou adequada eficiência de amplificação e ausência de amplificações inespecíficas, portanto os resultados aqui apresentados são confiáveis, assim como observado em outras pesquisas utilizando a mesma metodologia (COLOMBO et al., 2018; LANCIOTTI et al., 2008).

Neste estudo utilizamos um teste comercial para a detecção de anticorpos IgG anti ZIKV, assim como outros estudos epidemiológicos para detecção de arbovírus em PNH (DE ABREU et al., 2020; EASTWOOD et al., 2017; KATO et al., 2013). De maneira geral, ainda que o ELISA comercial indireto utilize anti-anticorpos humanos para a detecção das imunoglobulinas, estes possuem capacidade de interagir e identificar anticorpos em PNH (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019) tanto pela similaridades genética quando estrutural observada com as imunoglobulinas humanas (CROWLEY; ACKERMAN, 2019; LEWIS et al., 1993).

Todas as amostras foram coletadas e rapidamente armazenadas a uma temperatura de -80°C ou foram utilizados conservantes como RNAlater com o intuito de preservar o material coletado para as técnicas moleculares. Entretanto, as amostras de tecidos provenientes do estado de São Paulo foram coletadas durante a epizootia de febre amarela, sendo todas oriundas de carcaças em estado de decomposição variável. Esta situação pode influenciar negativamente na obtenção do material genético viral, pois neste tipo de amostra são esperadas concentrações virais baixas (TERZIAN et al., 2018). Apesar disso, optamos por utilizar as amostras neste estudo pois constituíam o único material disponível desses animais selvagens e que raramente seriam utilizados para a pesquisa de outros patógenos de importância para a saúde pública.

No estudo prospectivo, a viremia de curta duração pode ser um dos fatores que podem dificultar a detecção do RNA viral pelas técnicas moleculares (MUSSO et al., 2015b). Segundo Lanciotti et al. 2008, em humanos, a presença de vírus no sangue costuma ocorrer quatro dias após o início dos sintomas e por um período de curta duração, e estudos com primatas do velho mundo indicaram que o pico virêmico no plasma sanguíneo ocorre entre o segundo e sexto dpi, tornando-se indetectável 10 dpi (DUDLEY et al., 2016). De maneira semelhante, estudos com inoculação experimental em primatas neotropicais indicam uma viremia transitória de até 5 dias (TERZIAN et al., 2018).

A respeito das análises sorológicas realizadas nos primatas da busca ativa, os resultados negativos apresentados no ELISA corroboram com o resultado do PRNT com limite de detecção conservador de 80% de neutralização, sugerindo a não exposição dos primatas ao ZIKV na cidade de

Foz do Iguaçu-PR, confirmando a baixa circulação viral na cidade durante o período de coleta de amostras nesta região, indiretamente mensurada com o número de casos humanos registrados no estado do Paraná, na qual apenas 0,01% (4/232) dos casos notificados no estado pertenciam a cidade de Foz do Iguaçu (SECRETARIA DA SAÚDE DO PARANÁ, 2020).

Sobre o estudo prospectivo em Foz do Iguaçu, a localização dos animais amostrados favorece condições ideais para a pesquisa de patógenos de importância para a saúde pública, principalmente como “animais sentinelas” para a circulação do ZIKV, assim como para outros patógenos de importância para a saúde pública, devido ao contato próximo dessas populações com os seres humanos, seja no ambiente urbano ou em áreas de proteção permanente, na qual ambas acabam recebendo muitos visitantes ao longo do dia.

A cidade fronteiriça, possui clima propício para vetores e com grande diversidade de fauna silvestre que pode servir como reservatório do ZIKV, além disso, representa um espaço urbano de grande importância comercial com intenso fluxo de pessoas, inclusive de turistas internacionais, portanto, estes resultados, mesmo que negativos, contribuem com informações epidemiológicas importantes para a saúde pública.

Por fim, para todas as regiões analisadas, a ausência de circulação viral durante a coleta destes animais não exclui a necessidade de um monitoramento constante seja pela vigilância passiva ou ativa, com o intuito de encontrar indícios ou provas de circulação de patógenos na população sentinela, e associar seu impacto na população-alvo, tanto para a biodiversidade quanto para os seres humanos (HALLIDAY et al., 2007).

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com o presente estudo de detecção molecular e sorológica de ZIKV em primatas neotropicais, foi possível elaborar as seguintes conclusões:

- 1) Com os resultados negativos encontrados nessa pesquisa, foi possível verificar a ausência de animais infectados pela RT-qPCR durante a coleta dos PNH nas regiões dos estados de São Paulo, Paraíba e Paraná. Além disso, com eles é possível inferir a não exposição prévia dos PNH em Foz do Iguaçu-PR ao vírus Zika.
- 2) Com esta pesquisa não foi possível identificar evidências de um ciclo de transmissão enzoótico envolvendo o vírus Zika durante o período e nas regiões de coleta, entretanto isso não exclui o potencial estabelecimento de ciclos silvestres para ZIKV na América Latina, em especial no Brasil.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIZ, A. J. *et al.* Global spatial assessment of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*: a scenario of Zika virus exposure. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 147, n. e52, p. 1–11, 2018.

ALENCAR, J. *et al.* Natural infection and vertical transmission of two flaviviruses (Yellow fever and Zika) in mosquitoes in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro (Diptera: Culicidae). **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, 2019. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/688713>.

