FELIPE GONÇALVES MOTTA MAIA

ESTUDO DE INFECÇÕES POR FLAVIVÍRUS EM ROEDORES SILVESTRES DO NORDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2017

FELIPE GONÇALVES MOTTA MAIA

ESTUDO DE INFECÇÕES POR FLAVIVÍRUS EM ROEDORES SILVESTRES DO NORDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Versão original

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Maia, F. G. M.
Estudo de infecções por flavivírus em roedores silvestres do nordeste do estado de São Paulo / F. G. M. Maia; orientador Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. -- São Paulo, 2017.
69 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Arbovírus. 2. Flavivírus. 3. Ecologia. 4. Epidemiologia. 5. Silvestre. I. Tadeu Moraes Figueiredo, Luiz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Felipe Gonçalves Motta Maia**

Título da Tese: **Estudo de infecções por flavivírus em roedores silvestres do nordeste do estado de São Paulo**

Orientador(a): **Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **123** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Estudo da ocorrência de arboviroses em animais silvestres e mosquitos no Brasil"* do qual participam o(s) aluno(s) **Felipe Gonçalves Motta Maia, Gilberto Sabino dos Santos Junior,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.03.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 29 de março de 2012.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

P/ Patricia Castelucci
Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado (2011/22663-6) e pelos auxílios à pesquisa que possibilitaram a realização deste doutorado (2008/50617-6, 2010/50432-6 e 2014/02438-6).

Ao contribuinte do estado de São Paulo, que, com seus impostos, possibilitou a criação da FAPESP e da USP, assim como a manutenção destas instituições que impulsionam o desenvolvimento do estado e do país.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde realizei minha graduação e iniciei meu desenvolvimento na Biologia e na Ciência. A excelente formação oferecida possibilitou com que eu chegasse onde estou. Levar-te-ei sempre no meu coração!

A magnífica Universidade de São Paulo (USP), na qual tive a honra, o privilégio e o prazer, de realizar toda a minha pós-graduação e formação como cientista.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), por me receber e oferecer o suporte necessário a realização do presente doutorado.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), unidade da USP onde essa pesquisa foi realizada, por disponibilizar toda a estrutura necessária.

A Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP), por ter sido a “minha” Unidade da USP durante todo o desenvolvimento da fase de Culicidologia do projeto.

A todos os funcionários da Universidade de São Paulo, docentes e não docentes, que trabalham ou que trabalharam de modo empenhado no sentido de fomentar as atividades discentes, e de fazer com que a USP seja o que é hoje: uma das maiores e melhores universidades do mundo!

A todos os professores que trabalharam como mestres na formação do meu caráter, e na minha formação como pessoa crítica e como profissional qualificado.

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, pela orientação e pela autonomia oferecida, a qual possibilitou meu desenvolvimento como cientista.

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, do Centro de Pesquisa em Virologia (CPV-FMRP-USP), cujo fascínio e empolgação pela Ciência da Vida serão sempre fonte de inspiração. É o médico mais biólogo que já tive o prazer de conhecer!

Ao Prof. Dr. Bendito Lopes da Fonseca, do CPV-FMRP-USP, pelas sempre importantes sugestões para a realização do trabalho, e pelo conhecimento compartilhado na disciplina de virologia e nas discussões nas reuniões do nosso Centro de Pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez, do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), por possibilitar que eu entendesse e aprendesse verdadeiramente a Estatística. A Matemática e a Estatística mudam a forma de ver e entender o universo. Seu caráter e seus princípios humanos serão sempre um norte para mim e para muitos outros alunos! Um exemplo como professor e como pesquisador ético.

A Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, que me apresentou ao fantástico mundo dos culicídeos, que me impulsionou para esse mundo através de sua admiração e amor à entomologia, e que me recebeu na Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP), a Unidade da USP que mais me encantou e me envolveu.

Aos Professores Carlos Pelleschi Taborda e Maria Rita Café, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB-USP, por me fazerem sentir bem-vindo ao Programa.

Ao Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini, do Departamento de Fitopatologia e do Bioagro da UFV, e meu orientador de iniciação científica. É um exemplo como professor, orientador, pesquisador e chefe de laboratório. Ficaria muito feliz se conseguisse ser um profissional tão competente e disposto como ele.

A Gisele da Graça Santana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Seu trabalho e empenho são fundamentais para o bom funcionamento do Programa. Obrigado pela assistência ao longo desses anos!

A Tereza Cristina Soutto Mayor, funcionaria da biblioteca do ICB-USP, pela simpatia, paciência, boa vontade, disposição e atenção, nas orientações para a normalização técnica desta tese.

A Soraya Jabur Badra, técnica do nosso laboratório, por toda a ajuda na bancada e pelos inúmeros momentos divertidos!

Aos técnicos Aristides Fernandes e Marcia Bicudo do laboratório de Culicidologia Médica do Departamento de Epidemiologia da FSP-USP, por toda a assistência concedida nos estágios em identificação morfológica de culicídeos adultos que realizei. Foram meses de trabalho, aprendizado e convivência agradável.

A toda a minha família pelo apoio, amor e carinho. Não seria quem sou e não estaria onde estou sem eles!

A Luana, minha esposa, pelo amor, apoio, força, incentivo e cumplicidade. Sou muito grato e feliz por tê-la comigo. Você é muito importante na minha vida!

Ao Gilberto Sabino dos Santos Junior, meu colega na empreitada da pós-graduação e da pesquisa, e meu irmão baiano na caminhada da vida. Trabalhar junto torna o trabalho mais leve e produtivo ao mesmo tempo. Nossa parceria é um exemplo de que dois mais dois pode ser maior do que quatro.

A Renata Lara Muylaert, doutoranda em Ecologia da Unesp de Rio Claro, pelos ensinamentos para o trabalho com morcegos e pelo bons momentos em campo.

Aos meus colegas do Centro de Pesquisa em Virologia (CPV-FMRP-USP), que ajudaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho.

As pessoas de todo o mundo que empenham tempo, energia e conhecimento, no desenvolvimento do software livre, vários dos quais foram muito importantes para realização deste doutorado.

A todos aqueles que deram suporte aos trabalhos de campo, possibilitando que eles acontecessem.

A todos que ajudaram de alguma forma para a realização do presente projeto.

“A paciência é uma árvore de raiz amarga mas de frutos muito doces”.

(Autor desconhecido)

Resumo

MAIA, F. G. M. **Estudo de infecções por flavivírus em roedores silvestres do nordeste do estado de São Paulo.** 2017. 70 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As arboviroses acometem centenas de milhares de pessoas anualmente no Brasil, levando, muitas delas, à morte. O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades em arbovírus do planeta, tendo mais de uma centena de espécies já isoladas e documentadas. Estudos prévios revelaram que espécies de arbovírus estão circulando no país de modo velado em áreas urbanas, rurais e florestais. O conhecimento de aspectos da epidemiologia e biologia viral como ciclo silvestre mantenedor, gama de hospedeiros, sazonalidade, disseminação, área de ocorrência, história evolutiva e diversidade genética, são fundamentais para a definição de estratégias de prevenção e controle pelos órgãos públicos de saúde e vigilância epidemiológica. Nesse sentido, tivemos como objetivo pesquisar a ocorrência de flavivírus em pequenos roedores silvestres. Para tal finalidade, capturamos esses animais em fragmentos de Cerrado e propriedades rurais localizadas nas cidades de Ribeirão Preto, Batatais, Cajuru e Luiz Antônio, no nordeste do estado de São Paulo. Amostras de sangue foram coletadas e submetidas ao ensaio sorológico ELISA-indireto para detectar anticorpos IgG contra os flavivírus Rocio, Oeste do Nilo e da Encefalite de Saint Louis. Nosso método utilizou peptídeos recombinantes correspondentes ao domínio III da proteína de envelope de cada um desses 3 vírus. Adicionalmente, realizamos RT-PCR com primers gênero-específicos e espécie-específicos para a detecção de genoma de flavivírus. Altas soroprevalências foram encontradas nas diversas espécies de roedores capturadas, para um ou mais dos vírus testados. Esse achado sustenta a hipótese de que esses vírus são capazes de infectar também pequenos mamíferos selvagens, o que, por sua vez, pode indicar a existência de novos atores em um ciclo silvestre mantenedor.

Palavras-chave: Arbovírus. Flavivirus. Ecologia. Epidemiologia. Silvestre

Abstract

MAIA, F. G. M. **Study of infections by flaviviruses in wild rodents in the northeast of São Paulo state.** 2017. 70 f. Ph.D. Thesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Arboviruses affect hundreds of thousands of people annually in Brazil, leading, many of them, to death. Brazil has one of the largest arbovirus biodiversities in the world, with more than 100 species already isolated and documented. Previous studies have revealed that arbovirus species are circulating in the country veiled in urban, rural and forest areas. The knowledge of aspects of epidemiology and viral biology such as silvatic cycle, range of hosts, seasonality, dissemination, area of occurrence, evolutionary history and genetic diversity, are fundamental for the definition of strategies of prevention and control by public health and epidemiological surveillance agencies. In this sense, we aimed to investigate the occurrence of flavivirus in small wild rodents. For this purpose, we captured these animals in fragments of Cerrado and rural properties located in the cities of Ribeirão Preto, Batatais, Cajuru and Luiz Antônio, in the northeast of the state of São Paulo. Blood samples were collected and subjected to the ELISA-indirect serological assay to detect IgG antibodies against flaviviruses Rocio, West Nile, and Saint Louis Encephalitis. Our method used recombinant peptides corresponding to domain III of the envelope protein of each of these 3 viruses. In addition, we performed RT-PCR with genus-specific and species-specific primers for the detection of the flavivirus genome. High seroprevalences were found in several species of rodents captured, for one or more of the viruses tested. This finding supports the hypothesis that these viruses are also capable of infecting small wild mammals, which, in turn, may indicate the existence of new actors in a sustaining silvatic cycle.

Key-words: Arbovirus. Flavivirus. Ecology. Epidemiology. Silvatic

Lista de ilustrações

Figura 1 – A família *Flaviviridae* 17
Figura 2 – Reconstrução tridimensional por crio-microscopia eletrônica de alta resolução do vírus da Dengue. 18
Figura 3 – Ciclo replicativo do flavivírus da Dengue. 18
Figura 4 – Organização do genoma de YFV, protótipo do genero *Flavivirus* 19
Figura 5 – Representação esquemática de uma partícula de flavivírus. 20
Figura 6 – Árvore filogenética dos flavivírus patogênicos. 21
Figura 7 – Árvore filogenética Bayesiana dos flavivírus patogênicos e não patogênicos.. 22
Figura 8 – Ciclo de transmissão do vírus da Febre Amarela. 24
Figura 9 – Número de casos da forma neuroinvasiva da infecção por SLEV nos EUA entre 2004 e 2013. 28
Figura 10 – Estrutura da molécula da glicoproteína E de um virion maduro de DEN. 31
Figura 11 – Sítios de captura. 33
Figura 12 – Município de Luiz Antônio. 35
Figura 13 – Sítios de captura na EEJ. 36
Figura 14 – Município de Cajuru. 37
Figura 15 – Município de Batatais. 38
Figura 16 – Sítios de captura em Batatais. 39
Figura 17 – *Layout* da placa de ELISA padrão. 46

Lista de tabelas

Tabela 1 – Cepas virais utilizadas no estudo. 41
Tabela 2 – Primers gênero-específicos e espécie-específicos utilizados na RT-PCR convencional para os principais flavivírus brasileiros. 47
Tabela 3 – Número de indivíduos capturados por espécie de roedor e por cidade. 51
Tabela 4 – Resultados dos testes sorológicos para ROCV (R), SLEV (S) e WNV (W). Os resultados estão discriminados de acordo com a tipo de reatividade (mono-, di- ou tri-) das amostras. As totalidades relativas (100%) correspondem à somatória das colunas (relatividade por espécie de roedor). 53
Tabela 5 – Resultados dos testes sorológicos para ROCV (R), SLEV (S) e WNV (W). Os resultados estão discriminados de acordo com a tipo de reatividade (mono-, di- ou tri-) das amostras. As totalidades relativas (100%) correspondem à somatória das linhas (relatividade por tipo de reatividade). 55

Lista de abreviaturas e siglas

Da	Dalton
DENV	Vírus da Dengue
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EEJ	Estação Ecológica de Jataí
ER	Retículo Endoplasmático
HCV	Vírus da Hepatite C
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
ILHV	Vírus Ilhéus
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
MIAF	Fluido Ascítico Imune Murino
OD	Densidade Ótica
ORF	Quadro de Leitura Aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas
RdRp	RNA polimerase RNA-dependentes
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCV	Vírus Rocio
RT	Transcrição Reversa
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
SNC	Sistema Nervoso Central
UTR	Região não-Traduzida
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela

Sumário

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1 Os arbovírus 16
2.1.1 A família *Flaviviridae* 16
2.1.1.1 O gênero *Flavivirus* 17
2.1.1.1.1 Rocio 23
2.1.1.1.2 Encefalite de Saint Louis 26
2.1.1.1.3 Oeste do Nilo 27
2.1.1.1.4 A proteína do envelope dos flavivírus 29

3 OBJETIVOS 32

3.1 Objetivo Geral 32
3.2 Objetivos Específicos 32

4 MATERIAL E MÉTODOS 33

4.1 Área de estudo e metodologia de captura 33
4.1.1 Luiz Antônio 34
4.1.2 Cajuru 37
4.1.3 Batatais 38
4.1.4 Ribeirão Preto 39
4.2 Amostragem 39
4.3 Determinação das características ecológicas 40
4.4 Flavivírus utilizados 40
4.5 Produção do estoque viral 41
4.5.1 Em cérebro de camundongo recém-nascido 41
4.5.2 Em cultura celular 41
4.6 Preparo de fluidos ascíticos imunes (MIAFs) 42
4.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) 42

4.8 Titulação viral por formação de foco 43
4.9 Produção dos peptídeos recombinantes 44

4.10 **Extração e purificação dos peptídeos recombinantes** **44**
4.11 **Dosagem dos peptídeos recombinantes** **45**
4.12 **ELISA para os flavivírus Rocio, Saint Louis e Oeste do Nilo** **45**
4.13 **Detecção genômica viral** **47**
4.13.1 Extração de RNA 47
4.13.2 Primers para *flavivirus* 47
4.13.3 Transcrição reversa (RT) 48
4.13.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional 48
4.13.5 Multiplex-nested-PCR e nested-PCR para flavivírus 48
4.13.6 Eletroforese 48

5 **RESULTADOS** **50**

5.1 **Capturas** **50**
5.2 **Sorologia** **52**
5.2.1 Análises por espécie de roedor 52
5.2.2 Análises por tipo de reatividade 54
5.3 **Detecção genômica** **56**

6 **DISCUSSÃO** **57**

7 **CONCLUSÃO** **59**

REFERÊNCIAS **60**

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses acometem centenas de milhares de pessoas anualmente no Brasil, levando, muitas delas, à morte. O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades em arbovírus do planeta, tendo mais de uma centena de espécies já isoladas e documentadas. Apesar da grande importância para a saúde pública nacional, pouco se sabe a respeito desses agentes patogênicos. Estudos prévios revelaram que espécies de arbovírus estão circulando no país de modo velado em áreas urbanas, rurais e florestais. Por causarem quadros clínicos pouco específicos de doença febril aguda e meningoencefalite, as arboviroses são frequentemente mal diagnosticadas e assim subnotificadas. O conhecimento de aspectos da epidemiologia e biologia viral como ciclo silvestre mantenedor, gama de hospedeiros, sazonalidade, disseminação, área de ocorrência, história evolutiva e diversidade genética, são fundamentais para a definição de estratégias de prevenção e controle pelos órgãos públicos de saúde e vigilância epidemiológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os arbovírus

Arbovírus são vírus, na sua maioria zoonóticos, transmitidos por artrópodes, mosquitos e carrapatos, para humanos, primatas não humanos, aves, répteis, marsupiais, entre outros. O artrópode se infecta com o vírus ao se alimentar com o sangue de animal infectado e após um período de incubação, dito extrínseco, transmite o mesmo aos animais nos quais venha a se alimentar. Incluem-se no conceito epidemiológico de arbovírus, vírus de RNA pertencentes às famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (FIGUEIREDO, 2007).

