



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA – PPGDB

Identificação de *Flavivirus* em Aves Silvestres da Amazônia Central

SAMUEL FRANCO LOPES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Diversidade Biológica
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Diversidade Biológica.

Manaus - AM

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA – PPGDB

Identificação de *Flavivirus* em Aves Silvestres da Amazônia Central

SAMUEL FRANCO LOPES

Orientadora(a): Profa. Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientadora(a): Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo

Fonte Financiadora: CAPES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Diversidade Biológica
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Diversidade Biológica.

Manaus – AM

2011

Lopes, Samuel Franco
Identificação de *Flavivirus* em Aves Silvestres da Amazônia Central / Samuel Franco
Lopes. - Manaus: UFAM, 2011.

Dissertação de Mestrado em Diversidade Biológica — Universidade Federal do
Amazonas, 2008.

Orientador (a): Prof. Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientador (a): Prof. Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo

1. Virologia 2. Aves silvestres 3. Identificação molecular

Sinopse:

Nesse estudo, foi identificada uma espécie de *Flavivirus* em amostras de sangue total de aves silvestres, capturadas *in-situ* (Alter do chão/PA) e *ex-situ* (Manaus/AM) através da reação em cadeia de polimerase conjugada a transcrição reversa (RT-PCR) seguida por multiplex nested PCR (MN-PCR) para testes de identificação espécie-específicos. Foram encontrados 7 (4,23%) *amplicons* sugestivos do vírus Ilhéus. A técnica de diagnóstico utilizada mostrou-se eficaz para a identificação do gênero *Flavivirus* em amostras de aves silvestres apresentando-se como uma alternativa adequada para a identificação de arboviroses brasileiras. A circulação enzoótica dos vírus tanto em aves de cativeiro como de vida livre reforçam o papel das aves como hospedeiro nos ciclos de transmissão destas zoonoses.

AGRADECIMENTOS

Principalmente, à Deus, minha amada família, e minha namorada, Simone, pois sem eles não teria chego até aqui.

A Dra Izeni Pires Farias, pela confiança depositada, incentivo, suporte material logístico e financeiro, pelas sugestões e orientação. Aos colegas do Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFAM (LEGAL), Mário, Waleska, Marina, Jaque, Adriano, Nicole, Maria Dóris, Júlia, Gabi, Carlinha, Olavo. E também a Dina pela ajuda com as clonagens realizadas no laboratório de Biotecnologia da UFAM.

A Dra Regina M. P. de Figueiredo, co-orientadora deste projeto, por todo apoio em toda fase laboratorial, conselhos, sugestões e grande colaboração. Aos colegas do Laboratório de Virologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Raji, João Bosco, Michelle Bastos, Carlos Jatobá, Márcia Castilho, Beth, Sanmile, Evaulino Itapirema (o Carrerinha), Valéria, Juliane, Karol, Josy, Igor, Euller, Dan, Mirian e Liane.

Ao doutor Mário L. G. Figueiredo, por toda sua ajuda e colaboração que em muito contribuíram para o avanço das análises deste projeto. Ao Dr. Cristóvão Costa, por sua contribuição durante as análises no laboratório de virologia do INPA, e toda sua equipe Dr. Janssem Medeiros, Gláucia, Toni, Patrícia, Rose, Susan, Rayna e Stephanie.

Ao Dr. Felipe Naveca e Victor Souza por toda ajuda e paciência durante as inúmeras tentativas de sequenciamentos realizadas na Fiocruz, em Manaus.

A equipe de campo de Alter do Chão: Tânia Sanaïotti, Laís, Ygo (a máquina), Zé Ribeiro, Sica, Ronaldinho Gaúcho, Luisinho e seu frigobar, Laudeco e demais frequentadores da savana amazônica.

Ao Médico Veterinário Laérzio Chiezorin, seus alunos e estagiários pela ajuda durante as coletas no Refúgio de Vida Silvestre Sauim-Castanheiras.

A todos os membros que fazem e fizeram parte da família em Manaus: Diogão, Beto, Mayra Joaquina, Mayra Insana e Mayra Freire, André (Laboratório de Georeferenciamento Acariquara) Tarcísio (organogramas) Mônica, Ju e Pri, e aos meus amigos, Geraldão, Marcelo, Curumin, Ricardo Bola Sete, Murilo e Krapulão, pelas idéias trocadas durante todo período de realização do projeto.