ALEX PAUVOLID-CORRÊA, G. *et al.* Zika virus surveillance at the human – animal interface in west-central Brazil, 2017-2018. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 1164, p. 1–18, 2019.

ALTHOUSE, B. M. *et al.* Potential for Zika virus to establish a sylvatic transmission cycle in the americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2016.

BARZON, L. *et al.* Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 21, n. 32, p. 1–4, 2016.

BERTHET, N.; KAMGANG, B.; SELEKON, B. Molecular characterization of three zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 14, n. 12, p. 862–865, 2014.

BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 19, n. 13, p. 8–11, 2014.

BOYER, S. *et al.* An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and Infection**, Paris, v. 20, p. 546–660, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 49, n. 44, p. 1-14, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 17, 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 21, p. 1-11, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/14/boletim_epidemiologico_svs_17-5-1.pdf. Acesso em: 28 jul. 2021.

BROOKS, R. B. *et al.* Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection — Maryland, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 34, p. 915–916, 2016.

CALVIGNAC-SPENCER, S. *et al.* Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 521–527, 2012.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CAUCHEMEZ, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CHIU, C. Y. *et al.* Experimental Zika virus inoculation in a New World Monkey

model reproduces key features of the human infection. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 17126, p. 1–11, 2017.

CHOUIN-CARNEIRO, T. *et al.* Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2016.

CIOTA, A. T. *et al.* Effects of Zika virus strain and *Aedes* mosquito species on vector competence. **emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 23, n. 7, p. 1110–1117, 2017.

COLOMBO, T. E. *et al.* Zika detection: comparison of methodologies. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 144–147, 2018.

CORDEIRO, M. T. Postnatal imaging findings of congenital Zika syndrome: the story of a disease that is still being written. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, Hagerstown, v. 28, n. 1, p. 15–17, 2019.

CROWLEY, A. R.; ACKERMAN, M. E. Mind the gap: how interspecies variability in IgG and Its receptors may complicate comparisons of human and non-human primate effector function. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, n. 697, p. 1–19, 2019.

DE ABREU, F. V. S. *et al.* Survey on non-human primates and mosquitoes does not provide evidences of spillover/spillback between the urban and sylvatic cycles of yellow fever and Zika viruses following severe outbreaks in southeast Brazil. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2020.

DE ALMEIDA, P. R. *et al.* Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, 2019. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/828871> 2019.

DE LIMA CAMPOS, T. *et al.* Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland americas through large-scale phylogenomics. **International Journal of Genomics**, New York, v. 2018, p. 1–9, 2018.

DECKARD, D. T. *et al.* Male-to-male sexual transmission of Zika virus — Texas,

January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 14, p. 372–374, 2016.

DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 4–11, 2014.

DÍAZ- QUIÑONEZ, J. A. *et al.* Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. **Virus Genes**, Norwell, v. 52, p. 855–857, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus Isolations and serological specificity. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DUDLEY, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 12204, p. 1–9, 2016.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.

EASTWOOD, G. *et al.* Enzootic circulation of chikungunya virus in east Africa: serological evidence in non-human Kenyan primates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 97, n. 5, p. 1399–1404, 2017.

ENGEL, G. *et al.* Synanthropic primates in Asia: potential sentinels for environmental toxin. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken Washington, v. 142, n. 3, p. 453–460, 2010.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of Hygiene**, London, v. 83, n. 2, p. 213–219, 1979.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic

findings. **Science**, New York, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAVORETTO, S. *et al.* First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, 2016. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/049395>.

FAYE, O. *et al.* One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 43, p. 96–101, 2008.

FAYE, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2013.

FERNANDES, R. S. *et al.* *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not competent to transmit the local Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2016.

FERNANDES, R. S. *et al.* Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate an enzootic cycle in South America. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. *et al.* Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.

FERREIRA-DE-BRITO, A. *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655–658, 2016.

FERREIRA, M. S. *et al.* *Callithrix penicillata*: a feasible experimental model for dengue virus infection. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 158, n. 1–2, p. 126–133, 2014.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FREIRE, C. C. M. *et al.* Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated

with NS1 codon usage adaptation in humans. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor , v. 2015. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/032839>.

GARCIA, R.; MARCHETTE, N. J.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969.

GILLESPIE, T. R.; NUNN, C. L.; LEENDERTZ, F. H. Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 137, n. S47, p. 53–69, 2008.

GOURINAT, A. C. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GRARD, G. *et al.* Zika virus in Gabon (Central Africa) – 2007: a new threat from *Aedes albopictus* ? **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Franscisco, v. 8, n. 2, p. 1–6, 2014.

GRIFFIN, B. D.; SAFRONETZ, D.; KOBASA, D. Evaluating Zika virus pathogenesis in immunocompromised mice. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 2142, p. 23-40, 2020.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and emergence of Zika virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 216, p. S860-7, 2017.

GUEDES, D. R. D. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, n. 8, 2017.

GUERBOIS, M. *et al.* Outbreak of Zika virus infection , Chiapas State, Mexico, 2015, and First confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 214, n. 9, p. 1349–1356, 2016.

GUO, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 5, n. 9, p. e102-5, 2016.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian Lineage. **PLoS Neglected tropical disease**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2012.

HALLIDAY, J. E. B. *et al.* A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 4, n. 16, p. 973–984, 2007.

HANLEY, K. A. *et al.* Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 292–311, 2013.