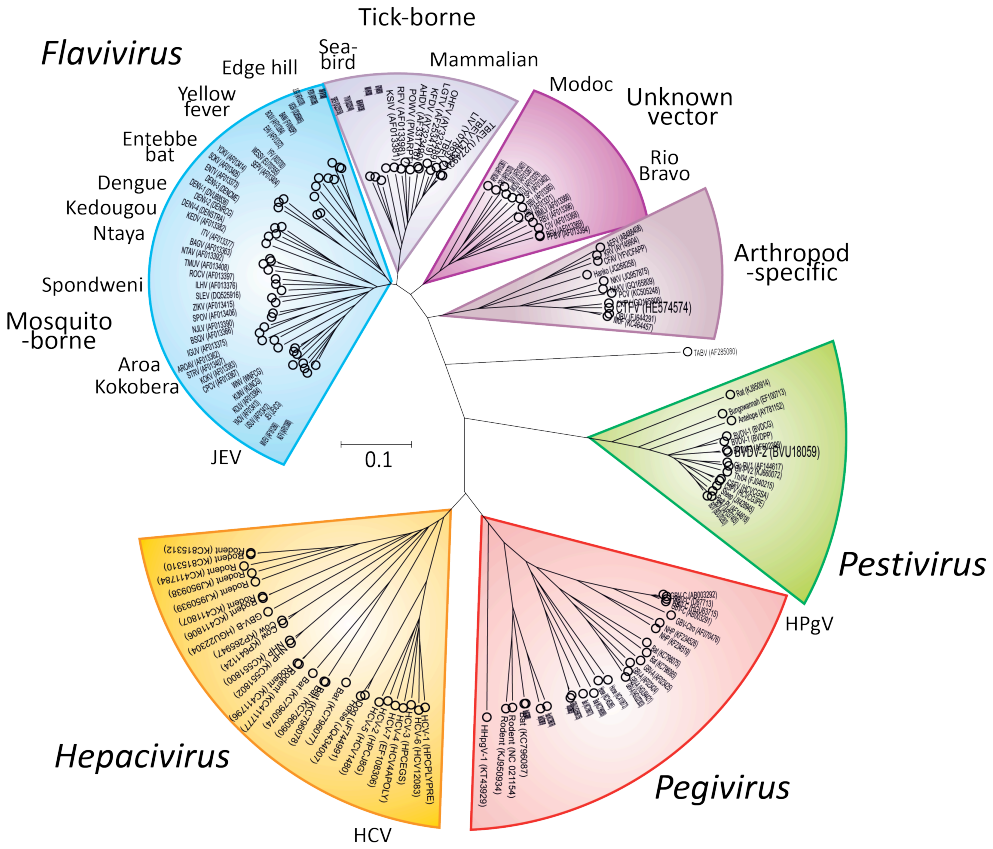
Uma espécie viral pode estar presente em diferentes domínios morfoclimáticos e até em diferentes continentes e assim utilizar diversos hospedeiros invertebrados e vertebrados para sua replicação. Pode-se citar como exemplo o vírus da Febre Amarela (YFV) presente na África e nas Américas Central e do Sul. Nas Américas o YFV utiliza um ciclo de transmissão silvestre, envolvendo macacos e mosquitos *Haemagogus* sp., e um ciclo de transmissão urbana, envolvendo o homem e mosquitos *Aedes aegypti*, especialmente adaptados às cidades e à antropofilia (BARRETT; HIGGS, 2007). Os arbovírus podem ter características epidemiológicas distintas dependendo do local onde ocorrem as infecções. Este é o caso do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), que causa surtos frequentes de encefalite na América do Norte mas raramente na América do Sul, onde, também, está presente (DIAZ et al., 2006).

Os vírus de RNA utilizam para a replicação de seus genomas, enzimas RNA-polimerase RNA-dependentes (RdRp), as quais frequentemente apresentam altas frequências de incorporação de erros (mutações) e ausência de atividade de leitura de prova (*proof-reading*). Isso gera grande variabilidade genética, a qual confere maiores chances de sobrevivência da espécie viral frente a pressões seletivas diversas, assim como confere maiores chances de emergências e reemergencias (FIGUEIREDO, 2007).

2.1.1 A família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é composta por 4 gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e, mais recentemente, *Pegivirus* (STAPLETON et al., 2011) (Figura 1). O genoma apresenta uma organização muito semelhante entre os membros da família. É constituído por RNA de fita simples, polaridade positiva e aproximadamente 11, 12,3, 9,6 e 11,2 kb (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*, respectivamente). Os virions apresentam diâmetro na faixa de 40 a 60 nm, morfologia esférica e envelope lipídico (Figura 2).

Figura 1 – A família *Flaviviridae*. Árvore filogenética construída a partir de sequencias aminoacídicas conservadas da proteína RdRp (NS5), utilizando o modelo de substituição *neighbor-joining*. Os 4 gêneros que constituem a família (*Flavivi- rus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*) compõem os 4 clados majoritários. O gênero mais recentemente incluído, o *Pegivirus*, descoberto causando infecção hepática persistente em humanos, é agrupado próximo ao gênero *Hepacivi- rus*, cujo membro protótipo é o vírus da hepatite C (HCV), causador de patologia semelhante. Reproduzido de *ICTV Virus Taxonomy - The Online (10th) Report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses - Chap- ter: Family Flaviviridae* (<http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_ report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae>).



O capsídeo é composto por uma pequena e única proteína, e o envelope contém duas ou três glicoproteínas virais de membrana. O envelope lipídico, derivado da célula hospedeira, representa cerca de 17% da massa da partícula viral. Sua montagem ocorre no retículo endoplasmático (ER); e a maturação ocorre na passagem pelo Golgi e transporte em vesículas até a membrana citoplasmática, onde a partícula madura é exocitada (Figura 3). A gama de hospedeiros inclui todos os gêneros de mamíferos. A maior parte dos membros do gênero *Flavivirus* são transmitidos por artrópodes (KING et al., 2012).

2.1.1.1 O gênero *Flavivirus*

O vírus da febre amarela (YFV) é o protótipo do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*. O genoma completo da cepa 17D (Asibi) é composto de 10.862 nucleotídeos,

Figura 2 – Reconstrução tridimensional por crio-microscopia eletrônica de alta resolução do vírus da Dengue. A imagem da esquerda é uma partícula imatura (resolução de 12.5A) enquanto que a partícula da direita é uma partícula madura (resolução de 10A). O triângulo destaca um unidade icosaédrica. Reproduzido de *ICTV Virus Taxonomy - The Online (10th) Report of the International Commitee on Taxo- nomy of Viruses - Chapter: Family Flaviviridae* (<http://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae>).

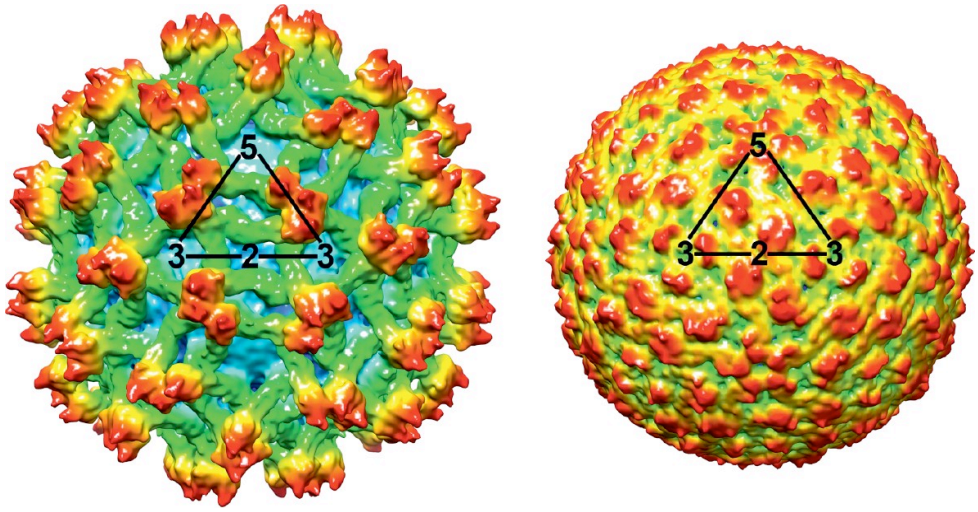


Figura 3 – Ciclo replicativo do flavivírus da Dengue. A entrada do vírus na célula se da por endocitose, mediada por um receptor ubíquo e de baixa afinidade, como o DC-SIGN. A acidificação do endossomo leva à fusão de membranas e liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma e, posteriormente, a liberação do RNA genômico. No retículo endoplasmático, o RNA genômico é replicado e traduzido em uma poliproteína. O virion montado no ER é transportado para o golgi e, de lá, para a membrana celular, onde é exocitado. A maturação se dá durante o transporte celular até a membrana. Reproduzido de Clyde, Kyle e Harris (2006).

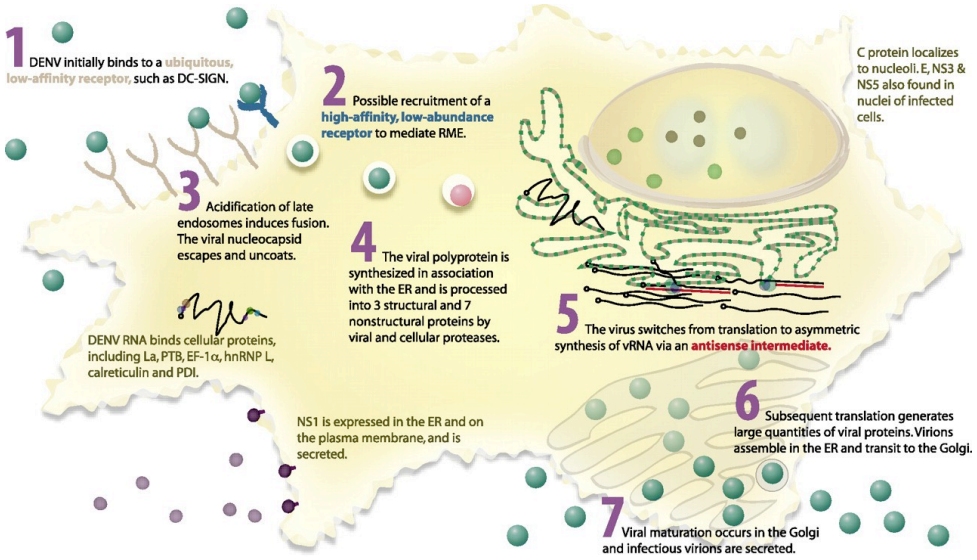
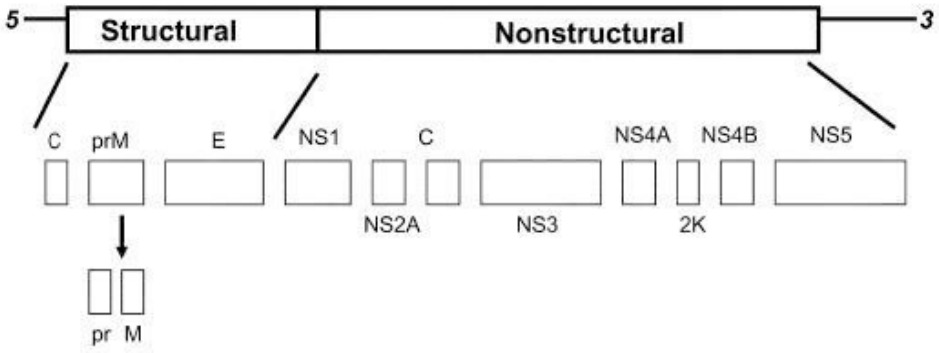


Figura 4 – Organização do genoma de YFV, protótipo do gênero *Flavivirus*. Seu genoma, assim como o dos outros membros do gênero, apresenta uma única ORF, a qual codifica uma poliproteína e é flanqueada nas duas extremidades por regiões não traduzidas (UTR - *Untranslated Region*). A ORF pode ser dividida em duas grandes porções: estrutural e não-estrutural. Os genes estruturais codificam as proteínas do capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope (E). Os genes não-estruturais (NS) codificam as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Reproduzido de Tomori (2004).

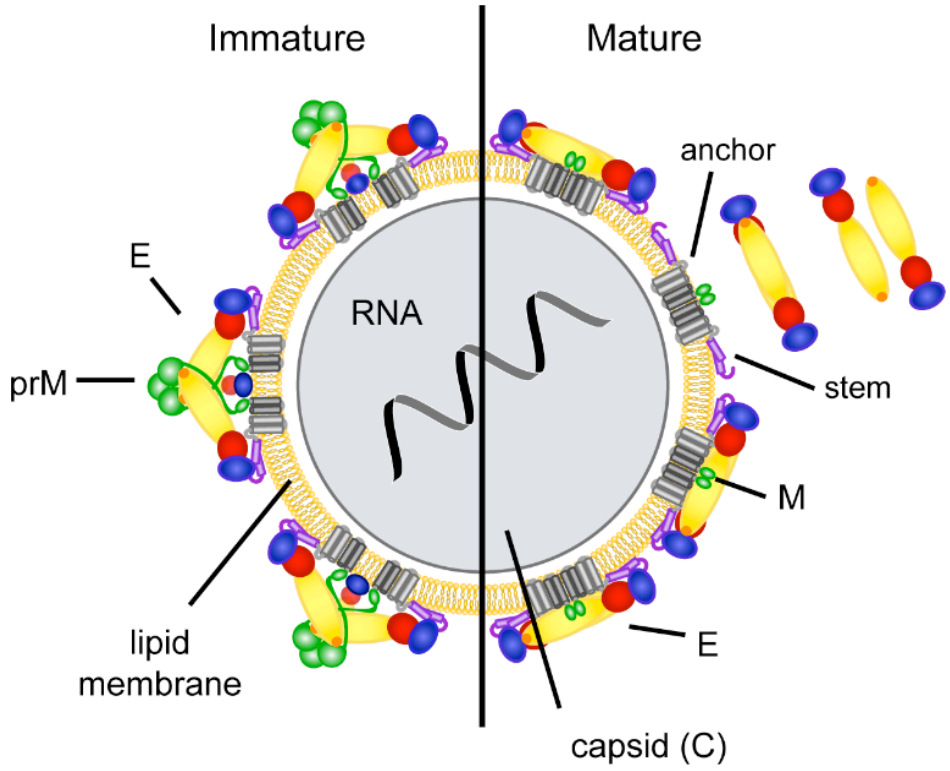


que contem um único quadro de leitura aberta (Open Reading Frame - ORF) de 10.233 nucleotídeos, a qual codifica 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais. A ORF é flanqueada por regiões não-traduzidas em ambas as extremidades (5' e 3'). Os 3 genes estruturais são: capsídeo (C) (11 kDa), pré-membrana/membrana (prM/M) (26 kDa/8kDa) e envelope (E) (50 kDa). Os genes não-estruturais (NS) são: NS1 (46 kDa), NS2A (22 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (70 kDa), NS4A (16 kDa), NS4B (27 kDa)e NS5 (103 kDa) (Figura 4). As proteínas estruturais são incorporadas às partículas virais, enquanto que as proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação e sobrevivência do vírus no hospedeiro (RICE et al., 1985).