HARROWER, J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and persistence in semen, New Zealand, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 10, p. 1855–1857, 2016.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.

HENDY, A. *et al.* The vertical stratification of potential bridge vectors of mosquito - borne viruses in a central Amazonian forest bordering Manaus , Brazil. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 18254, p. 1–13, 2020.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **Global Primate Biodiversity**: 1º september 2018. Washington: Primate Specialist Group, 2018. Disponível em: http://www.primate-sg.org/primate_diversity_by_region/. Acesso em: 12 out. 2020.

JONES, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, London, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008.

KATO, F. *et al.* Natural infection of cynomolgus monkeys with dengue virus occurs in epidemic cycles in the Philippines. **Journal of General Virology**, London, v. 94, pt. 10, p. 2202–2207, 2013.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 4, p. 687–696, 2007.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LANDRY, M. L.; ST GEORGE, K. Laboratory diagnosis of zika virus infection. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 141, n. 1, p. 60–67, 2017.

LANTERI, M. C. *et al.* West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: Implication for transfusion and transplantation safety. **Transfusion**, Arlington, v. 54, n. 12, p. 3232–3241, 2014.

LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 28, p. 681–690, 2014.

LEWIS, A. P. *et al.* Cloning and sequence analysis of κ and γ cynomolgus monkey immunoglobulin cDNAs. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 17, n. 6, p. 549–560, 1993.

LI, M. I. *et al.* Oral susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Fransisco, v. 6, n. 8, p. 1–6, 2012.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MANI, S. *et al.* Serological cross reactivity between zika and dengue viruses in experimentally infected monkeys. **Virologica Sinica**, Beijing, v. 33, n. 4, p. 378–381, 2018.

MANSUY, J. M. *et al.* Zika virus in semen and spermatozoa. **The Lancet Infectious diseases**, New York, v. 16, n. 10, p. 1106–1107, 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2016.

MAUK, M. G. *et al.* Point-of-care molecular test for zika infection. **Clinical Laboratory International**, Brussels, v. 41, p. 15–17, 2017.

MCCRAE, A. W.; KIRYA, B. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 76, n. 4, p. 552–562, 1982.

MEAD, P. S. *et al.* Zika virus shedding in semen of symptomatic infected men. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 378, n. 15, p. 1377–1385, 2018.

MOORE, C. A. *et al.* Congenital Zika Syndrome: characterizing the pattern of anomalies for pediatric healthcare providers. **JAMA Pediatrics**, Chicago, v. 171, n. 3, p. 288–295, 2018.

MOREIRA-SOTO, A. *et al.* Limited evidence for infection of urban and peri-urban nonhuman primates with Zika and Chikungunya viruses in Brazil. **mSphere**, Washington, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2018.

MURRAY, K. *et al.* Persistent infection with west Nile virus years after initial infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 201, n. 1, p. 2–4, 2010.

MURRAY, K. O. *et al.* Prolonged detection of Zika virus in vaginal secretions and whole blood. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 23, n. 1, p. 99–101, 2017.

MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 19, n. 14, p. 20761, 2014.

MUSSO, D. *et al.* Prevention of potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015a.

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 68, p. 53–55, 2015b.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GLUBER, J. D. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya. **The Lancet**, London, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

OLIVEIRA, W. K. *et al.* Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy — Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 9, p. 242–247, 2016.

OLSON, J. G. *et al.* Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

OSUNA, C. E. *et al.* Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, New York, v. 22, n. 12, p. 1448–1455, 2016.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, zika and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, Orange, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

PINTO JUNIOR, V. L. *et al.* Vírus Zika: revisão para clínicos. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015.

PISSINATTI, A.; GOLDSCHIMIDT, B.; SOUZA, I. V. Taxonomia. *In*: ANTENOR, A. *et al.* (ed.). **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2010. p.41-55.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

POMPON, J. *et al.* A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. **Nature**, London, v. 7, n. 1215, p. 1–8, 2017.

PRIYAMVADA, L. *et al.* Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Implications for protection and pathology. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, n. 5, p. 1–6, 2017.

RABE, I. B. *et al.* Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 21, p. 543–546, 2016.

RABINOWITZ, P. M. G. *et al.* A planetary vision for one health. **BMJ Global Health**, London, v. 3, n. e001137, p. 1–6, 2018.

REYES, Y. *et al.* Prolonged shedding of zika virus RNA in vaginal secretions, nicaragua. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 25, n. 4, p. 808–810, 2019.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU, V.-M. Vector competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1–8, 2016.

ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Viral Immunology**, New York, v. 21, n. 2, p. 123–132, 2008.

RUSSELL, P. K. The Zika pandemic - A perfect storm? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1–2, 2016.

SAVAGE, H. M. *et al.* Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 58, n. 4, p. 519–524, 1998.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. **Situação da Dengue, Chikungunya e Zika virus no Paraná - 2019-2020**. Curitiba, 2020. (Informe técnico 43– Semana Epidemiológica 31/2019 a 28/2020). Disponível em: <http://www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue>. Acesso em: 20 maio. 2021.

SEFEROVIC, M. *et al.* Experimental Zika virus infection in the pregnant common marmoset induces spontaneous fetal loss and neurodevelopmental abnormalities. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

SHAO, T. *et al.* Application of MCMC-Based Bayesian Modeling for genetic evolutionary and dynamic change analysis of Zika virus. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 10, p. 1–9, 2020.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural biology of the Zika virus. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.

SMARTT, C. T. *et al.* Short communication evidence of Zika virus RNA fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field-collected eggs from Camaçari, Bahia, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 54, n. 4, p. 1085–1087, 2018.

TERZIAN, A. C. B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

THANGAMANI, S. *et al.* Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 23, n. 5, p. 880–882, 2016.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Efficiency of Real-Time PC**. Waltham, | 2020. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>. Acesso em: 21 out. 2020.

THÉZÉ, J. *et al.* Genomic epidemiology reconstructs the introduction and spread of Zika virus in central short article genomic epidemiology reconstructs the introduction and spread of Zika virus in Central America and Mexico. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 23, p. 855–864, 2018.

TOGNARELLI, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, New York, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

VALENTINE, M. J.; MURDOCK, C. C.; KELLY, P. J. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. **Parasite Vectors**, London, v. 12, n. 463, p. 1–18, 2019.

VANCHIERE, J. A. *et al.* Experimental Zika virus infection of neotropical primates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 98, n. 1, p. 173–177, 2018.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 22, n. 409, p. 30–35, 2018.

VOERMANS, J. J. C. *et al.* Whole-blood testing for diagnosis of acute zika virus infections in routine diagnostic setting. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 25, n. 7, p. 1394–1396, 2019.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860–867, 2016.

WANG, L. *et al.* From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 561–565, 2016.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 85, p. 328-345, 2019.

WEAVER, S. C. *et al.* Zika , Chikungunya , and other emerging vector-borne viral diseases. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto,v. 69, p. 395–408, 2018.

WEGER-LUCARELLI, JA. *et al.* Vector competence of american mosquitoes for three strains of Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2016.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 7, p. e119–e126, 2016.

WOLFE, N. D.; DUNAVAN, C. P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, London, v. 447, n. 7142, p. 279–283, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika epidemiological update**. Geneva: WHO, 2019.

YOCKEY, L. J. *et al.* Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. **Cell**, Cambridge, v. 166, n. 5, p. 1247–1256, 2016.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHAO, H. *et al.* Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. **Cell**, Cambridge, v. 166, n. 4, p. 1016–1027, 2016.

ZHAO, B. *et al.* Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, London, v. 8, n. 14762, p. 1–9, 2017.

10. TRABALHO CIENTÍFICO

O artigo foi escrito no formato short communication e está de acordo com as normas da revista *Zoonoses and Public Health* - ISSN 1863-1959.

Short communication

Title: Lack of serological and molecular evidences of Zika virus circulation in non-human primates in three regions from Brazil

Amanda Haisi¹; Stacy Wu²; Nathalia Zini³, Maria Luana Cristiny Rodrigues da Silva⁴; Camila Dantas Malossi¹; Zalmir Silvino Cubas⁵; Patrícia Hoerner Cubas⁶; Rodrigo Hidalgo Frinciello Teixeira⁷; Mônica Shinneider de Souza⁸; Ricardo Barbosa Lucena⁹; Walfrido Kühl Svoboda¹⁰; Silvia Cristina Osaki²; Mauricio Lacerda Nogueira^{3,11}; Leila Sabrina Ullmann¹; João Pessoa Araújo Junior^{*1}

¹ Institute of Biotechnology, São Paulo State University (UNESP), Tecomarias Avenue, Botucatu, SP, 18607-440, Brazil.

² Departament of Veterinary Science, Federal University of Paraná, Rua Pioneiro, 2153-Dallas, Palotina, PR, 85950-000, Brazil.

³ Laboratório de Pesquisas em Virologia, Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto (FAMERP). Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP: 15090-000, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴ Federal University of Campina Grande (UFCG), Universitária Avenue, Santa Cecília, Patos, Paraíba, Brazil

⁵ Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

⁶ Zoológico Bosque do Guarani, Foz do Iguaçu, CEP:85851-220, Paraná, Brazil.

⁷ UNESP de Botucatu, Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens; Zoológico de Sorocaba e Universidade de Sorocaba/UNISO.

⁸ Universidade Federal de Campina Grande, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Areia-PB 58397000.

⁹ Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Areia-PB. CEP: 58397-000.

¹⁰ Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

¹¹ Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America.

*Corresponding author: João Pessoa Araújo Junior

Phone: +55 (14) 3880-0869 Email: joao.pessoa@unesp.br

Abstract

Zika virus belongs to the *Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family, similar to other arboviruses of public health interest. Its discovery occurred in 1947 with the virus isolation in captive Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), sentinel in the control of yellow fever in the Uganda forest. Due to the limited knowledge about the role of New World primates in ZIKV transmission cycles, this work aimed to investigate the presence of zoonotic circulation of ZIKV in non-human primates (NHPs) from three regions of Brazilian states: São Paulo, Paraíba and Paraná, using RT-qPCR TaqMan® assays, indirect ELISA and Test Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT). We analyzed 100 NHPs collected in 2018 and 2020 from both free-ranging and captive habitats. Tissue samples (n=75) of 34 NHP carcasses from São Paulo and Paraíba state were tested for ZIKV and YFV infection using RT-qPCR. Blood (n=66) and serum (n=58) samples from Paraná state were tested for ZIKV by molecular and serological assays. All samples (n=141) tested negative for ZIKV infection, suggesting the absence of active infection in 100 NHPs collected. Similarly, all serum (n=58) were negative in serological assays, demonstrating the absence of previous viral exposure of captive and free-ranging NHPs from Foz do Iguaçu-PR. For YFV infection, 21.21% (7/33) of PNH carcasses were positive and all correspond to São Paulo state. In conclusion, no evidences of viral circulation of ZIKV was found in neotropical primates, including the period of the yellow fever outbreak during 2018 in the Southeast region of Brazil. These results, even if negative, considerably contribute to the epidemiology and surveillance of ZIKV in sylvatic populations.