Os virions são pequenos (50nm), constituídos de uma bicamada lipídica com proteínas de membrana (M) e glicoproteínas de envelope (E) ancoradas. Esse envelope envolve o nucleocapsídeo viral, o qual consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva complexado a múltiplas cópias de uma pequena e básica proteína do capsídeo (C). A proteína prM é ancorada à membrana do ER em regiões onde acontece a montagem do vírus. Depois desta etapa, a partícula é transportada para o Golgi, onde é incluída na via secretória normal da célula. No caminho entre o Golgi e a membrana celular, ocorre a maturação da partícula, fase na qual a proteína prM é clivada pela enzima Furina e transformada na proteína M. A porção pr da proteína prM é descartada (Figura 5). A glicoproteína E é o ligante do receptor da célula susceptível. Ela é encontrada no virion na forma dimérica, e é quem media a ligação e fusão à membrana da célula hospedeira durante a entrada viral. Além disso, é o principal determinante antigênico na partícula viral, por ficar exposta na superfície do vírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

As funções das proteínas não-estruturais ainda não são bem conhecidas. Na célula

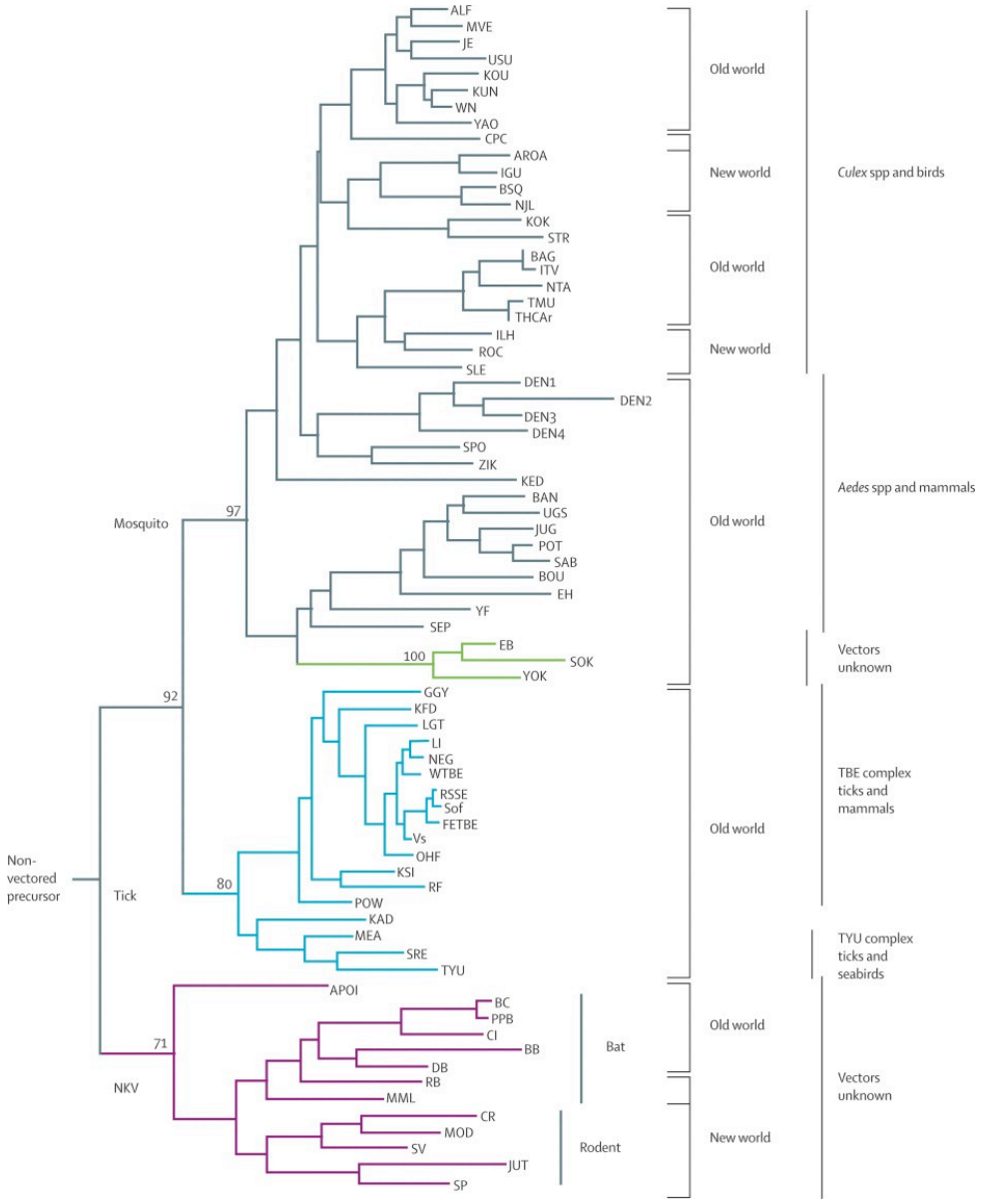
Figura 5 – Representação esquemática de uma partícula de flavivírus. O genoma viral é constituído de uma fita simples de RNA no centro do capsídeo, o qual é envolto por uma bicamada lipídica contendo proteínas virais ancoradas. Lado esquerdo - fase imatura do virion: contem dímeros de proteína E associadas a proteína prM. Lado direito - fase madura do virion: a proteína E apresenta-se com uma nova conformação, e associada à proteína M sem a porção pr, a qual foi clivada e descartada. Adaptado de Vratskikh et al. (2013).



hospedeira, a NS1 atua da replicação do RNA viral e, complexada a NS2B, forma uma serina-protease envolvida do processamento da poliproteína. A NS1 secretada para o meio extracelular, regula a ativação do sistema complemento. A NS3 contém 2 domínios: helicase de RNA, necessário para a replicação do genoma viral, e trifosfatase de RNA, o qual provavelmente atua na formação da estrutura cap na porção 5' do RNA viral. A NS5 é uma proteína grande (103 KDa) e multifuncional, com atividades de metiltransferase e RdRP (KING et al., 2012). O gene NS5, por ser muito conservado no gênero *Flavivirus*, é frequentemente utilizado na confecção de *primers* com o objetivo de detectar e identificar seus membros (BRONZONI et al., 2005).

O gênero *Flavivirus* é constituído por 53 espécies de vírus reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), segundo dados da última ratificação do comitê, de 2016 (MSL 30) (<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>). Estudos filogenéticos indicam a distribuição das espécies patogênicas de flavivírus em 3 grandes grupos de acordo com o vetor responsável pela transmissão. São eles: mosquitos, carrapatos e de vetor desconhecido. Aqueles transmitidos por mosquitos formam o maior e mais

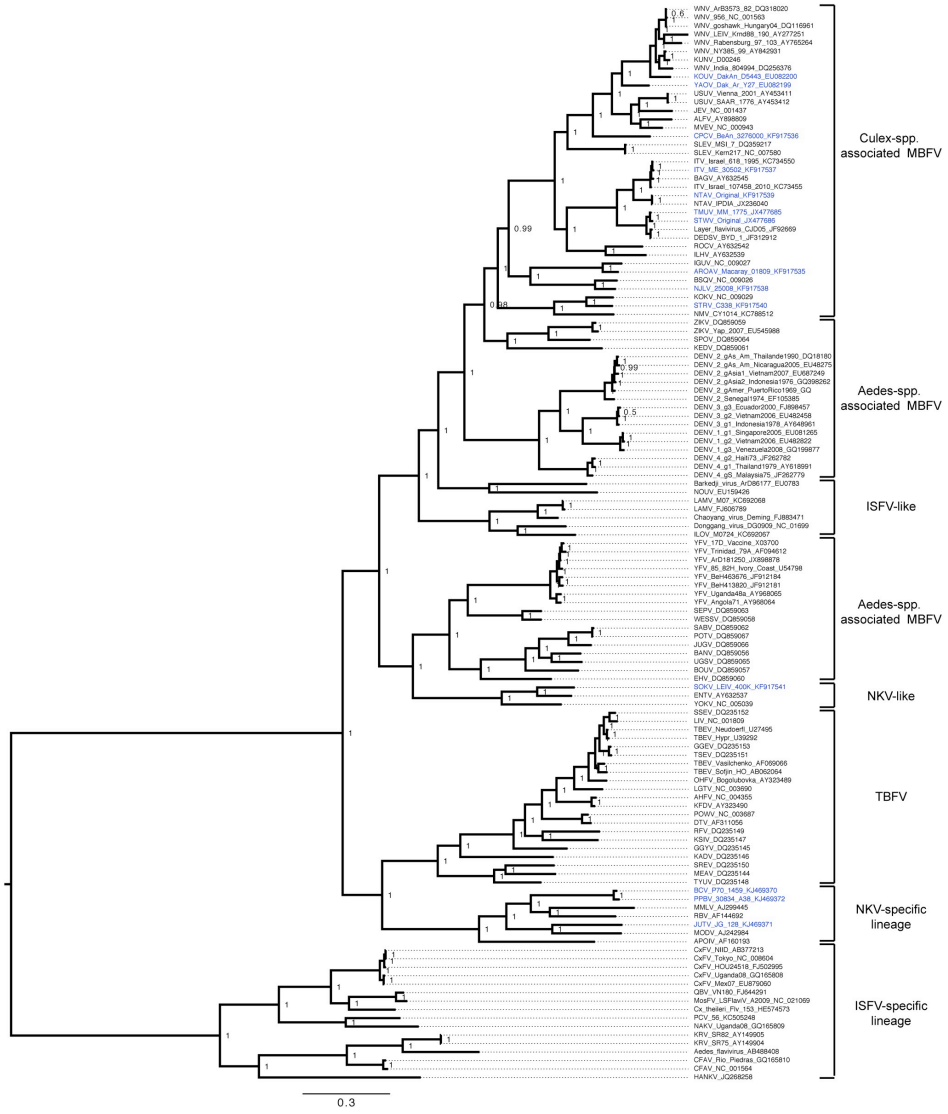
Figura 6 – Árvore filogenética dos flavivírus patogênicos. Os flavivírus podem ser agrupados em diversos clados, em diferentes níveis, de acordo com análises filogenéticas. Os principais grupos são daqueles transmitidos por carrapatos, vetor desconhecido e mosquitos, sendo este último o de maior importância em saúde pública. Reproduzido de Gould et al. (2001).



diversificado grupo, podendo ser subdividido nos grupos dos vírus transmitidos por mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Mais ainda, esses conjuntos podem ser novamente divididos, em vírus do velho mundo e vírus do novo mundo (Figura 6) (GOULD et al., 2001). Nos últimos anos, uma nova categoria foi descoberta: a dos flavivírus específicos de insetos (Figura 7). O que se sabe até o momento, é que esses vírus não se replicam em vertebrados, apenas em artrópodes (MOUREAU et al., 2015).

Os flavivírus podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo artrópodes (culicídeos e carrapatos) e vertebrados (anfíbios, repteis, aves e mamíferos diversos).

Figura 7 – Árvore filogenética Bayesiana dos flavivírus patogênicos e não patogênicos. Flavivírus específicos de insetos (ISFV) foram descobertos nos últimos anos, adicionando uma nova classe de vírus à arvore filogenética do gênero. Até então, eram conhecidos os flavivírus transmitidos por mosquitos (MBFV), os transmitidos por vetor desconhecido (NKV) e os transmitidos por carrapatos (TBFV). Reproduzido de Moureau et al. (2015).



O artrópode adquiri o vírus ao se alimentar do sangue de um vertebrado virêmico. O vírus atravessa a parede intestinal do artrópode e, através da hemolinfa, chega a glândula salivar, onde se replica intensamente. O mosquito infectado transmite o vírus para um outro vertebrado ao realizar um novo repasto sanguíneo, concluindo o ciclo de transmissão (Figura 8). Outro forma de transmissão possível para os flavivírus é a vertical ou transovariana, que consiste na passagem do vírus da fêmea infectada do artrópode para a sua prole (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). A transmissão do vírus Zika também pode ocorrer por via sexual, podendo ser encontrado no sêmen por 6 meses após o contágio. Embora possível, essa forma de transmissão é considerada de menor importância epidemiológica para a manutenção do vírus em ciclo urbano (FRIEDEN; SCHUCHAT; PETERSEN, 2016).

A maioria dos casos de infecção por flavivírus é assintomática ou oligossintomática, causando apenas uma doença febril aguda, semelhante à gripe ou resfriado. Uma ampla gama de sintomas e sinais, mais ou menos específicos, pode ocorrer, a depender de fatores do hospedeiro, do ambiente e do patógeno. Isso dificulta substancialmente, ou até impossibilita, o diagnóstico clínico correto, sendo necessária a realização de testes laboratoriais para a maior confiabilidade (WEAVER; BARRETT, 2004).

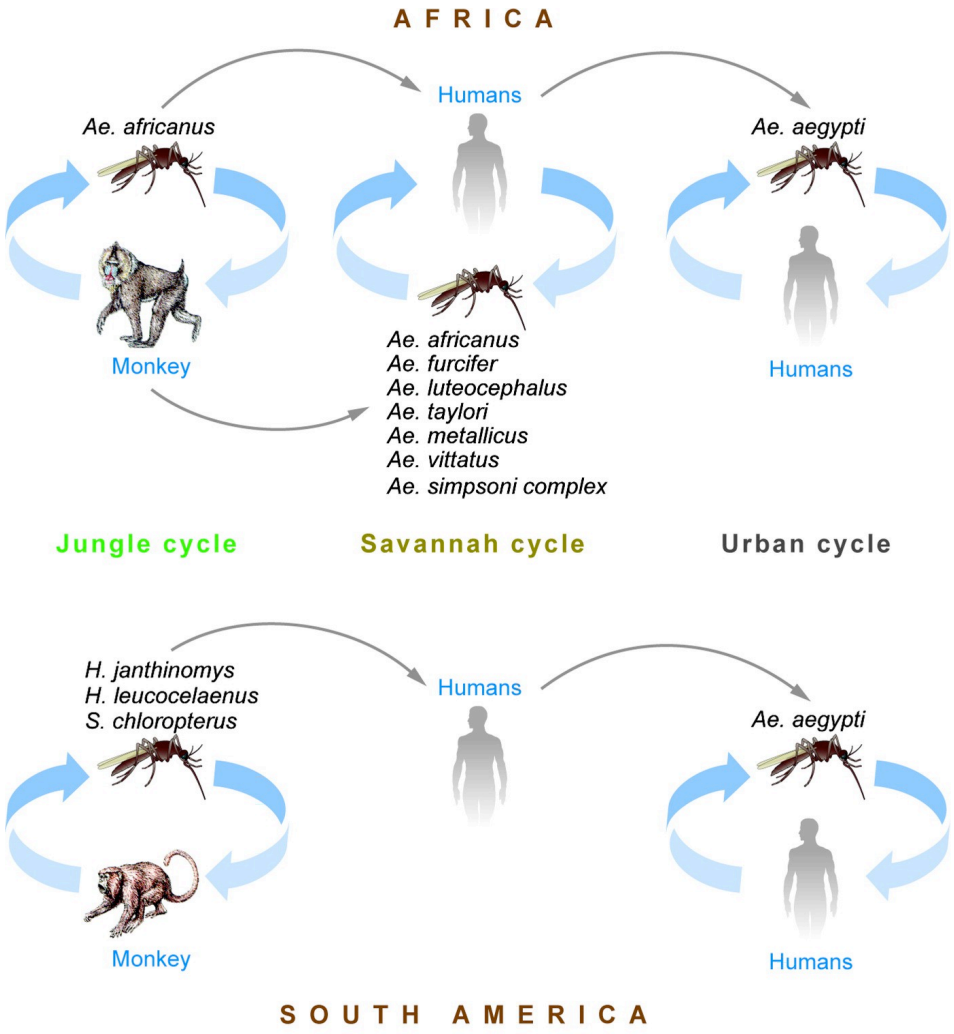
As características mais marcantes são exantema, febre alta, dor retro ocular, meningoencefalite, meningite asséptica e aquelas decorrentes da vasculopatia, como as hemorragias de mucosa (olhos, gengiva, narinas e sistema gastrointestinal). Dentre as características menos específicos, mas comuns, estão: cefaleia, mialgia, artralgia, conjuntivite, fotofobia, diarreia, náusea, vomito, anorexia, cólica abdominal e icterícia. Exames laboratoriais de sangue podem indicar elevação de enzimas hepáticas, leucopenia e trombocitopenia. Órgãos como rim, fígado, baço e cérebro podem ser gravemente acometidos. As taxas de letalidade podem ser bem variáveis, a depender da espécie viral e da região geográfica; são inferiores a 10% para a maioria das espécies; e ocorre com maior frequência em crianças e idosos, e em regiões mais pobres do planeta (GOULD; SOLOMON, 2008).

Em linhas gerais, os flavivírus do grupo da encefalite japonesa (JEV) são transmitidos principalmente por *Culex* spp., um gênero de mosquito ornitofílico, e acometem o sistema nervoso central (SNC). Os flavivírus relacionados ao YFV são transmitidos principalmente por *Aedes* spp., um gênero de mosquito primatofílico e antropofílico, e acometem os vasos (vasculopatia). Os flavivírus transmitidos por carrapatos, tipicamente *Ixodes* spp., causam neuropatias e vasculopatias (GAUNT et al., 2001).

2.1.1.1.1 Rocio

O vírus Rocio (ROCV) foi o agente etiológico da primeira epidemia de encefalite por flavivírus na América do Sul, ocorrida no Brasil na década de 1970. O auge da epidemia se deu entre 1975 e 1977 no Vale do Ribeira e Baixada Santista, sudeste do

Figura 8 – Ciclo de transmissão do vírus da Febre Amarela. O YFV é enzoótico na América e na África, infectando, de modo habitual, primatas não-humanos. Na África, tanto o ciclo silvestre como o ciclo urbano têm como vetor mosquitos do gênero *Aedes*. Já na América do Sul, o ciclo silvestre se dá principalmente por mosquitos *Haemagogus* spp., enquanto que o ciclo urbano por *Aedes aegypti*. Reproduzido de Barrett e Higgs (2007).



Barrett ADT, Higgs S. 2007.
Annu. Rev. Entomol. 52:209–29

estado de São Paulo. Durante a epidemia, o saldo de mortes passou de 1.000, com uma letalidade de cerca de 10% e uma taxa de sequelados de 20% dentre os sobreviventes. Os principais sintomas observados nos pacientes foram cefaleia, febre, vômito e náusea, fraqueza, anorexia, distensão abdominal, hiperplasia da orofaringe e da conjuntiva. Os sinais predominantes de meningoencefalite incluíam irritação da meninge, alterações de consciência, distúrbios de reflexo, disfunção motora, dislalia e convulsões (IVERSSON; COIMBRA, 1984). Análises retrospectivas sugerem que a epidemia teria se iniciado em 1973 e 1974 (IVERSSON, 1980).