Keywords: Arbovirus, non-human primates, public health, sylvatic cycle.

Impacts:

- Negative results for ZIKV in RT-qPCR may indicate the lack of sylvatic cycle involving NHPs in three regions of Brazil;
- The lack of ZIKV antibodies in NHP suggest low or no viral circulation.

1. Introduction

Approximately 75% of emerging pathogens in humans are shared with animal reservoirs (Taylor, Latham, & Woolhouse, 2001). Specifically, non-human primates (NHP) are the most closest phylogenetically animals to humans and contribute with 20% of major human diseases (Wolfe, Dunavan, & Diamond, 2007). In addition, these mammals can act as natural sentinels for surveillance of emerging diseases, including arboviruses, mainly due to the presence of these animals in urban and peri-urban areas and also the proximity of some species to human activities which favors the events of spillback and spillover of these agents (Althouse et al., 2016; Terzian et al., 2018; Weaver, 2013).

Old World primates (OWP) are involved in the maintenance of the enzootic cycle of arboviruses of particular importance for public health, such as Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) in Africa and yellow fever virus (YFV) in Asia (Hanley et al., 2013). In Brazil, the evidence of natural susceptibility of New World primates (NWP) to ZIKV infection was first described in *Callithrix jacchus* and *Sapajus libidinosus* from Northeast (Favoretto et al., 2016). Similarly, the same genera *Callithrix* sp. and *Sapajus* sp. were positive to ZIKV in the Southeast region of the country and epidemiologically associated with positive *Aedes aegypti* in the same area, suggesting a ZIKV spillback event by transmission between urban vectors to NHP (Terzian et al., 2018). Recently, a study identified free-ranging howley monkeys (*Alouatta guariba*) infected by a lineage highly correlated with the ZIKV African strain, supported only by partial sequencing of non-structural protein 5 (NS5) (de Almeida et al., 2019). After that, only limited evidences of infection were reported, all involving low titers of neutralizing antibodies

(Moreira-Soto et al., 2018) or associated with cross-reactivity with other flaviviruses in plaque reduction neutralization test (PRNT) (De Abreu et al., 2020).

The establishment of the ZIKV sylvatic cycle involving neotropical primates in South America, mainly in Brazil, is supported by several factors, including the presence of susceptible vectors and abundant diversity of non-human primates species potentially capable to act as hosts for the sylvatic ZIKV cycle (Althouse et al., 2016). This scenario, as occurred with the spillback from the urban to the YVF sylvatic cycle in South Americas (Hinman, 1951; Soper, 1936), would provide a new dynamic transmission with immensurable negative impacts for both biodiversity and public health. Therefore, the main objective of the present study was to obtain evidence of the enzootic ZIKV circulation in free-ranging and captive non-human primates from Brazil.

2. Materials and Methods

The present study was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation (protocol CEUA/UNESP: 0206/2019), and the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO: 67891/2019).

2.1. Study areas

The present study was carried out in São Paulo, Paraíba and Paraná states. The NHP from Southeast and Northeast Brazil were sampled *post mortem* from 2018 to 2019, therefore regarded as a passive surveillance for ZIKV. Specific in Southeast, collection was performed during the epizootic yellow fever.

In Paraná state, the NHP collection was carried out in Foz do Iguaçu (25° 30' 58"; S 54° 35' 07" W), the municipality on the Triple Border with Argentina and Paraguay with approximately 250,000 habitants (IBGE, 2020), from december 2019 to march 2020, characterized as an active surveillance study with captive neotropical primates from Zoological Bosque do Guarani localized in the urban center of the city and the Rogerio Ribas Lange Zoological situated into the Refúgio Biológico Bela Vista (RBV) – ITAIPU

localized in the rural area of the city), and free-ranging black capuchin's (*Sapajus nigritus*) captured into the Permanent Protection Area of Itaipu Binacional (PPA-IB).

2.2. Sampling

Thirty-four carcasses from captive or free ranging animals from São Paulo and Paraíba states were subjected to necropsies performed by local authorities on health services. Tissue samples (n=75) (brain, heart, kidneys, liver, lungs and spleen) were collected and submitted to the Biotechnology Institute to ZIKV and YFV diagnosis.

In Foz do Iguaçu, the free-ranging animals were captured at the APP-IB using Tomahawk traps. In both situations, captive and free-ranging NHP were anesthetized with an association of ketamine hydrochlorine (10 mg/kg), xylazine (0.5mg/kg) and midazolam maleate (0.2 mg/kg). Blood (n=66) and serum (n=58) samples were collected using Vacutainer® (BD) in EDTA- anticoagulated tubes and in gel separator tubes for molecular and serological assays, respectively. All samples were stored at -80°C until use. In addition, all animals were physically examined, marked with microchips and returned to the origin place (captive or free-range) after complete recovery from the anesthetic's effects

2.3. PCR assays

RNA was extracted from tissues using a commercial kit (RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany) with 1.4 mm and 3.0 mm zirconium beads (Locus, Cotia, SP) in a speed blender (Next advance, Troy NY EUA), following the manufacturer's instructions.