O vírus pôde ser isolado pela primeira vez em 1975 a partir de amostra do sistema nervoso central de um caso humano fatal (LOPES et al., 1978). Posteriormente o vírus foi isolado de camundongos-sentinela, do sangue de uma ave da espécie *Zonotrichia capensis* (Tico-Tico) e de um pool de mosquitos da espécie *Psorophora ferox*, o que permitiu inferir sobre a participação de aves e mosquitos no ciclo biológico deste vírus (LOPES et al., 1978; LOPES et al., 1981). Todavia, a ecologia do vírus ainda é muito pouco conhecida.

A princípio conjecturou-se o desaparecimento do vírus Rocio em 1977, ao final da epidemia. Contudo, estudos sorológicos posteriores mostraram que vírus continuou a infectar humanos. Em 1992, Iversson et al. (1992) alertou para a possibilidade de o vírus Rocio ter continuado a circular entre humanos no Vale do Ribeira após o surto da década de 1970, ao encontrar anticorpos anti-ROCV numa criança de um ano de idade morta em 1980. Em 1986, Figueiredo, Rosa e Fiorillo (1986) descreveu o caso de uma mulher natural e residente de Serrana, no interior do estado de São Paulo, com anticorpos neutralizantes para ROCV. A paciente relatava nunca ter estado no litoral sul do estado e não ter tido meningoencefalite. Tavares-Neto et al. (1986), num inquérito sorológico realizado em 1984 no povoado de Corte da Pedra, município de Valença, Bahia, encontrou anticorpos neutralizantes em uma menina de 12 anos de idade, sem histórico de viagens para fora de região e sem relato de doença neurológica.

Em 1989, Iversson, Rosa e Rosa (1989) relatou a detecção de anticorpos neutralizantes tipo IgM contra ROCV em uma criança de 7 anos da área rural do município de Iguape, São Paulo. A menina não referia doença nos 3 meses anteriores à coleta de amostra de sangue, realizada em 1987. Também, em 1997, Straatmann et al. (1997) apresentou 2 estudos realizados em 1995 nos municípios de Salvador, Ipupiara e Prado, estado da Bahia onde foram relatadas 8 pessoas com anticorpos neutralizantes para ROCV, sendo 3 em Salvador, 3 em Ipupiara e 2 em Prado. Os relatos dos indivíduos estudados indicam casos autóctones e sem manifestação de meningoencefalite. As evidências sorológicas apresentadas nos trabalhos anteriores sugerem que o vírus possa estar circulando até o presente momento, em outras localidades além do litoral sul do estado de São Paulo e sem causar encefalite.

O sequenciamento completo do genoma do protótipo SPH 34675 de ROCV mostrou

tratar-se de um genoma com 10.794 nucleotídeos, com uma única ORF de 10.275 nucleotídeos, que codifica uma poliproteína de 3.425 aminoácidos. A reconstrução filogenética, utilizando sequências aminoacídicas das proteínas E e NS5, confirmou a grande proximidade entre ROCV e ILHV, conforme apontado em pesquisas anteriores (MEDEIROS et al., 2007).

2.1.1.1.2 Encefalite de Saint Louis

O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) é um flavivírus pertencente ao Complexo da Encefalite Japonesa. Foi isolado pela primeira vez em 1933 (REISEN, 2003) a partir de amostras cerebrais de pacientes durante um surto na cidade de Saint Louis no estado de Missouri nos Estados Unidos, no qual foram registrados 1095 casos clínicos (LUBY, 1979). Em 1941/42 seu ciclo biológico, envolvendo aves como reservatório e mosquitos do gênero *Culex* como vetor, foi determinado (ROCCO et al., 2005). Além de mosquitos *Culex* sp., o vírus já pôde ser isolado de roedores, aves domésticas e selvagens e marsupiais. Evidências sorológicas mostraram que sua gama de hospedeiros inclui também equinos, caprinos e bovinos (SABATTINI; AVILES; MONATH, 1998).

O SLEV é amplamente distribuído no continente americano, do Canadá à Argentina, e pode causar desde infecções assintomáticas a encefalites graves (MONATH; TSAI, 1987). Os sintomas clássicos da infecção por SLEV incluem febre, cefaleia, náusea e vômito, e desordens do sistema nervoso central, como alterações do estado de consciência e tremores. As fatalidades são mais comuns entre idosos (QUICK; THOMPSON; BOND, 1965). Na América do Norte este vírus causou vários surtos de encefalite nas ultimas décadas enquanto que na América do Sul os registros de tal evento são pouco comuns (DIAZ et al., 2006; MONDINI et al., 2007b; MONDINI et al., 2007a; MAIA et al., 2014).

O primeiro surto de encefalite humana relatado por SLEV na América do Sul ocorreu em 2005 na província de Córdoba na Argentina, com 47 casos confirmados laboratorialmente e 9 casos fatais. O vírus foi isolado de 2 lotes de mosquitos do gênero *Culex* obtidos na residência urbana de uma pessoa diagnosticada com SLEV. Nesse local havia também galinhas e gansos domésticos com anticorpos neutralizantes. O sequenciamento do gene E do isolado viral mostrou tratar-se do genótipo III de SLEV, o mesmo que foi obtido em 1979 a partir de mosquitos *Culex* sp., na província de Santa Fé, Argentina (DIAZ et al., 2006).

No Brasil, SLEV foi isolado pela primeira vez em 1960 de um lote de mosquitos *Sabethes belisarioi* (CAUSEY; SHOPE; THEILER, 1964). Apesar de evidências sorológicas indicarem que este vírus está presente na Amazônia, nunca foi relatado causando surtos ou casos de encefalite na região (SABATTINI; AVILES; MONATH, 1998). O vírus foi isolado de seres humanos no Brasil em apenas 3 ocasiões: em 1971 e 1978 na região amazônica e em 2004 no estado de São Paulo. Nos três casos não houve comprometimento do sistema

nervoso central, mas sintomas semelhantes aos do dengue, como mialgia, artralgia, febre, cefaleia e náusea e vômito (ROCCO et al., 2005). Entre 1967 e 1969 oito cepas de SLEV foram isoladas de roedores, aves e camundongos-sentinela, em 3 localidades do estado de São Paulo. Embora cerca de 5% da população local apresentasse anticorpos neutralizantes, casos de infecção humana não foram relatados (LOPES et al., 1979).

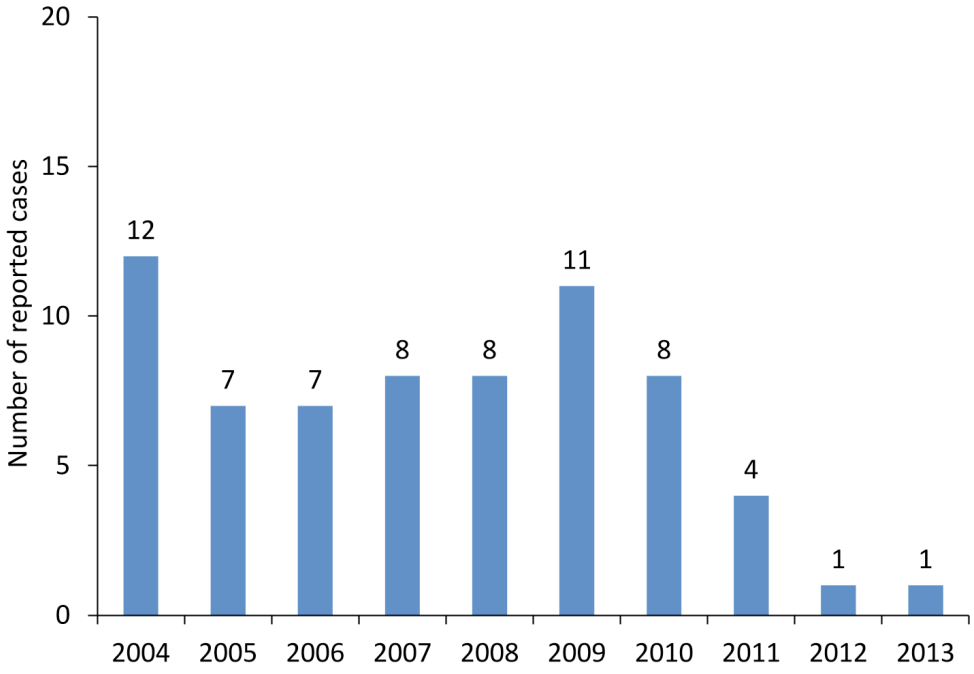
Durante o primeiro semestre de 2006, 6 casos de infecção humana por SLEV foram diagnosticadas por PCR na cidade de São José do Rio Preto, no noroeste do estado de São Paulo. Os casos ocorreram concomitantemente a uma epidemia de dengue-3 e, por apresentarem sintomas semelhantes, foram inicialmente diagnosticados como sendo dengue. Desses 6 pacientes, 2 apresentaram manifestações hemorrágicas, 2 apresentaram meningoencefalite e 1 apresentou manifestações hemorrágicas e meningoencefalite. O sequenciamento parcial do gene NS5 viral mostrou identidade de 96% com um isolado argentino de SLEV (MONDINI et al., 2007b). Posteriormente, num estudo retrospectivo, um sétimo paciente foi diagnosticado com uma rara co-infecção por DENV-3 e SLEV. Este paciente também apresentou manifestação hemorrágica leve mas se recuperou completamente (MONDINI et al., 2007a).

Embora a distribuição geográfica do vírus se estenda do Canadá à Argentina, casos de infecção humana se restringem quase exclusivamente aos EUA. Em áreas temperadas do país, as infecções ocorrem basicamente entre o final do verão e o começo do outono. Nos estados do sul, onde as temperaturas são mais elevadas, os casos se distribuem ao longo de todo o ano. A maioria dos casos acontecem em estados do leste e do centro do país, onde surtos epidêmicos esporádicos afetam regiões urbanas desde a década de 1930. Em regiões rurais, a doença ocorre com características endêmicas. A maior epidemia por SLEV com acometimento neurológico ocorreu em 1975, predominantemente em estados da bacia do rio Mississippi-Ohio na região central do país, quando quase 2.000 casos foram relatados. Entre 2004 e 2013, ocorreram em média 7 casos por ano da forma neuroinvasiva da doença, o qual apresentou uma tendência de redução gradual (Figura 9) (Center for Disease Control and Prevention (EUA) - Saint Louis Encephalitis - Epidemiology and Geographic Distribution - <https://www.cdc.gov>).

2.1.1.1.3 Oeste do Nilo

Em 1937, no distrito de West Nile, ao norte de Uganda, África, uma mulher de aproximadamente 37 anos procurou o serviço de saúde local apresentando sintomas febris. Nesta época, investigações epidemiológicas buscavam isolar o vírus da febre amarela, endêmica na região. Coletou-se o sangue periférico desta mulher e inoculou-se em cérebro de camundongos o que permitiu isolar um novo vírus, que foi denominado Vírus do Oeste do Nilo (WNV) (SMITHBURN et al., 1940). Estudos filogenéticos com WNV estimam que

Figura 9 – Número de casos da forma neuroinvasiva da infecção por SLEV nos EUA entre 2004 e 2013. Reproduzido de *ArboNET, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, EUA* (<https://www.cdc.gov/sle/technical/ epi.html>).



este flavivírus possa ter estado presente no velho mundo a cerca de 1.000 anos (GALLI; BERNINI; ZEHENDER, 2004).

A associação entre a infecção por WNV e quadros meningoencefálicos foi feita em 1957, durante epidemia em Israel (SPIGLAND et al., 1958). Estima-se que apenas 20 a 40% da pessoas infectadas por WNV desenvolvam doença, a qual ocorre após um período de incubação de 7 a 14 dias. Menos de 1% dos pacientes desenvolvem quadro neurológico, que podem apresentar-se como encefalite, meningite ou mielite. Há relatos da infecção por WNV levando a acometimentos menos usuais, tais como: miocardite, hepatite, miosite, corioretinite, pancreatite, orquite, uveíte, vitrite e rabdomiólise (KLEE et al., 2004; HAYES et al., 2005; HAYES; GUBLER, 2006; SEJVAR; LINDSEY; CAMPBELL, 2011).

O WNV é amplamente distribuído na África, Europa, Austrália, e Ásia. Em 1999, WNV foi isolado pela primeira vez no hemisfério ocidental, na cidade de Nova Iorque (EUA), causando doença em seres humanos e uma epizootia em aves, que dizimou populações de corvos (LANCIOTTI et al., 1999). Desde então, WNV tem se espalhado rapidamente pelas Américas, mais especificamente nos Estados Unidos, Canadá, México e Caribe. Atualmente, infecções por WNV já foram detectadas em aves e equinos na Colômbia, Venezuela e Argentina (BERROCAL et al., 2006; BOSCH et al., 2007; KRAMER; STYER; EBEL, 2008).

Pouco se conhece sobre a ocorrência de WNV em outros vertebrados, além de

aves, equinos e humanos. Contudo, há relatos da detecção, ao menos de anticorpos, em diversos tipos de animais, como: roedores, macacos, porcos, gatos, cães, cabras, ovelhas, bois, coelhos, esquilos, morcegos e crocodilos. Sendo assim, uma ampla diversidade de hospedeiros vertebrados pode estar contribuindo para a manutenção do vírus na natureza (DIAZ et al., 2008; BOSCH et al., 2007; KLENK et al., 2004; LANCIOTTI et al., 2000; LANCIOTTI et al., 1999; KRAMER; STYER; EBEL, 2008; BERROCAL et al., 2006).

Nos Estados Unidos, onde ocorre a maior parte dos registros de doença por WNV, de 1999 a 2010, ocorreram cerca de 1,8 milhões de casos, com aproximadamente 360.000 casos de doença febril aguda, 12.852 casos de doença neuroinvasiva (encefalite, meningite e paralisia aguda flácida) e 1.308 óbitos (KILPATRICK, 2011). Estudos realizados na década de 2000 apontaram uma soroprevalência alta para WNV em alguns estados dos EUA, como o Nebraska, com 9,5%. Nestes locais, apenas 0,4% apresentaram doença neuroinvasiva, indicando a ocorrência infecção assintomática, oligossintomática ou apenas febril aguda, com características inespecíficas. Um estudo realizado na província de Alberta, no Canadá, mostrou uma soroprevalência de 0,3% (SCHWEITZER et al., 2006).

Na América Latina e Caribe, até o presente momento, não existem provas de doença humana causada por WNV. Todavia, em animais, como equinos e aves, anticorpos neutralizantes, e até mesmo o próprio vírus, já foram encontrados algumas vezes. Em 2007, estudos sorológicos em pássaros e cavalos de 33 localizações diferentes da Venezuela, detectaram anticorpos em 14 dos 576 pássaros analisados, e 141 dos 791 cavalos analisados. Todos as amostras positivas foram confirmadas pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT) (BOSCH et al., 2007). Em 2006, na Argentina, o vírus foi isolado pela primeira vez na América do Sul. Isso foi realizado a partir do cérebro de 3 cavalos, de diferentes fazendas, mortos em decorrência de encefalite (MORALES et al., 2006). Ainda na Argentina, 1.845 aves foram testadas, na mesma época, quanto a presença de anticorpos contra flavivírus. Destas, 474 (25,6%) foram positivas, e 43 se mostraram neutralizantes para WNV (DIAZ et al., 2008).

No Brasil, não havia registros da presença de WNV até 2006 (FIGUEIREDO, 2007). A partir de 2011, sua ocorrência começou a ser mapeada por alguns estudos. Anticorpos contra WNV foram detectados em equinos das regiões sudeste, centro-oeste e nordeste do país, além de aves da região do Pantanal. Todavia, o vírus em si nunca chegou a ser encontrado, nem mesmo o seu genoma, tanto em humanos, como em outros animais (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2013; SILVA et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014).

2.1.1.1.4 A proteína do envelope dos flavivírus

A glicoproteína do envelope (E) é um heterodímero, isto é, é composta por 2 proteínas idênticas, unidas por forças de interação intermolecular. Sua estrutura quaternária,

revelada por técnica de cristalografia e difração de raio-x, indica a existência de 3 domínios, denominados I, II e III. Esses domínios exercem importante função de interação com receptores de membrana da célula hospedeira (CHÁVEZ et al., 2010).

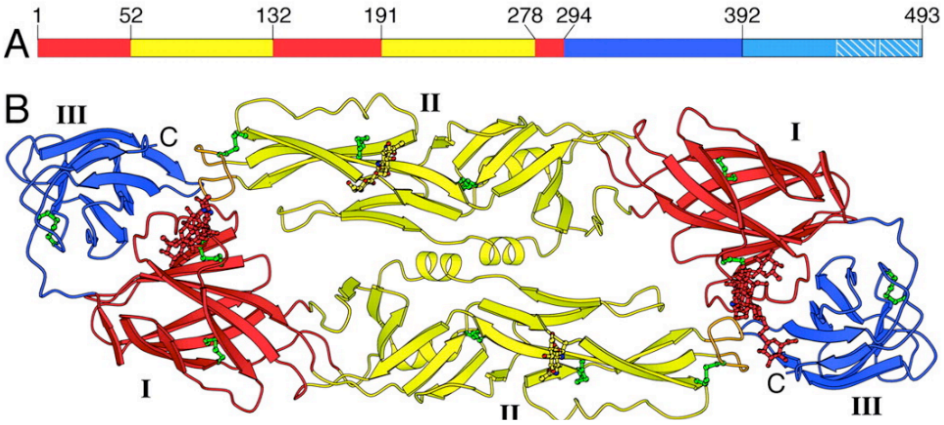
O domínio I (DI) constitui a porção central da proteína, no qual são encontrados sítios de N-glicosilação flanqueados pelo domínio de dimerização (domínio II), onde encontra-se o peptídeo de fusão, na porção terminal. O domínio II (DII) promove a dimerização de E, sendo um domínio de sustentação. Ainda especula-se que DII ancora na membrana celular durante a fusão viral dependente de pH. Na outra extremidade de DI localizam-se os domínios III (DIII), as porções de E mais expostas na partícula viral. O DIII possui aproximadamente 100 aminoácidos, os quais formam estruturas beta-pregueadas, semelhantes a moléculas de imunoglobulinas (Figura 10). Ainda, DIII contém sítios de ligação a receptores celulares e é altamente imunogênico, pois é formado por epítopos lineares que são alvos de anticorpos neutralizantes e células citotóxicas (REY et al., 1995; MODIS et al., 2003; MODIS et al., 2005).

Durante a infecção por Flavivirus, grande parte dos anticorpos gerados são dirigidos ao DIII, embora as proteínas prM, M e NS1 sejam, também, capazes de induzir resposta humoral. Todos os Flavivírus compartilham sítios antigênicos semelhantes na proteína E, cujos epítopos são tradicionalmente utilizados para classificar os flavivírus em complexos antigênicos (DOWD; PIERSON, 2011).

O DIII é o principal sítio imunogênico da proteína E, sendo capaz de induzir anticorpos neutralizantes. Por suas características, DIII tem sido utilizado como candidato vacinal para diversos flavivírus. Estudos *in vitro* demonstraram que DIII pode inibir a ligação aos receptores celulares, uma vez que compete para a ligação da partícula viral, impedindo sua entrada (CHU, 2005; CHU; CHIANG; NG, 2007). Em WNV, DENV e JEV, já foi demonstrado que esse peptídeo é capaz de induzir uma resposta imunológica do tipo Th1 e anticorpos neutralizantes (ALKA et al., 2007; SHUKLA et al., 2009). Estudos realizados com DIII de WNV se mostraram promissores por apresentarem efeitos protetores frente ao desafio viral (SCHNEEWEISS et al., 2011).

Devido à extensa reatividade cruzada observada em infecções por flavivírus, o diagnóstico pode ser incerto. Para minimizar este problema, antígenos mais específicos, como os oriundos do DIII de E, passaram a ser utilizados para diagnostico de flaviviroses (SANTOS et al., 2004; SHUKLA et al., 2009). Técnicas imunoenzimáticas, como o ELISA, utilizando o DIII de flavivírus, tem permitido diferenciar respostas contra vírus de diferentes sorocomplexos. Inclusive, existem no mercado alguns kits de diagnóstico por ELISA utilizando DIII produzidos em bactérias (SANTOS et al., 2004; SHUKLA et al., 2009; LENG et al., 2009).

Figura 10 – Estrutura da molécula da glicoproteína E de um virion maduro de DEN. A proteína E é um homodímero, composto por 2 proteínas idênticas, que contêm 3 domínios: I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). (A) Regiões correspondentes aos 3 domínios na estrutura linear da proteína. (B) Estrutura tridimensional do homodímero, indicando os 3 domínios e o posicionamento das 2 proteínas na estrutura quaternária. Adaptado de Modis et al. (2005).



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Por ELISA indireto (IgG), pesquisar a ocorrência de infecções por flavivírus (WNV, SLEV e ROCV), em pequenos roedores silvestres capturados em áreas de Cerrado e agroecossistemas (cana-de-açúcar e capim braquiária) no nordeste do estado de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

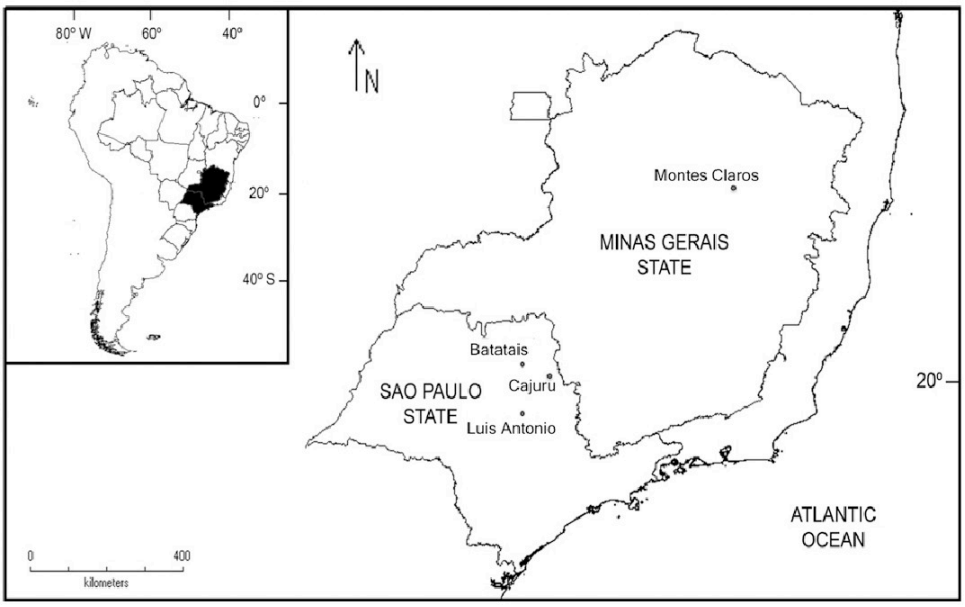
- Capturar pequenos roedores silvestres em áreas de mata nativa e em áreas de monoculturas de cana-de-açúcar e capim braquiária, nas cidades de Ribeirão Preto, Luis Antônio, Cajuru e Batatais.
- Coletar amostras de sangue dos animais capturados e montar um banco de amostras congeladas em ultrafreezer no laboratório.
- Testar, por ELISA, as amostras de sangue estocadas quanto a presença de anticorpos IgG contra os flavivírus ROCV, SLEV e WNV.
- Extrair o RNA das amostras positivas no ELISA e realizar RT-PCR utilizando *primers* gênero-específicos e espécie-específicos para *Flavivirus*.
- Realizar o sequenciamento nucleotídico de *amplicons* eventualmente obtidos pela RT-PCR para *Flavivirus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e metodologia de captura

Os pequenos mamíferos foram capturados no nordeste do Estado de São Paulo, na região de Ribeirão Preto, em 8 campanhas de captura no campo, ocorridas entre fevereiro de 2012 e julho de 2015. Quatro ocorreram na estação seca (abril a setembro) e quatro no período chuvoso (outubro a março), com atuação em cinco habitats distintos (Figura 11). Os sítios de captura escolhidos representam os principais tipos de vegetação e uso do solo na região.

Figura 11 – Sítios de captura. Os pequenos roedores silvestres foram capturados em sítios localizados em 4 cidades da região de Ribeirão Preto, no nordeste do estado de São Paulo. Foram elas: Ribeirão Preto, Cajuru, Luis Antônio e Batatais.



4.1.1 Luis Antônio

Localizada no município de Luis Antônio, a Estação Ecológica de Jataí (EEJ) localiza-se a uma altitude de 600 m, abrangendo cerca de 9000 ha (Figura 12). Trata-se da maior área protegida no estado, possuindo vegetação contínua de Cerrado, além de pequenos enclaves de mata semidecídua. O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, é altamente ameaçado pela invasão humana apesar de ser considerado um dos 25 biomas a serem conservados no mundo. A Estação é mantida e administrada pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Circundada por áreas destinadas à agropecuária, em especial a cana-de-açúcar, é um reduto da vida selvagem que apresenta grande e valiosa biodiversidade de flora e fauna. Sendo resguardada pela Polícia Militar Ambiental contra a caça, a pesca, o extrativismo vegetal e qualquer outra atividade antrópica predatória, é muito frequentemente utilizada para aulas práticas na educação básica e superior, incluindo a educação ambiental. É também muito utilizada como objeto de pesquisa em diversas áreas do conhecimento (Figura 13).

Figura 12 – Município de Luis Antônio. A Estação Ecológica de Jataí (EEJ) é uma das maiores áreas de proteção ambiental do estado de São Paulo, ocupando uma porção significativa do município de Luiz Antônio, no interior do estado. Os círculos indicados em vermelho, no lado esquerdo da figura, indicam os pontos de captura. Os círculos a direita indicam a sede da administração da Estação e a base dos pesquisadores. Imagem de satélite obtida a partir do *software* Google earth (Google, EUA), registrada em 2013. Escala e norte geográfico indicados na imagem.

Figura 13 – Sítios de captura na EEJ. As 2 regiões escolhidas para os armadilhamentos (círculos vermelhos) ficam no interior da EEJ, na região oeste, próximas ao rio Mogi-Guaçu. O ponto mais ao norte possui características fitofisionômicas de Cerradão, enquanto que o ponto mais ao sul apresenta características de mata semi-decídua. Imagem de satélite obtida a partir do *software* Google earth (Google, EUA), registrada em 2013. Escala e norte geográfico indicados na imagem.

4.1.2 Cajuru

O município de Cajuru fica a uma altitude de 775 m. Neste sítio a maior parte da vegetação original (Cerrado) foi convertida em cultivares mono-específicos de capim braquiária e cana-de-açúcar. O local escolhido foi uma área de cultivo de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). Esta gramínea, originária da África, é amplamente distribuída em toda a América tropical e utilizada para alimentar o gado (Figura 14).

Figura 14 – Município de Cajuru. A principal atividade econômica do município é a agropecuária. Boa parte de sua área é ocupada por plantações de cana- de-açúcar, capim-braquiária e pastagens. Os remanescentes de mata nativa encontram-se fragmentados no interior das propriedades rurais, formando mosaicos verdes. Os pequenos fragmentos de Cerrado abrigam as poucas espécies vegetais e animais sobreviventes. Os armadilhamentos ocorreram a oeste do centro da cidade, na Fazenda João Banana (círculos vermelhos). Imagem de satélite obtida a partir do *software* Google earth (Google, EUA), registrada em 2013. Escala e norte geográfico indicados na imagem.

4.1.3 Batatais

O município de Batatais fica a uma altitude de 860 m. Assim como Cajuru, tem sua economia fortemente dependente das atividades agropecuárias, e daquelas ligadas a elas. Assim como em toda região de Ribeirão Preto, a cultura predominante é a cana-de- açúcar. O Cerrado é encontrado às margens dos corpos de água e em fragmentos dispersos pela fazendas da região (Figura 15). De maneira geral, esses remanescentes de mata nativa são protegidos por legislação federal ou estadual de proteção ao meio ambiente. As capturas foram realizadas na Fazenda Cervo, em 2 pontos: em meio ao canavial, e em um fragmento de mata nativa secundária (Figura 16).

Figura 15 – Município de Batatais. As imagens aéreas da região de Batatais, assim como das demais cidades deste estudo, evidencia um mosaico composto por diversos e pequenos fragmentos de Cerrado dispersos entre áreas utilizadas para fins agropecuários. Os armadilhamentos ocorreram ao norte da cidade (círculos vermelhos). Imagem de satélite obtida a partir do *software* Google earth (Google, EUA), registrada em 2013. Escala e norte geográfico indicados na imagem.

Figura 16 – Sítios de captura em Batatais. As capturas foram realizadas na Fazenda Cervo, uma propriedade rural dedicada ao plantio da cana-de-açúcar. Um sítio de captura foi estabelecido no canavial e o outro em um fragmento de Cerrado (círculos vermelhos). Imagem de satélite obtida a partir do *software* Google earth (Google, EUA), registrada em 2013. Escala e norte geográfico indicados na imagem.

4.1.4 Ribeirão Preto

Campus da Universidade de São Paulo (USP), município de Ribeirão Preto, situado a uma altitude de 546,8 m. Os locais de captura na USP foram mata ciliar, Cerrado e área cultivada com capim braquiária.

4.2 Amostragem

Para a amostragem, armamos armadilhas em uma grade permanente e em um transecto espaçado, a 1000m da grade, onde fizemos capturas por 6 noites consecutivas, totalizando um esforço amostral de 600 armadilhas noite (esforço amostral = número de noites x número de armadilhas por noite). Grade e transecto foram compostas por 100 armadilhas (Sherman e Tomahawk 'R' = unidade amostral) dispostas no solo e quando possível, em árvores, para capturar animais de hábito arborícola. Na grade, as armadilhas foram distribuídas em dez colunas e 10 linhas espaçadas 10 m, com duas linhas de armadilhas do tipo Tomahawk, e as outras do tipo Sherman. No transecto, armamos 100 armadilhas tipo Sherman ou Tomahawk intercaladas a 10 m de distância. As iscas adicionadas às armadilhas continham uma mistura de paçoca de amendoim, banana, essência de baunilha, sardinha e aveia em flocos. Mamíferos capturados eram recolhidos das armadilhas e cuidadosamente tratados de acordo com as leis de proteção da vida selvagem

e dos regulamentos previamente aprovados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Ministério do Meio Ambiente), sob a licença n° 19838-1.

Os animais foram identificados segundo caracteres morfológicos externos. Quando necessário, a identificação das espécies foi realizada utilizando métodos moleculares (com base num fragmento de gene do citocromo-b) e seguindo protocolos previamente padronizados (SALAZAR-BRAVO et al., 2013). Os animais foram sexados pela morfologia da genitália (masculino: presença de pênis; feminino: presença de vagina) e as suas idades foram inferi- das com base na massa corporal e em caracteres sexuais secundários (presença de testículos no escroto, para machos; e membrana da vagina perfurada, para fêmeas), o que permitiu diferenciá-los em 3 classes (juvenis, subadultos e adultos). Animais capturados nas grades foram marcados com brinco de orelha, para evitar pseudoreplicação e liberados no local da captura.

4.3 Determinação das caractéristicas ecológicas

Determinou-se o índice de diversidade que considera número de espécies e a uniformidade com que os indivíduos estão distribuídos (Simpson, 1949). Trata-se de uma relação entre número de espécies e número de indíviduos (SPELLERBERG e FEDOR, 2003). Para analisarmos a diversidade de espécies em cada habitat (cerrado, capim braquiária, cana-de-açúcar, mata ciliar e semidecídua), utilizamos o índice de Shannon-Wiener (H) (SHANNON, 1948).

4.4 Flavivírus utilizados

Foram utilizadas neste estudo 8 espécies de flavivírus, sendo uma cepa de cada espécie. Elas foram utilizadas como controle positivo nas RT-PCRs ou na produção de anticorpos utilizado no ELISA, seja como controle positivo (ROCV, SLEV e WNV), seja como controle negativo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Tabela 1).

Tabela 1 – Cepas virais utilizadas no estudo.

Vírus	Cepa
Rocio (ROCV)	SPH 34675
Encefalite de Saint Louis (SLEV)	BeH-355964
Febre Amarela (YFV)	BeAn 131
Dengue 1 (DENV-1)	Mochizucki
Dengue 2 (DENV-2)	New Guinea C
Dengue 3 (DENV-3)	H-87
Dengue 4 (DENV-4)	H-241
Oeste do Nilo (WNV)	NY99

4.5 Produção dos estoques virais

4.5.1 Em cérebro de camundongo recém-nascido

Camundongos da linhagem Balb/c recém nascidos e adultos, fornecidos pelo Biotério Central da FMRP-USP, serão utilizados para isolamento viral e produção de estoques virais. Para tanto, ninhadas de camundongos recém-nascidos foram inoculadas, pela via intra- cerebral, com 25 ul de cada um dos vírus previamente diluídos em soro fisiológico. Os animais, mantidos em gaiolas plásticas, acompanhados das mães para aleitamento foram observados diariamente, por até 10 dias.

Os animais que apresentaram sinais de encefalite, portanto contendo altos teores de vírus no tecido nervoso, foram sacrificados e armazenados em freezer -70 ^{o}C até o momento de uso. Para os testes, os cérebros dos animais foram retirados por sucção com seringa estéril, em ambiente estéril, macerados e para cada cérebro extraído 900 ul de uma soro fisiológico estéril. Os macerados foram aliquotados e armazenados em freezer -70 ^{o}C.