For blood samples, RNA was extracted from 200 µL using a commercial ReliaPrep Viral TNA MiniPrep TNA kit (Promega, Madison, USA), according to the manufacture's recommendations. In both, RNA was eluted in 50 microliters, and to prevent cross contamination during this step, one negative control (RNase free water) was used in each cycle of extraction containing 10 samples.

All samples were analyzed for the presence of ZIKV by a TaqMan® reverse transcriptase quantitative polymerase reaction RT-qPCR, as previously described, with primers targeting the envelope gene (Lanciotti et al., 2008). The tissue samples from São

Paulo and Paraíba were tested to YFV by a RT-qPCR according to Domingo et al (2012). All the qPCRs were performed using the KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ 2X master mix (Merck, Germany), according to the manufacturer's instructions and using the AriaMX real time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EUA).

2.4 Serological assays

Serum samples were tested to determine the specific neutralization antibodies titers in a Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) with a modified protocol previously described (Roehrig, Hombach, & Barrett, 2008). The PRNT was performed in 24-well plates (Costar®, Corning Incorporated, NY, USA) with Vero E6 cells/well kept in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Cultilab, Brazil), using a fixed ZIKV^{BR} virus inoculum (~50 PFU) against varying serum dilutions (1:5 to 1:80). The plates were overlaid with a semi-solid medium (MEM 1×, 1% FBS, 1.5% carboxymethylcellulose) and incubated at 37°C in 5% CO for 4 days. After that, the cells' monolayer was fixed with a 10% formalin solution and 2% crystal violet solution. Neutralizing antibody titers were expressed by 80% of plaque reduction (PRNT_{80%}).

The indirect ELISA was conducted in all serum samples to detect specific IgG titers using a commercial test (Euroimmun, Germany), following the manufacturer's recommendations. Samples with an immune status score > 1.1 were considered IgG positive to ZIKV.

3. Results

3.1 Sampling

A total of 141 samples were collected from 100 NHP (Table 1) and analyzed for the presence of ZIKV infection by RT-qPCR, and 75 of these were also tested for the presence of yellow fever RNA from NHP carcasses.

Table 1. Diversity of neotropical primates collected during 2018 to 2020 in three Brazilian regions: São Paulo, Paraíba and Paraná states.

Species	Situation	State	Sex			Total
			F	M	I	
Southern Brown Howler Monkey (<i>Alouatta clamitans</i>)	Free-ranging	São Paulo	1	3	0	4
Black-capped Capuchin (<i>Sapajus apella</i>)			0	1	2	3
Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)			3	1	0	4
Black-penicilled Marmoset (<i>Callithrix penicillata</i>)			0	1	0	1
Guianan squirrel monkey (<i>Saimiri sciureus</i>)	Free-ranging	Paraíba	0	0	1	1
Capuchin monkey (<i>Sapajus</i> sp.)			0	0	1	1
Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)			0	0	17	17
Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	Captive from Zoobotanical Garden (Zoo Bica)	Paraná	3	0	0	3
Black-horned Capuchin (<i>Sapajus nigritus</i>)	Free-ranging (APP-IB)		7	21	0	28
Northern Brown Howler Monkey (<i>Alouatta guariba</i>)	Captive (Rogerio Ribas Lange Zoo)		3	3	0	6
Black-horned Capuchin (<i>Sapajus nigritus</i>)			3	5	0	8
Black Howler monkey (<i>Alouatta caraya</i>)	Captive (Bosque do Guarani)		1	0	0	1
Black-horned Capuchin (<i>Sapajus nigritus</i>)			9	6	0	15
Golden-headed Lion Tamarin (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	Zoological Garden)		1	2	0	3
Black-penicilled Marmoset (<i>Callithrix penicillata</i>)			4	1	0	5
Total			34	44	21	100

F: female; M: male and NI: not informed or I: indeterminate.

3.2 Molecular detection results

All samples (n=141) tested negative to the presence of ZIKV infection, regardless of the collection site or epidemiological situation. On the other hand, 7/34 (20.58%) of PNH carcasses were positive for yellow fever and all were from São Paulo state 7/12 (35.29%) (Table 2).

Table 2. List of positive NHPs in RT-qPCR for YFV from São Paulo state during the epizootic YFV in 2018.

ID	Species	Sex	Tissue	City - State	Date	RT-qPCR YFV	Ct value
MP15	<i>Callithrix penicillata</i>	male	heart	Itu - SP	2018	neg	No amp
MP16			liver			pos	35.36
MP17	<i>Alouatta clamitans</i>	male	liver	Sarapuí - SP	2018/03	pos	30.86
MP18			Not informed			pos	27.40
MP19	<i>Callithrix jacchus</i>	female	heart	Capela do Alto - SP	2018/09	pos	34.80
MP20			lung			pos	35.17
MP21	<i>Callithrix jacchus</i>	male	kidney	Capela do Alto - SP	2018/02	neg	No amp
MP22			lung			pos	34.88
MP23			kidney			neg	No amp
MP24			heart			pos	34.02
MP25	<i>Alouatta clamitans</i>	male	liver	Sarapuí - SP	2018/02	pos	15.92
MP26			heart			pos	33.32
MP27			liver			pos	14.4
MP30	<i>Alouatta clamitans</i>	female	brain	Tapiraí - SP	2018/02	neg	No amp
MP31			liver			pos	29.91
MP32			brain			pos	37.32
MP35	<i>Alouatta clamitans</i>	male	heart	Sarapuí - SP	2018/02	pos	23.46
MP36			liver			pos	17.74
MP37			lung			pos	24.18
MP38			lung			pos	23.45
MP39			heart			pos	26.59

Neg: negative in RT-qPCR; **Pos:** positive in RT-qPCR; **No amp:** no amplification in RT-qPCR.