4.5.2 Em cultura celular

Para a produção dos estoques virais, os vírus produzidos em cérebro de camundongo foram propagados em células C6/36, (provenientes linhagem continua de larvas de mosquito *Aedes albopictus*) (IGARASHI, 1978). Para tanto, estas foram mantidas em frascos de 25 cm^2 (Corning, USA) em meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Invitrogen, USA) acrescido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell), 1% de L- Glutamina a 200 Mm (Invitrogen, EUA), 10% de Fosfato de Triptose (Nutricell) e 1% de antibióticos, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 1 mg/ml (Invitrogen, EUA). Estas células foram mantidas em estufa a 28 ^{o}C até o momento do uso.

Após a confluência do tapete celular, estes foram lavados duas vezes com PBS 1x e inoculados 150 ul da suspensão viral. Em seguida, os foram agitados, a cada 15 min e após 1 h foi retirado o inóculo e realizado a reposição do meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) suplementados com 2% de SFB. Como controles, foram utilizadas células não infectadas em todos os experimentos, além do monitoramento diário das culturas infectadas. Após um período de 7 a 10 dias ou quando houve efeito citopático, em cerca de 80% da monocamada celular, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados, e armazenados em freezer -70 ^{o}C.

Ainda, as monocamadas celulares foram recolhidas e submetidas ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizando fluido ascítico imune de camundongo para confirmação da infecção. A confirmação da presença do genoma viral e caracterização da espécie foram feitas por RT-PCR. Confirmada a positividade nos testes, os sobrenadantes foram acrescidos de 20% de SFB e estocados a -70 ^{o}C até sua utilização.

4.6 Preparo de fluidos ascíticos imunes (MIAFs) em camundongos

Para a obtenção dos MIAFs específicos de cada flavivírus, camundongos jovens (*Mus musculus* – linhagem Balb/C) foram inoculados pela via intraperitoneal, semanalmente, durante quatro semanas consecutivas, com 150 ul da suspensão viral produzida em cérebro de camundongo diluída em soro fisiológico acrescido do mesmo volume de adjuvante completo de Freund na primeira imunização e adjuvante incompleto de Freund nas imunizações consecutivas. Em seguida à última imunização, foram injetadas, pela via intraperitoneal, células de sarcoma murino 180/TG. Os camundongos foram observados diariamente até o desenvolvimento de ascite, rica em anticorpos. O animal foi sacrificado e o liquido ascítico foi coletado por punção intraperitoneal, centrifugado para a obtenção do sobrenadante, o qual foi aliquotado e armazenado a –20 ^{o}C. Estes preparados foram utilizados como controles nas reações de ELISA e imunofluorescência indireta.

4.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

Para confirmação da infecção viral nas culturas celulares foi utilizado a reação de IFA. Para tanto, células infectadas e não infectadas (controle-negativo) foram removidas do frasco de cultura e adicionadas a de lâminas de microscopia para imunofluorescência, que foram secas a 37 ^{o}C e fixadas em acetona gelada, por 15 min. Em seguida, foi adicionado aos spots 10ul do MIAF específico para o vírus infectante, na diluição 1/50, em PBS 1x. As lâminas foram incubadas por 1 h , a 37 ^{o}C, em câmara úmida e lavadas com solução tampão PBS 1x (pH7,2), por 10min. A seguir, foi adicionado aos spots o conjugado, constituído de imunoglobulina caprina anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Sigma, USA), na diluição 1:100, em solução de azul de Evans diluído a 1:20.000 em PBS 1x. As lâminas foram incubadas por 1 hora, em câmara úmida e lavadas em seguida com

PBS 1x, por 10 min. Após secagem, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada e visualizadas ao microscópio de fluorescência (Leitz, Alemanha).

4.8 Titulação viral por formação de foco

Para determinar o título viral, foi realizado ensaio de placa utilizando a técnica de Dulbecco et. al., 1952, com algumas modificações. Para tanto, culturas de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (VERO) foram utilizadas neste ensaio. Os frascos contendo a monocamada confluente de células Vero, foram desprezados, o meio e os frascos foram lavados duas vezes com PBS 1x para a retirada de debris celulares e resquícios dos meios de cultura para efetiva ação da tripsina. Em seguida foi adicionado 1ml de solução Tripsina EDTA 0,0025% (Invitrogen), para que ocorra o descolamento da monocamada celular. As células posteriormente foram ressuspendidas em 50 ml de meio MEM e homogeneizadas. Em seguida, foram distribuídos 2 ml da suspenção celular em cada poço da placa de 12 poços e, incubadas a 37 ^{o}C por 16 horas, para que se formasse a monocamada celular.

Os estoques virais foram descongelados lentamente em gelo e diluições seriadas foram preparadas distribuindo-se 450ul de PBS 1X em 6 tubos e adicionando–se 50ul da suspensão viral no primeiro tubo e transferindo sucessivamente 50ul para o segundo tubo, até a diluição final de 10^{11}. O meio de cultura das placas de 12 poços foi descartado, os poços foram lavados com PBS 1X duas vezes e adicionado 450ul da diluição viral em cada poço, e como controle negativo foi usado PBS 1x. A placa foi então incubada por 1 hora em estufa sendo que a cada 15 minutos a placa foi levemente agitada para melhor adsorção viral.

Após o termino do período de adsorção, o inóculo foi removido e foram adicionados 2 ml de uma camada viscosa (overlay) composta pelo meio utilizado para cultura celular acrescentando-se 3% de carboximetilcelulose estéril (Sigma, USA), e então a placa foi incubada em estufa contendo CO2 a 37 ^{o}C. Os ensaios foram observados. Ao termino do período de infecção, para visualização das placas, a camada viscosa foi removida e os poços lavados com PBS 1x, e em seguida fixados com PBS-Formol à 10% por quatro horas e corados com violeta gensiana (Sigma, USA) para a visualização das placas de lise. O cálculo foi realizado com base na maior diluição dos títulos virais, onde se formou placas visíveis, e tendo em conta a diluição e o volume total do inóculo. Os valores estão expressos em unidades formadoras de placas (PFU/ml).

4.9 Produção dos peptídeos recombinantes

A produção dos peptídeos recombinantes oriundos do domínio III (rDIII) da proteína E de ROCV, SLEV e WNV, se deu conforme descrito a seguir.

As bactérias transformadas, contendo o plasmídeo PQE31 (ROCV e WNV) e PQE32 (SLEV), foram cultivados em placa de meio sólido Luria-Bertani (Sigma, USA) contendo os antibióticos de seleção Ampicilina (100 ug/ml) e Kanamicina (50 ug/ml) e permitido o crescimento por 24 horas. Após este período, colônias isoladas foram selecionadas e feito o sub-cultivo em 5 ml caldo LB, contendo os mesmos antibióticos acima citados e permitido o crescimento por 12 h a 37 ^{o}C sob agitação constante de 12.000 rpm. No dia seguinte 3 ml do sub-cultivo foram transferidos para 500 ml de caldo LB acrescido dos mesmos antibióticos e incubados sob agitação constante de 12.000 rpm a 37 ^{o}C.

A cada hora, uma fração foi coletada e mensurada a absorbância, até atingir a densidade óptica de 0,6 nm. Ao atingir tal densidade, foram adicionados 2 M de IPTG (Life Technologies, EUA) e permitido o crescimento por 4 h. Ao final deste período, foram coletadas amostras de cada frasco, para confirmar a expressão dos peptídeos recombinantes através de eletroforese SDS-PAGE seguido de coloração por azul de Comassie e as culturas crescidas expressando os peptídeos foram congeladas em freezer −20 ^{o}C para a seguinte etapa de purificação.

4.10 Extração e purificação dos peptídeos recombinantes

Depois de confirmada a expressão dos polipeptídeos recombinantes estes foram submetidos à extração e purificação em condições desnaturantes. Para tanto, as frações obtidas, incluindo o controle não induzido, foram descongeladas em água gelada e centrifugadas a 3.300 g, por 30 min, a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 1 ml da solução tampão de lise (50 mM NaH2PO, 4.300 mM NaCl, 1 mM imidazol pH 8,0) e o inibidor de protease Complete (Roche, Alemanha). Após a dissolução total do precipitado, esta suspensão foi sonicada por seis vezes a 200 W utilizando o equipamento Sonicator-Dismembrator (Fischer-Scientific, EUA) e realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições descritas. O sobrenadante obtido, contendo a fração solúvel da extração proteica, foi separado do precipitado e acondicionado a -70 ^{o}C. O precipitado, contendo a fração proteica insolúvel, foi dissolvido em 1 ml da solução tampão de lise contendo ureia (100mM NaH2PO4, 10mM Tris-Cl, 8M ureia, pH 8,0), acrescido de inibidor de protease e em seguida, foi acondicionado a -70 ^{o}C.

Após a extração, os polipeptídeos foram submetidos a purificação. A estratégia de purificação utilizada levou em consideração a cauda de histidina presentes nos sistemas de expressão PQE 31 e PQE 32 e também nos peptídeos recombinantes. Para tanto, o extrato

foi descongelado e incubado com 500 ul/ml de resina Niquel- Agarose (Ni-NTA, Qiagen, USA) e incubados em gelo por 90 min sob agitação constante. Ao fim deste período, a mistura foi transferida para colunas de polipropileno (Qiagen, EUA) para realização da purificação. Na etapa de purificação, a mistura transferida para a coluna foi incubada por 15 min a temperatura ambiente para formação da fase sólida.

Em seguida, a primeira passagem pela coluna de purificação foi determinada de "flow through", sendo esta coletada e armazenada para posterior analise por eletroforese em SDS-PAGE e em seguida foram realizadas sucessivas lavagens nas seguintes condições sendo: 6 lavagens com 10 ml cada com tampão de lavagem (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM, Tris-Cl, 8 M ureia) pH 6,3, seguido de 4 lavagens com 5 ml cada com o mesmo tampão acima citado no pH 5,9 e por fim, a coluna contendo a resina foi lavada 4 vezes com 1 ml do tampão de lavagem no pH 4,5 e uma lavagem com 1 ml com tampão de lavagem no pH 2,0 e ao final foram obtidos 5 frações no qual os peptídeos recombinantes foram eluídos. Todas as frações foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE, seguida de coloração por nitrato de prata.

4.11 Dosagem dos polipeptídeos recombinantes

Após a obtenção dos purificados foi realizada a dosagem de proteínas com o RC-DC Protein assay kit I (Bio-Rad-USA) pelo método de Lowry (1951), conforme recomendações do fabricante. Após a preparação da curva padrão de albumina bovina (BSA) a partir de 1,5 mg/ml, 5 uL das proteínas foram adicionadas em placas de poliestireno de 96 cavidades. Em seguida foram adicionados 25 ul de reagente "A" e posteriormente 200 ul de reagente "B". Após 15 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteína foi determinada com base na curva padrão de BSA.

4.12 ELISA para os flavivírus Rocio, Saint Louis e Oeste do Nilo

Os peptídeos recombinantes oriundos do domínio III da proteína E (rDIII) de ROCV, SLEV e WNV foram utilizados como antígeno nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para diagnóstico sorológico das 3 flaviviroses. Para o ELISA, microplacas de poliestireno de fundo chato (Costar/Corning, EUA) foram sensibilizadas com diferentes concentrações de cada um dos rDIII (8 ug a 20 ug/ml) e incubadas a 4 ^{o}C por 24 a 48 h. Como controle negativo foram utilizados lizado de *Escherichia coli* contendo plasmídeo sem inserto, extraídos e purificados sobre as mesmas condições anteriormente citadas (Figura 17). Em seguida, as placas foram lavadas com PBS tween-20 a 0,1% (PBS-T) e adicionou-se a solução de bloqueio e incubou-se a 37 ^{o}C em câmara úmida por uma hora. Ao fim do período de bloqueio, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e foram adicionados 100 ul do soro em teste, na diluição 1:100.

Figura 17 – *Layout* da placa de ELISA padrão. De acordo com esse padrão, é possível testar até 20 amostras, em duplicata, por vez. A metade superior da placa é sensibilizada com o peptídeo recombinante, enquanto que a porção inferior é sensibilizada com extrato de *E. coli* (branco). O branco tem a finalidade de definir o nível basal OD, a ser subtraída da OD da amostra em teste. Além disso, serve para verificar se a ligação do anticorpo à placa não seria devida a antígenos bacterianos.

A Placa

- **Layout Padrão**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	13	14	15	16	17	18	19	20	+	Hist	-	B (+)
D	13	14	15	16	17	18	19	20	+	Hist	-	B (+)
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	13	14	15	16	17	18	19	20	+	Hist	-	B (H)
H	13	14	15	16	17	18	19	20	+	Hist	-	B (H)

Peptídeo

Extrato de *E. coli*

- **Conteúdo**
  - Capacidade máxima: 20 amostras (com duplicata).
  - Controle positivo (+): MIAF específico.
  - Controle de histidina (Hist): anticorpo primário monoclonal anti-histidina, conjugado com HRP (peroxidase).
  - Controle negativo (-): MIAF contra vírus de outro gênero ou família.
  - Branco (+): well sem peptídeo e com MIAF (controle positivo).
  - Branco (H): well sem peptídeo e com anticorpo anti-histidina (Hist).

A placa foi incubada por 1 h, nas mesmas condições anteriormente citadas e novamente, lavadas por 3 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 50 ul de imunoglobulina caprina anti-IgG murino conjugada à peroxidase (Sigma, EUA), diluída a 1:2000. Após incubação em câmara úmida, por 1 h, a 37 ^{o}C, as placas foram lavadas por 6 vezes com PBS-T e foram adicionados aos poços 100 ul do substrato cromogênio Tetrametilbenzidina (TMB) (KPL, EUA). As placas foram incubadas por 5 min, à temperatura ambiente, quando reação foi adicionado solução de parada (H_2SO_4 4M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Multiskan, EUA), com filtro de 450 nm e referência de 650 nm (TMB). Com base na densidade ótica obtida por espectrofotometria, o ponto de corte (cut-off) foi calculado pela média dos controles negativos das amostras clínicas mais três vezes o desvio padrão.

Como controle positivo, foram utilizados MIAFs de SLEV, ROCV e WNV, como controle negativo foi utilizado MIAF de DENV-2 e para assegurar que a reação enzimática foi bem sucedida e eliminar a possibilidade de ligações inespecíficas foi utilizado como controle da placa, anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (6x-HIS) (Sigma, EUA).

4.13 Detecção genômica viral

4.13.1 Extração de RNA

As amostras de sangue dos animais silvestres, das culturas de célula e de cérebro de camundongo, foram testados por RT-PCR. Para tanto, extraíram-se os RNAs destes materiais utilizando o kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os extratos de RNA foram eluídos em 60 uL de água estéril tratada com dietilpirocarbonato (água-DEPC).

4.13.2 Primers para *flavivirus*

Foram utilizados primers gênero-específicos ou espécie-específicos, para os principais flavivírus brasileiros, na RT-PCR convencional. Estes primers, preconizados por Bronzoni et al. (2005), anelam-se a regiões conservadas de NS5 e são apresentados na Tabela 2. Os primers FG1 (senso) e FG2 (anti-senso) são gênero-específicos, enquanto que os demais são espécie-específicos (anti-senso) e são utilizados juntamente com FG1.

Tabela 2 – Primers gênero-específicos e espécie-específicos utilizados na RT-PCR convencional para os principais flavivírus brasileiros.

Primer F	Primer R	Sequência (5′ -> 3′)	Amplicon (pb)
FG1		TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	
	FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	958
	nBSQ	AAGTGACACCTGTTCAGGGTA	388
	nDEN1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472
	nDEN2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCCA	316
	nDEN3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659
	nDEN4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222
	nILH	TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA	474
	nROC	TCACTCTTCAGCCTTTCG	230
	nSLE	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	232
	nYF	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253

4.13.3 Transcrição reversa (RT)

Para a transcrição reversa (RT) e síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit SuperScript III first-strand cDNA (Invitrogen, EUA). Para tanto, foi preparado "mix" contendo, 4 ul de tampão 5x, 1,4 ul de ditiotreitol (DTT), 1 ul (40 U) de inibidor de RNAse (Invitrogen, EUA), 2,0 ul de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) (Invitrogen, EUA) 1 ul de random primer a 10 pmol, 2,1 ul de H2O DEPC (Life Technologies, EUA) e 1 ul da enzima de RT SuperScript III first-strand cDNA. A mistura foi incubada a 50 C, por 90 min, para a síntese do cDNA e em seguida a enzima de RT foi inativada a 70 C, em um termociclador MyCycler (BioRad, França). Os cDNAs foram armazenados em freezer -70 °C até o momento do uso na PCR.

4.13.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

A PCR foi realizada com a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Life Technologies, EUA), preparando-se a seguinte mistura de reação: 2,5 uL da solução tampão 10x; 2 uL de MgCl (25 mM); 4 uL de dNTP (10 uM cada); 0,5 uL do primer FG1 (15 uM); 0,5 uM de primer FG2 (15 uM); 0,2 uL de enzima (5 u/uL); 5 uL do cDNA obtido com a RT e água DEPC (Life Technologies, EUA) para um volume de 25 uL. A mistura foi submetida a 94 °C por 2 min e a 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min em um termociclador MyCycler (BioRad, França).

4.13.5 Multiplex-nested-PCR e nested-PCR para flavivírus

A multiplex-nested-PCR (M-N-PCR) e a nested-PCR (N-PCR) foram realizadas a partir do produto da RT-PCR convencional. Na M-N-PCR, todos os primers espécie-específicos de flavivírus, listados na Tabela 2, foram utilizados juntos na mesma reação, enquanto que na N-PCR apenas um primer espécie-específico foi utilizado por vez. Para o teste, preparou-se a seguinte mistura de reação: 2,5 uL da solução tampão 10 vezes concentrada; 2 uL de MgCl (25 mM); 4 uL de dNTP (10 uM cada); 0,5 uL do primer FG1 (15 uM); 0,5 uL do(s) primer(s) anti-senso (15 uM); 0,2 uL de enzima (5 u/uL); 5 uL de cDNA; e água DEPC (Life Technologies, EUA) para um volume de 25 uL. A mistura foi submetida a 94 °C por 2 min e a 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min, em um termociclador MyCycler (BioRad, França).

4.13.6 Eletroforese

Os resultados das PCRs foram evidenciados da seguinte forma: 10 uL do produto da reação foram misturados a 3 uL da solução tampão de corrida (Fermentas, Canadá) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, na solução tampão TAE (Tris 40 mM;

ácido acético 20 mM; e EDTA 1 mM). O gel foi corado em GelRed (Biotium, EUA), por 20 min e visualizado sob luz UV.

5 RESULTADOS

5.1 Capturas

Foram capturados 154 espécimes de pequenos roedores, sendo estes pertencentes à 5 espécies: *Akodon montensis*, *Calomys tener*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes* e *Rattus rattus* (Tabela 3). Amostras de sangue de todos esses indivíduos foram submetidas separadamente ao teste sorológico ELISA (indireto) para a detecção de anticorpos do tipo IgG para cada um dos 3 flavivírus contemplados nesta pesquisa (ROCV, SLEV e WNV). Todavia, as amostras de 31 indivíduos apresentaram resultados inconclusivos ou duvidosos, e foram desconsideradas. Apenas as amostras de 123 animais foram consideradas nas análises subsequentes.

Em Batatais, foram capturados 39 animais, sendo 9 (23%) *Akodon montensis*, 1 (3%) *Calomys tener*, 15 (38%) *Necromys lasiurus*, 12 (31%) *Oligoryzomys nigripes* e 2 (5%) *Rattus rattus* (Tabela 3).

Em Cajuru, foram capturados 38 animais, sendo 14 (37%) *Akodon montensis*, 2 (5%) *Calomys tener*, 12 (32%) *Necromys lasiurus*, 9 (24%) *Oligoryzomys nigripes* e 1 (3%) *Rattus rattus* (Tabela 3).

Em Luiz Antônio, foram capturados 46 animais, sendo 34 (74%) *Akodon montensis*, 7 (15%) *Calomys tener*, 4 (9%) *Necromys lasiurus* e 1 (2%) *Oligoryzomys nigripes*. Em Ribeirão Preto nenhum animal foi capturado (Tabela 3).

Akodon montensis foi a espécie mais comumente capturada, com 57 animais (46%). Em segundo lugar foi *Necromys lasiurus*, com 31 indivíduos (25%). Em seguida aparece *Oligoryzomys nigripes* com 22 indivíduos (18%). Em quarto aparece *Calomys tener* com 10 animais (8%). *Rattus rattus* teve apenas 3 representantes (2%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de indivíduos capturados por espécie de roedor e por cidade.

	Batatais		Cajuru		Luiz Antônio		Ribeirão Preto		TOTAL	
	n	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%
Akodon montensis	*9*	23	*14*	37	*34*	74	*0*	0	*57*	46
Calomys tener	*1*	3	*2*	5	*7*	15	*0*	0	*10*	8
Necromys lasiurus	*15*	38	*12*	32	*4*	9	*0*	0	*31*	25
Oligoryzomys nigripes	*12*	31	*9*	24	*1*	2	*0*	0	*22*	18
Rattus rattus	*2*	5	*1*	3	*0*	0	*0*	0	*3*	2
TOTAL	***39***	**100**	***38***	**100**	***46***	**100**	***0***	**0**	***123***	**100**

5.2 Sorologia

Foram testadas amostras de plasma de 123 animais, sendo 95 (77%) delas positivas. Os resultados positivos podem ser divididos em 3 grandes grupos:

Monorreativas ou Monotípicas são aquelas amostras que foram reativas com apenas 1 dentre os 3 antígenos testados (ROCV (**R**), SLEV (**S**) ou WNV (**W**));

Birreativas ou Bitípicas são aquelas amostras que reagiram positivamente com 2 dos antígenos testados: (**R+S**), (**R+W**), (**S+W**);

Trirreativas ou Tritípicas são aquelas que reagiram positivamente frente aos 3 antígenos (**R+S+W**).

5.2.1 Análises por espécie de roedor

Akodon montensis teve 57 animais testados, sendo 53 deles positivos (93%), a maior positividade entre as 5 espécies encontradas. 46 % foram monorreativos, com destaque ao SLEV (19%). 44% apresentaram resultados birreativos, com destaque para ROCV e SLEV (19%). 4% das amostras reagiram contra todos os antígenos (Tabela 4).

Calomys tener teve 10 animais testados, a segunda espécie menos representada, com apenas 5% de positividade. 2 animais apresentaram resultados birreativos para SLEV e WNV, e 3 animais foram trirreativos (Tabela 4).

Necromys lasiurus teve 31 animais testados, sendo 25 deles positivos (81%). 35% das amostras foram monorreativas, com destaque para SLEV (19%). 32% tiveram resultados birreativos, sendo SLEV e WNV o mais frequente (%16). Os trirreativos representaram 13% das amostras (Tabela 4).

Oligoryzomys nigripes teve 22 animais testados, sendo 55% deles positivos. Os animais com resultados monorreativos foram 19%, especialmente contra WNV (14%). Os resultados birreativos foram 32%, principalmente para ROCV e WNV (18%). 5% foram reativos para os 3 vírus (Tabela 4).

Rattus rattus esteve representado por apenas 3 animais, sendo todos negativos para os flavivírus (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados dos testes sorológicos para ROCV (R), SLEV (S) e WNV (W). Os resultados estão discriminados de acordo com a tipo de reatividade (mono-, di- ou tri-) das amostras. As totalidades relativas (100%) correspondem à somatória das colunas (relatividade por espécie de roedor).

	R		**S**		**W**		**R+S**		**R+W**		**S+W**		**R+S+W**		**Negativo**		**TOTAL**	
	n	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%		%	***n***	%	***n***	%
A. montensis	*8*	14	*11*	19	*7*	12	*11*	19	*5*	9	*9*	16	*2*	4	*4*	7	*57*	100
C. tener	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*2*	20	*3*	30	*5*	50	*10*	100
N. lasiurus	*2*	6	*6*	19	*3*	10	*3*	10	*2*	6	*5*	16	*4*	13	*6*	19	*31*	100
O. nigripes	*1*	5	*0*	0	*3*	14	*1*	5	*4*	18	*2*	9	*1*	5	*10*	45	*22*	100
R. rattus	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*3*	100	*3*	100
TOTAL	***11***	**9**	***17***	**14**	***13***	**11**	***15***	**12**	***11***	**9**	***18***	**15**	***10***	**8**	***28***	**23**	***123***	**100**

5.2.2 Análises por tipo de reatividade

Dos 123 animais testados, 11 (9%) foram positivos monotipicamente para **ROCV**. 73% deles eram *Akodon montensis*, 18% eram *Necromys lasiurus* e 9% *Oligoryzomys nigripes* (Tabela 5).

Para **SLEV** exclusivamente, 17 (14%) animais foram positivos. Destes, 65% eram *Akodon montensis* e 35% eram *Necromys lasiurus* (Tabela 5).

Para **WNV** exclusivamente, 13 (11%) indivíduos foram positivos. A maior parte deles (54%) eram de *Akodon montensis*. *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes* apresentaram 23% de positividade, cada um (Tabela 5).

Dentre os resultados bitípicos, **ROCV** e **SLEV** tiveram 15 (12%) indivíduos. *Akodon montensis* representou 73% desses positivos, enquanto que *Necromys lasiurus* teve 20% e *Oligoryzomys nigripes* apenas 7% (Tabela 5).

O grupo **ROCV** e **WNV** teve 11 (9 %) dos animais. *Akodon montensis* corres-pondeu a 45% da positividade, *Necromys lasiurus* a 18 % e *Oligoryzomys nigripes* 36% (Tabela 5).

O grupo **SLEV** e **WNV** teve 18 (15%) dos animais. *Akodon montensis* corres- pondeu a 50% dos casos positivos, *Calomys tener* a 11% e *Necromys lasiurus* a 28% e *Oligoryzomys nigripes* a 11% (Tabela 5).

10 (8%) animais apresentaram reatividade para os 3 vírus (**ROCV, SLEV e WNV**). Com exceção de *Rattus rattus*, todas as demais espécies tiveram resultados tritípicos. *Akodon montensis* teve 20% dos casos, *Calomys tener* teve 30% dos casos, *Necromys lasiurus* 40% e *Oligoryzomys nigripes* teve 10% (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados dos testes sorológicos para ROCV (R), SLEV (S) e WNV (W). Os resultados estão discriminados de acordo com a tipo de reatividade (mono-, di- ou tri-) das amostras. As totalidades relativas (100%) correspondem à somatória das linhas (relatividade por tipo de reatividade).

	R		**S**		**W**		**R+S**		**R+W**		**S+W**		**R+S+W**		**Negativo**		**TOTAL**	
	n	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%	***n***	%		%	***n***	%	***n***	%
A. montensis	*8*	73	*11*	65	*7*	54	*11*	73	*5*	45	*9*	50	*2*	20	*4*	14	*57*	46
C. tener	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*2*	11	*3*	30	*5*	18	*10*	8
N. lasiurus	*2*	18	*6*	35	*3*	23	*3*	20	*2*	18	*5*	28	*4*	40	*6*	21	*31*	25
O. nigripes	*1*	9	*0*	0	*3*	23	*1*	7	*4*	36	*2*	11	*1*	10	*10*	36	*22*	18
R. rattus	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*0*	0	*3*	11	*3*	2
TOTAL	***11***	**100**	***17***	**100**	***13***	**100**	***15***	**100**	***11***	**100**	***18***	**100**	***10***	**100**	***28***	**100**	***123***	**100**

5.3 Detecção genômica

As 95 amostras positivas pelo teste sorológico, para ao menos um flavivírus, foram submetidas à RT-PCR para verificar a possibilidade de encontrar material genômico viral. Tanto a PCR utilizando primers gênero-específico como a *nested*-PCR, utilizando primers espécie-específico, apresentaram resultados negativos, indicando ausência de genoma de flavivírus detectável, ao menos pela técnica utilizada.

6 DISCUSSÃO

Os arbovírus do gênero *Flavivirus* são amplamente distribuídos no continente americano devido a ampla gama de espécies de artrópodes hematófagos presentes, condições ambientais favoráveis à reprodução e à dispersão geográfica dos vetores, e altas densidades populacionais (humanas e vetoriais). Acometem centenas de milhares de pessoas anualmente no país, levando, muitas delas à morte. O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades em flavivírus do planeta. Apesar da grande importância para a saúde pública nacional, pouco se sabe a respeito desses agentes patogênicos. Estudos prévios revelaram que espécies de arbovírus estão circulando no país de modo velado em áreas urbanas, rurais e florestais (FIGUEIREDO, 2007).

Embora se saiba que os flavivírus podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo artrópodes (culicídeos e carrapatos) e vertebrados (anfíbios, repteis, aves e mamíferos diversos) (BARRETT e HIGGS, 2007), muito pouco se sabe sobre sua capacidade de infectar roedores selvagens e, desse modo, sobre um eventual ciclo silvestre de manutenção viral (DIAZ et al., 2006; ROCCO et al., 2005).

Neste estudo, foram capturados, tiveram amostras de sangue coletadas e foram analisadas, 123 espécimes de pequenos roedores pertencentes à 5 espécies: *Akodon montensis* (*n*=57), *Calomys tener* (*n*=10), *Necromys lasiurus* (*n*=31), *Oligoryzomys nigripes* (*n*=22) e *Rattus rattus* (*n*=3). As capturas foram realizadas entre os anos de 2012 e 2015, nas cidades de Batatais, Cajuru, Luiz Antônio e Ribeirão Preto, na região nordeste do estado de São Paulo.

Embora a espécie *Rattus rattus* seja tipicamente urbana, periurbana e doméstica, foi capturada nos mesmos locais que as espécies verdadeiramente silváticas e, por isso, foi incluída neste estudo. Com exceção da EEJ (Luiz Antônio), os demais sítios de captura estão localizados em zonas fortemente antropisadas, o que explicaria sua presença.

As amostras de sangue desses animais foram submetidas à teste sorológico (ELISA indireto) para a detecção de anticorpos (IgG) contra 3 flavivírus do Complexo da Encefalite Japonesa (ROCV, SLEV e WNV). 95 dos animais apresentaram resultado reativo (positivo) contra ao menos um dos flavivírus testados, revelando uma taxa de positividade de 77%. Os resultados positivos foram distribuídos em 3 grandes grupos: monotípicos (reativos contra os antígenos de apenas 1 dos 3 vírus), bitípico (reativos contra os antígenos de 2 dos 3 vírus, em qualquer uma das 3 combinações possíveis) ou tritípicos (reativos contra os antígenos dos 3 vírus). Dentre os resultados positivos, 34% foram monotípicos, 36% foram bitípicas e 8% foram tritípicas.

Akodon montensis foi a espécie que apresentou a maior positividade (93%), seguida

por *Necromys lasiurus* (81%), *Oligoryzomys nigripes* (55%), *Calomys tener* (5%) e *Rattus rattus* (0%). Esse resultado indica que podem ocorrer grandes diferenças de soroprevalencia entre as espécies de roedores. Existem diversas possibilidades de explicação para esse achado, sendo algumas delas as seguintes: (i) existem graus diversos de susceptibilidade ao vírus entre esses animais; (ii) diferentes graus de competência vetorial para com diferentes espécies de hospedeiros; (iii) diferentes graus de atratibilidade entre vetores e hospedeiros de diferentes espécies; (iv) respostas imunológicas com características diferentes; (v) durabilidade diversificada da memória imunológica.

Calomys tener apresentou apenas resultados positivos politípicos, enquanto as demais espécies apresentaram tanto resultados politípicos como monotípicos.

A distribuição de positividade das espécies para cada tipo de reatividade segue o mesmo padrão da distribuição das positividades gerais por espécie (*Akodon montensis* é o maior, seguido por *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*). A única exceção ocorre com as reações tritípicas, na qual a predominância é de *Necromys lasiurus*.

Devido à extensa reatividade cruzada observada em infecções por flavivírus, o diagnóstico pode ser incerto. Para minimizar este problema, antígenos mais específicos, como os oriundos do DIII da proteína E, passaram a ser utilizados para diagnostico de flaviviroses. Técnicas imunoenzimáticas, como o ELISA, utilizando o DIII de flavivírus, tem permitido diferenciar respostas contra vírus de diferentes sorocomplexos. Inclusive, existem no mercado alguns kits de diagnóstico por ELISA utilizando DIII produzidos em bactérias (SANTOS et al., 2004; SHUKLA et al., 2009; LENG et al., 2009), assim como o realizado neste estudo.

Mesmo utilizando apenas o peptídeo recombinante do DIII da proteína E, é possível que ocorram reações cruzadas entre flavivírus antigenicamente muito próximos e semelhantes. Contudo, esse fenômeno ocorre de modo muito restrito, e não generalizado entre os membros do gênero ((CHÁVEZ et al., 2010; CHÁVEZ et al., 2013; SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2014)). Nossa pesquisa reforça a tese de que o reatividade cruzada é limitada com a metodologia aqui empregada. Isso é evidenciado pela existência de amostras monoreativas, isto é, que possuem anticorpos que se ligam somente a um dos antígenos e não aos demais. Mostramos que isso não apenas é possível, como pode inclusive ocorrer em altas frequências.

Uma hipótese alternativa à reatividade cruzada de anticorpos na polireatividade, é a possibilidade do animal ter sido infectado por mais de um flavivírus ao longo de sua vida, já que existem dezenas desses vírus presentes na América do Sul, e que os anticorpos IgG podem ser produzidos e mantidos circulantes no corpo por longos períodos de tempo (BARRETT; HIGGS, 2007).