3.3 Serological results

A total of 58 serum samples from Foz do Iguaçu-PR were screened for neutralizing antibodies to ZIKV. Only one NHP showed a titer PRNT80%: 5 and was

considered as an unspecific reaction. The association of negative results of PRNT and indirect ELISA, we conclude that these animals were negative to the presence of neutralizing and specific IgG antibody against ZIKV.

4. Discussion

Negative results from real time RT-PCR in our study suggest that no active infection by ZIKV were present in these 100 neotropical primates collected and that they probably were not involved in an enzootic transmission in the studied regions, including the epidemiological period of yellow fever outbreak in Southeast Brazil. Similar results were observed in non-human primates sampled in Rio de Janeiro and São Paulo during and before yellow fever outbreak (De Abreu et al., 2020). Additionally, other studies had not found evidence of ZIKV infection in domestic and wild animals sampled in the northeastern and central-western Brazilian states (Alex Pauvolid-Corrêa et al., 2019), and in two regions and three Brazilian states after analysis of 207 NHPs (Moreira-Soto et al., 2018).

During the Epizooties of yellow fever in 2018 and 2019 in Brazil, out of 3.499 of NHP death events with suspect infection in the endemic and extra-Amazonian region, a total of 65% (2.281) corresponded to the southeastern Brazilian region (BRASIL, 2019). Therefore, the positive results for YFV in 58.33% (7/12) of these animals from Southeast Brazil may suggest that the mortality was related with the yellow fever outbreak according with the collection period (2018). In addition, out of positives two were free-ranging *Callithrix jacchus*, a natural species from northeast and introduced in some regions, including the Southeast Brazil (Valença-Montenegro et al., 2021). These species have a great adaptability to urban and peri-urban environment and frequently interaction with humans occur, representing a potential risk to arboviral dispersal, including the urban and periurban yellow fever (Mares-Guia et al., 2020).

In urban and peri-urban areas humans are considered the unique host involved in the urban ZIKV transmission cycle involving *Aedes* spp. (Vasilakis & Weaver, 2018). Although Foz do Iguaçu presents the greatest number of autochthonous dengue cases among the cities of Paraná state, the notified cases of Zika (0,01%; 4/232) in one-year period (June 2019 and June 2020) (Secretaria da Saúde do Paraná, 2020) suggest low viral circulation during the same period of the samples collection, corroborating with the

negative results of serological methods in this sentinel population, therefore suggesting that neotropical primates were not exposed to the ZIKV in urban and conservation areas from Foz do Iguaçu-PR.

From an entomological aspect, the absence of ZIKV infection in wild animals from São Paulo state and the positivity for YFV may indicate the potential absence of competent vectors in sylvatic cycles for these arbovirus (Alencar et al., 2019). Although we have not collected mosquito samples, the refractory infection and low competence viral were observed in an experimental study with five wild neotropical mosquito species including *Haemagogus leucocelaenus* (Fernandes et al., 2019) considered one of primary sylvatic YFV vector in Brazil (de Abreu et al., 2019).

Unfortunately, the only available samples of these wild neotropical primates from the Northeast and Southeast Brazil were tissue samples, the lack of serological data impossibilitated to determinate the real absence of past exposure to the ZIKV. Therefore, further studies are encouraged, mainly due to the presence of neutralization antibodies in potential hosts (Moreira-Soto et al., 2018), favorable climate to vectors proliferation and a great diversity of wild fauna that can serve as reservoir for ZIKV in Brazil (Althouse et al., 2016).

For all regions analyzed, the absence of Zika virus circulation during the collection of these animals, does not exclude the constant monitoring by active and passive surveillance in order to find evidence of ZIKV circulation in these sentinels populations (Althouse et al., 2016), as well as the association with other arboviruses, such as yellow fever, to assess the impact on the biodiversity and human beings.

5. Conclusion

Even though there is no molecular and serological evidences of ZIKV infection in neotropical primates from the sampled regions, we emphasize the importance of monitoring these mammals as a surveillance tool that emphasizes the importance of NHP in arboviruses cycles, mainly ZIKV, due to a possible establishment of a sylvatic cycle of maintenance and also for the importance of studies with these animals as sentinels for human health.

Acknowledgments

Funding for Amanda Haisi's research fellowship was provided by the São Paulo State Research Foundation - FAPESP (2019/05288-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors are kindly thankful to Bela Vista Sanctuary, Itaipu Binacional and Bosque do Guarani Zoological Garden personal for support in the captures and sample collection and the Itaguapi Foundation for storage and shipping the samples. We also thank the University of Sorocaba (UNISO), Paraiba's Wild Animal Sorting Center (CETAS-PB) and Zoo Bica for the necropsies and sample collection. MLN and JPAJ are CNPq Research Fellows.

Conflict of interest

The authors report no conflict interest and have agreed the manuscript to be submitted.