7 CONCLUSÃO

A presença de anticorpos contra os 3 flavivírus do Complexo da Encefalite Japonesa, testados neste estudo, sustentam a hipótese de que esses vírus podem infectar pequenos roedores selvagens, ubíquos no Brasil. Esses vírus podem estar sendo mantidos na natureza através de ciclos silváticos envolvendo roedores, além das aves residentes e migratórias.

REFERÊNCIAS*

ALKA et al. Immunogenicity and protective efficacy of the E. coli-expressed domain III of Japanese encephalitis virus envelope protein in mice. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 196, n. 4, p. 227–231, aug 2007. ISSN 0300-8584. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-007-0043-4http://link.springer.com/10.1007/s00430-007-0043-4>. Citado na página 30.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annual Review of Entomology*, Annual Reviews, v. 52, n. 1, p. 209–229, jan 2007. ISSN 0066-4170. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454http://annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>. Citado 4 vezes nas páginas 16, 24, 57 e 58.

BERROCAL, L. et al. West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. *Revista de Salud Pública*, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, v. 8, n. 2, p. 218–228, jul 2006. ISSN 0124-0064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642006000200010>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

BOSCH, I. et al. West Nile Virus, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, v. 13, n. 4, p. 651–653, apr 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725982/http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/4/06-1383{_}article.> Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

BRONZONI, R. V. d. M. et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 696–702, feb 2005. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/43/2/696.abstract>. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 47.

CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E.; THEILER, M. Isolation of St. Louis Encephalitis Virus from Arthropods in Pará, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 13, n. 3, p. 449, may 1964. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/13/3/449.short>. Citado na página 26.

CHÁVEZ, J. H. et al. Production and diagnostic application of recombinant domain III of West Nile envelope protein in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Scielo, Uberaba, v. 46, n. 1, p. 97–99, jan 2013. ISSN 0037-8682. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-868214142013>. Citado na página 58.

CHÁVEZ, J. H. et al. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*, v. 38, n. 6, p. 613–618, nov 2010. ISSN 10451056. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105610001405http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105610001405>. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 58.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHU, J. H. J.; CHIANG, C. C. S.; NG, M. L. Immunization of Flavivirus West Nile Recombinant Envelope Domain III Protein Induced Specific Immune Response and Protection against West Nile Virus Infection. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 5, p. 2699–2705, mar 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/178/5/2699.abstracthttp://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.5.2699>. Citado na página 30.

CHU, J. J. H. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *Journal of General Virology*, v. 86, n. 2, p. 405–412, feb 2005. ISSN 0022-1317. Disponível em: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80411-0>. Citado na página 30.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, dec 2006. ISSN 0022-538X. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/80/23/11418.shorthttp://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01257-06>. Citado na página 18.

DIAZ, L. et al. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 11, p. 1752–1754, 2006. ISSN 10806040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/11/06-0486http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/11/06-0486{_}article.> Citado 3 vezes nas páginas 16, 26 e 57.

DIAZ, L. A. et al. West Nile Virus in Birds, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 4, p. 689–691, apr 2008. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/4/07-1257http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/4/07-1257{_}article.> Citado na página 29.

DOWD, K. A.; PIERSON, T. C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view. *Virology*, v. 411, n. 2, p. 306–315, mar 2011. ISSN 00426822. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210007749http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682210007749>. Citado na página 30.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n. 2, p. 224–9, apr 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0037-86822007000200016{&}nrm=isohttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0037-86822007000200016{&}lng=en{&}nrm=iso{&}tlng=enhttp://www.ncbi.nlm>. Citado 3 vezes nas páginas 16, 29 e 57.

FIGUEIREDO, L. T. M.; ROSA, A. P. A. T. da; FIORILLO, A. M. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). *Revista de Saúde Pública*, v. 20, n. 3, p. 204–211, jun 1986. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/23351http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0034-89101986000300003{&}lng=pt{&}nrm>. Citado na página 25.

FRIEDEN, T. R.; SCHUCHAT, A.; PETERSEN, L. R. Zika Virus 6 Months Later. *Journal of the American Medical Association*, v. 316, n. 14, p. 1443, oct 2016. ISSN 0098-7484. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.11941http:

//jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.11941>. Citado na página 23.

GALLI, M.; BERNINI, F.; ZEHENDER, G. Alexander the Great and West Nile Virus Encephalitis. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 7, p. 1328–1333, jul 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/7/04-0039{_}article.htmhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33233>. Citado na página 28.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*, v. 82, n. 8, p. 1867–1876, aug 2001. ISSN 0022-1317. Disponível em: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-8-1867>. Citado na página 23.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*, Elsevier, v. 371, n. 9611, p. 500–509, feb 2008. ISSN 01406736. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60238-Xhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360860238X>. Citado na página 23.

GOULD, E. A. et al. Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. In: RESEARCH, B. T. A. i. V. (Ed.). Academic Press, 2001. v. 57, p. 71–103. ISBN 0065-3527. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352701570013http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352701570013>. Citado na página 21.

HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. West Nile Virus: Epidemiology and Clinical Features of an Emerging Epidemic in the United States. *Annual Review of Medicine*, v. 57, n. 1, p. 181–194, feb 2006. ISSN 0066-4219. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.57.121304.131418>. Citado na página 28.

HAYES, E. B. et al. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 8, p. 1174–1179, aug 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/8/05-0289bhttp://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/8/05-0289b{_}article.> Citado na página 28.

IVERSSON, L. B. Aspects of the encephalitis epidemic caused by arbovirus in the Ribeira Valley, S. Paulo, Brazil, during 1975-1978. *Revista de Saúde Pública*, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, v. 14, n. 1, p. 9–35, mar 1980. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0034-89101980000100002{&}lng=pt{&}nrm=iso{&}tlng=pthttp://dx.doi.org/10.1590/S0034-89>. Citado na página 25.

IVERSSON, L. B.; COIMBRA, T. L. M. Encephalitis in the Ribeira Valley (S. Paulo, Brazil) in the post-epidemic period of 1978-1983: a discussion on aspects of etiological diagnosis and epidemiological characteristics. *Revista de Saúde Pública*, v. 18, n. 4, p. 323–332, aug 1984. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0034-89101984000400007{&}lng=pt{&}nrm=iso{&}tlng=pthttp://dx.doi.org/10.1590/S0034-89>. Citado na página 25.

IVERSSON, L. B. et al. Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of Rocio encephalitis. *Ciência e Cultura*, v. 44,

n. 2/3, p. 164–166, 1992. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis{&}src=google{&}base=LILACS{&}lang=p{&}nextAction=lnk{&}exprSearch=188342>. Citado na página 25.

IVERSSON, L. B.; ROSA, A. P. A. T. da; ROSA, M. D. B. Recent occurence of human infection by Rocio arbovirus in Ribeira Valley, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Instituto de Medicina Tropical, v. 31, n. 1, p. 28–31, feb 1989. ISSN 0036-4665. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0036-46651989000100006{&}lng=en{&}nrm=iso{&}tlng=enhttp://dx.doi.org/10.1590/S0036-46>. Citado na página 25.

KILPATRICK, A. M. Globalization, Land Use, and the Invasion of West Nile Virus. *Science*, v. 334, n. 6054, p. 323–327, oct 2011. ISSN 0036-8075. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/334/6054/323.abstracthttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1201010>. Citado na página 29.

Family – Flaviviridae. In: KING, A. M. et al. (Ed.). *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 9. ed. San Diego: Elsevier, 2012. cap. Flaviridae, p. 1003–1020. ISBN 978-0-12-384684-6. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000860>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 20.

KLEE, A. L. et al. Long-Term Prognosis for Clinical West Nile Virus Infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 8, p. 1405–1411, aug 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/8/03-0879http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/8/03-0879{_}article.> Citado na página 28.

KLENK, K. et al. Alligators as West Nile Virus Amplifiers. *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, v. 10, n. 12, p. 2150–2155, dec 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323409/http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/12/04-0264{_}article.> Citado na página 29.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. *Annual Review of Entomology*, v. 53, n. 1, p. 61–81, jan 2008. ISSN 0066-4170. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n. 11, p. 4066–71, nov 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/38/11/4066.abstracthttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060069http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC87542>. Citado na página 29.

LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, v. 286, n. 5448, p. 2333 – 2337, dec 1999. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/286/5448/2333.abstract>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

LENG, C.-H. et al. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 2, p. 288–295, feb 2009. ISSN 12864579. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/

article/pii/S1286457908003444http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.12.004http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457908003444>. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 58.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Fields Virology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wikins, 2007. cap. 34, p. 1102–1112. ISBN 9780781760607. Citado na página 19.

LOPES, O. d. S. et al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio Virus. *American Journal of Epidemiology*, v. 107, n. 5, p. 444–449, may 1978. ISSN 0002-9262. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/107/5/444/58569/EMERGENCE-OF-A-NEW-ARBOVIRUS-DISEASE-IN-BRAZILI>. Citado na página 25.

LOPES, O. d. S. et al. Isolation of St. Louis Encephalitis Virus in South Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 28, n. 3, p. 583–585, may 1979. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/28/3/583.short>. Citado na página 27.

LOPES, O. S. de et al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: III. Isolation of Rocio Virus from Psorophora ferox (Humboldt, 1819). *American Journal of Epidemiology*, v. 113, n. 2, p. 122–125, feb 1981. ISSN 0002-9262. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113075https://academic.oup.com/aje/article-abstract/113/2/122/48821/EMERGENCE-OF-A-NEW-ARBOVIRUS-DISEASE-IN-BRAZILIII>. Citado na página 25.

LUBY, J. P. St. Louis Encephalitis. *Epidemiologic Reviews*, v. 1, n. 1, p. 55–73, mar 1979. ISSN 0193-936X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036214>. Citado na página 26.

MAIA, F. G. M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, v. 26, p. 96–7, sep 2014. ISSN 1878-3511. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197121401546X>. Citado na página 26.

MEDEIROS, D. B. A. et al. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *Journal of General Virology*, v. 88, n. 8, p. 2237–2246, aug 2007. ISSN 0022-1317. Disponível em: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82883-0>. Citado na página 26.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Instituto Oswaldo Cruz, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, dec 2012. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762012000800020{&}script=sci{_}arttexthttp://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000>. Citado na página 29.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, jun 2003. ISSN

0027-8424. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/100/12/6986.abstracthttp://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0832193100>. Citado na página 30.

MODIS, Y. et al. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 79, n. 2, p. 1223–1231, jan 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/79/2/1223.abstracthttp://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.2.1223-1231.2005>. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.

MONATH, T. P.; TSAI, T. F. St. Louis Encephalitis: Lessons from the Last Decade. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 37, n. 3 Part 2, p. 40S–59S, nov 1987. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/37/3{_}Part{_}2/40S>. Citado na página 26.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *Journal of Clinical Virology*, Elsevier, v. 40, n. 1, p. 84–86, sep 2007. ISSN 13866532. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2007.06.007http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653207002144http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(07)00214-4/fulltext>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 1, p. 176–178, jan 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0905http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0905{_}article.> Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.

MORALES, M. et al. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, v. 12, n. 10, p. 1559–1561, oct 2006. ISSN 10806040. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290965/http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/10/06-0852{_}article.> Citado na página 29.

MOUREAU, G. et al. New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 10, n. 2, p. e0117849, feb 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117849http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117849>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1067http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1067>. Citado na página 23.

OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 107, n. 11, p. 723–730, nov 2013. ISSN 0035-9203. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt081https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1093/trstmh/trt081>. Citado na página 29.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Public Library of Science, v. 8, n. 2, p. e2706, feb 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002706http:

//journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002706>. Citado na página 29.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 4, p. 467–474, jun 2011. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762011000400014{&}script=sci{_}arttext{&}tlng=pthttp://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000400014http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0074-02762011000400014{&}lng=>. Citado na página 29.

QUICK, D. T.; THOMPSON, J. M.; BOND, J. O. The 1962 epidemic of St. Louis encephalitis in Florida: IV. Clinical features of cases occurring in the Tampa Bay Area1. *American Journal of Epidemiology*, v. 81, n. 3, p. 415–427, may 1965. ISSN 0002-9262. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120527>. Citado na página 26.

REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. In: RESEARCH, T. J. C.; VIRUS, T. P. M. B. T. A. in (Ed.). *The Flaviviruses: Detection, Diagnosis, and Vaccine Development*. Academic Press, 2003. v. 61, p. 139–183. ISBN 0065-3527. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352703610043http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527(03)61004-3http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703610043>. Citado na página 26.

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, v. 375, n. 6529, p. 291–298, may 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/375291a0http://www.nature.com/doifinder/10.1038/375291a0>. Citado na página 30.

RICE, C. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, v. 229, n. 4715, p. 726–733, aug 1985. ISSN 0036-8075. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/229/4715/726.abstracthttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.4023707>. Citado na página 19.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Instituto de Medicina Tropical, v. 47, n. 5, p. 281–285, oct 2005. ISSN 0036-4665. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0036-46652005000500008{&}lng=en{&}nrm>. Citado 3 vezes nas páginas 26, 27 e 57.

SABATTINI, M. S.; AVILES, G.; MONATH, T. O. Historical, Epidemiological and Ecological Aspects of Arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In: Travassos da Rosa, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; Travassos da Rosa, J. F. S. (Ed.). *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries*. Belem: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 113–134. ISBN 85-86784-01-X. Citado na página 26.

SANTOS, F. B. dos et al. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 2, p. 144–152, aug 2004. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/71/2/144.abstract>. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 58.

SCHNEEWEISS, A. et al. A DNA vaccine encoding the E protein of West Nile Virus is protective and can be boosted by recombinant domain DIII. *Vaccine*, v. 29, n. 37, p. 6352–6357, aug 2011. ISSN 0264410X. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11006827http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11006827>. Citado na página 30.

SCHWEITZER, B. K. et al. Geographic Factors Contributing to a High Seroprevalence of West Nile Virus-Specific Antibodies in Humans following an Epidemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 3, p. 314–318, mar 2006. ISSN 1556-6811. Disponível em: <http://cvi.asm.org/content/13/3/314.abstracthttp://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.13.3.314-318.2006>. Citado na página 29.

SEJVAR, J. J.; LINDSEY, N. P.; CAMPBELL, G. L. Primary Causes of Death in Reported Cases of Fatal West Nile Fever, United States, 2002–2006. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Mary Ann Liebert, Inc., publishers, v. 11, n. 2, p. 161–164, feb 2011. ISSN 1530-3667. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0086http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2009.0086>. Citado na página 28.

SHUKLA, J. et al. Cloning and expression of domain III of the envelope gene of Japanese encephalitis virus: Evaluation for early clinical diagnosis by IgM ELISA. *Journal of Virological Methods*, v. 158, n. 1-2, p. 165–170, jun 2009. ISSN 01660934. Disponível em: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093409000676http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093409000676>. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 58.

SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. 7, p. 921–923, nov 2013. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130052>. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 58.

SILVA, J. R. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Scielo, v. 47, n. 4, p. 414–417, aug 2014. ISSN 0037-8682. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0117-2014>. Citado na página 58.

SMITHBURN, K. C. et al. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-20, n. 4, p. 471–492, jul 1940. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/s1-20/4/471.short>. Citado na página 27.

SPIGLAND, I. et al. Clinical and Laboratory Observations in an Outbreak of West Nile Fever in Israel in 1957. *Harefuah*, Israel Medicine Association, v. 54, n. 11, p. 275–281, 1958. ISSN 0017-7768. Citado na página 28.

STAPLETON, J. T. et al. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *Journal of General Virology*, v. 92, n. 2, p. 233–246, feb 2011. ISSN 0022-1317. Disponível em: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.027490-0>. Citado na página 16.

STRAATMANN, A. et al. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*

Tropical, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, n. 6, p. 511–515, dec 1997. ISSN 0037-8682. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86821997000600012{&}script=sci{_}arttext{&}tlng=pthttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0037-86821997000600012{&}lng=>. Citado na página 25.

TAVARES-NETO, J. et al. Pesquisa de anticorpos para arbovírus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Instituto Oswaldo Cruz, v. 81, n. 4, p. 351–358, dec 1986. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci{_}arttext{&}pid=S0074-02761986000400001{&}lng=pt{&}nrm=iso{&}tlng=pthttp://dx.doi.org/10.1590/S0074-02>. Citado na página 25.

TOMORI, O. Yellow Fever: The Recurring Plague. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Taylor & Francis, v. 41, n. 4, p. 391–427, jan 2004. ISSN 1040-8363. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408360490497474http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408360490497474>. Citado na página 19.

VRATSKIKH, O. et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathogens*, Public Library of Science, v. 9, n. 6, p. e1003458, jun 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003458>. Citado na página 20.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 789–801, oct 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1006http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1006>. Citado na página 23.