References

- Alencar, J., de Mello, C. F., Marcondes, C. B., Guimarães, A. É., Toma, H. K., Bastos, A. Q., ... Machado, S. L. (2019). Natural infection and vertical transmission of two flaviviruses (Yellow fever and Zika) in mosquitoes in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro (Diptera: Culicidae). *BioRxiv*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/688713>
- Alex Pauvolid-Corrêa, G., Morgado, T. O., Sabino-santos, G., Helena, P., Rita, S., Teixeira, W., ... Komar, N. (2019). Zika Virus Surveillance at the Human – Animal Interface in West-central Brazil, 2017-2018. *Viruses*, 11(1164), 1–18. <https://doi.org/10.3390/v11121164>
- Althouse, B. M., Vasilakis, N., Sall, A. A., Diallo, M., Weaver, S. C., & Hanley, K. A. (2016). Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005055>
- BRASIL. (2019). Boletim Epidemiológico-39. Retrieved from <https://antigo.saude.gov.br/images/PDF/2019/dezembro/27/Boletim-epidemiologico-SVS-39-FINAL.PDF>
- De Abreu, F. V. S., Ferreira-De-Brito, A., De Souza Azevedo, A., Linhares, J. H. R., De Oliveira Santos, V., Miranda, E. H., ... Lourenço-De-Oliveira, R. (2020). Survey on non-human primates and mosquitoes does not provide evidences of

- spillover/spillback between the urban and sylvatic cycles of yellow fever and Zika viruses following severe outbreaks in southeast Brazil. *Viruses*, 12(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/v12040364>
- de Abreu, F. V. S., Ribeiro, I. P., Ferreira-de-Brito, A., Santos, A. A. C. dos, de Miranda, R. M., Bonelly, I. de S., ... Lourenço-de-Oliveira, R. (2019). *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerging Microbes and Infections*, 8(1), 218–231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>
- de Almeida, P. R., Ehlers, L. P., Demoliner, M., Eisen, A. K. A., Girardi, V., De Lorenzo, C., ... Spilki, F. R. (2019). Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/828871>
- Domingo, C., Patel, P., Yillah, J., Weidmann, M., Méndez, J. A., Nakouné, E. R., & Niedrig, M. (2012). Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4054–4060. <https://doi.org/10.1128/JCM.01799-12>
- Favoretto, S., Araújo, D., Oliveira, D., Duarte, N., Mesquita, F., Zanotto, P., & Durigon, E. (2016). First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir.
- Fernandes, R. S., Bersot, M. I., Castro, M. G., Telleria, E. L., Ferreira-de-Brito, A., Raphael, L. M., ... Lourenço-de-Oliveira, R. (2019). Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate an enzootic cycle in South America. *Scientific Reports*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56669-4>
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., & Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection Genetics and Evolution*, 19, 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.008>
- Hinman, E. . (1951). Yellow fever. In George K. Strode (Ed.), *Science* (Vol. 114, pp. 77a – 78). <https://doi.org/10.1177/0020852310388739>
- IBGE. (2020). Foz do Iguaçu/PR. Retrieved October 12, 2020, from <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/foz-do-iguacu/panorama>
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Mares-Guia, M. A. M. D. M., Horta, M. A., Romano, A., Rodrigues, C. D. S., Mendonça, M. C. L., Dos Santos, C. C., ... De Filippis, A. M. B. (2020). Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3966-x>
- Moreira-Soto, A., Carneiro, I. de O., Fischer, C., Feldmann, M., Kümmerer, B. M., Silva, N. S., ... Drexler, J. F. (2018). Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. *MSphere*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/msphere.00523-17>

- Roehrig, J. T., Hombach, J., & Barrett, A. D. T. (2008). Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunology*, 21(2), 123–132. <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0007>
- Secretaria da Saúde do Paraná. (2020). Informe técnico 43 - Situação da Dengue, Chikungunya e Zika virus no Paraná. Retrieved May 20, 2021, from <http://www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue>
- Soper, F. L. (1936). Jungle Yellow Fever. A New Epidemiological Entity in South America. *Revista Higiene e Saude Publica*, 10(4), 107–144.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
- Terzian, A. C. B., Zini, N., Sacchetto, L., Rocha, R. F., Parra, M. C. P., Del Sarto, J. L., ... Nogueira, M. L. (2018). Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34423-6>
- Valença-Montenegro, M. ., Bezerra, B. M., Ruiz-Miranda, C. R., Pereira, D. G., Miranda, J. M. D., Bicca-Marques, J.C., Oliveira, L., da Cruz, M. A. O. M., ... Mittermeier, R. . (2021). *Callithrix jacchus* (Common Marmoset) (amended version of 2018 assessment).
- Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2018). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol*, 22(409), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.11.007>
- Weaver, S. C. (2013). Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol*, 21(8), 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P., & Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature*, 447(7142), 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>

11. ANEXOS

Anexo I- Atestado de Aprovação de projeto de Pesquisa no CEUA.



ATESTADO

Atesto que o Projeto "DETECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO Zika virus (ZIKV) EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (PNH) NO BRASIL" **Protocolo CEUA 0206/2019**, a ser conduzido por Amanda Haisi, responsável/orientador João Pessoa Araújo Junior, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	11/12/2019 a 01/05/2021
Nome Comum / Espécie / Linhagem	PRIMATA / CALLITHRIX / vida livre ou cativeiro
Raça	não se aplica
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	142
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	50
Idade	4 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Paraná, São Paulo e Paraíba

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/03/2020

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br