Agradeço muito a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na conclusão deste projeto

RESUMO

A Amazônia apresenta os maiores índices de biodiversidade do planeta, assim como o maior número de arbovírus isolados, principalmente em função da grande diversidade de espécies de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres. Entre os arbovírus, destacam-se os *Flavivírus* tanto por produzirem o maior número de infecções e doenças humanas, como pela gravidade destas doenças. Além disso, sabe-se que as aves atuam como reservatório de alguns *Flavivírus* pouco estudados como: Ilhéus, Saint Louis, Rocio, Cacipacoré e Bussuquara. Apesar de estudos intensivos realizados na Amazônia brasileira, sobretudo em certas áreas do Estado do Pará, poucas informações epidemiológicas a respeito da maioria desses vírus foram obtidas. Nesse estudo, foi identificada uma espécie de *Flavivírus* em amostras de sangue total de aves silvestres, capturadas *in-situ* (Alter do chão/PA) e *ex-situ* (Manaus/AM) através da reação em cadeia de polimerase conjugada a transcrição reversa (RT-PCR) seguida por *multiplex nested-PCR* (MN-PCR) para testes de identificação espécie-específicos. Entre as 189 amostras analisadas, foram encontrados 7 (4,23%) *amplicons* sugestivos do vírus Ilhéus entre as amostras positivas. A técnica de diagnóstico utilizada mostrou-se eficaz para a identificação do gênero *Flavivírus* em amostras de aves silvestres apresentando-se como uma alternativa prática, rápida e segura para a identificação de arboviroses brasileiras. A circulação enzoótica dos vírus tanto em aves de cativeiro como de vida livre reforçam o papel das aves como hospedeiro nos ciclos de transmissão destas zoonoses.

ABSTRACT

The Amazon region has the highest biodiversity on the planet, as well as the largest number of arboviruses isolated, mainly due to the great diversity of species of wild vertebrates and hematophagous arthropods. Among the arboviruses, Flavivirus stand out both for producing the highest number of infections and human diseases, such as the severity of these diseases. Moreover, it is known that birds act as reservoir of some poorly studied Flavivirus, such as: Ilheus, Saint Louis Encephalitis, Rocio, Cacipacoré and Bussuquara. Despite intensive studies in the Brazilian Amazon, especially in certain areas of the state of Pará, few epidemiological information about most of these viruses were obtained. In this study, a species of *Flavivirus* has been identified in whole blood samples from wild birds, captured *in-situ* (Alter do Chão/PA) and *ex-situ* (Manaus) by polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR) followed by Multiplex-Nested PCR (MN-PCR) tests for species-specific identification. Among the 189 samples, 7 (4,23%) were suggestive of Ilheus virus. The diagnostic technique used was effective in identifying the genus *Flavivirus* in samples of wild birds presenting itself as practical, fast and secure for the identification of Brazilian arboviruses. The circulation of enzootic viruses both in captive and free-living birds, increase the role of birds as host in the cycles of transmission of zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da localização das áreas de captura das aves silvestres.....	22
Figura 2. Vista aérea do local das capturas <i>in-situ</i> , seca e cheia.....	23
Figura 3. Fluxograma.....	28
Figura 4. Fotografias de gel de agarose com <i>amplicons</i> oriundos de RT-PCR.....	30
Figura 5. Fotografias de gel de agarose com amplicons oriundos de <i>nested-PCR</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Primers senso e anti-senso, gênero-específico para <i>Flavivirus</i> (BRONZONI, et al., 2005).....	26
Tabela 2. Primers internos espécie-específicos para <i>Flavivirus</i> (BRONZONI, et al., 2005).....	27
Tabela 3: As 11 ordens de aves coletadas, número de indivíduos por ordem, local e data de coleta.....	29
Tabela 4. Informações sobre as amostras em que foram possíveis obter produtos amplificados sugestivos de <i>Flavivirus</i> , os quais foram identificados com base no tamanho do <i>amplicon</i> (BRONZONI, et.al. 2005).....	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Espécies de aves capturadas no período de seca em Alter do Chão (<i>in-situ</i>).....	53
ANEXO II. Espécies de aves capturadas no período de cheia em Alter do Chão (<i>in-situ</i>).....	55
ANEXO III. Espécies de aves capturadas no RVSSC (<i>ex-situ</i>), em Manaus.....	57
ANEXO IV. Espécies de aves capturadas <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i> , com seu respectivo número de indivíduos, ordem e família.....	59
ANEXO V. Autorização para colheita de sangue dos animais, <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSQV – Vírus Bussuquara
C – Proteína do capsídio
cDNA– DNA complementar
CACV – Vírus Cacipacoré
CDC – *Center of Disease Control*
DENV – Vírus da Dengue
DENV-1 – Dengue 1
DENV-2 – Dengue 2
DENV-3 – Dengue 3
DENV-4 – Dengue 4
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT - Dithiothreitol
E – Proteína do envelope
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste
EUA – Estados Unidos da América
FMT-AM – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgM – Imunoglobulina M
IGUV – Vírus Iguape
ILHV – Vírus Ilhéus
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
M – Proteína de membrana
MAYV- Vírus Mayaro
MN-PCR – *Multiplex Nested Polymerase Chain Reaction*
NB3- Nível Biológico 3
N-PCR – *Nested- Polymerase Chain Reaction*
NS1 – Proteína não estrutural 1

NS2a – Proteína não estrutural 2a
NS2b – Proteína não estrutural 2b
NS3 – Proteína não estrutural 3
NS4a – Proteína não estrutural 4a
NS4b – Proteína não estrutural 4b
NS5 – Proteína não estrutural 5
NT- Teste de Soroneutralização
OROV – Vírus Oropouche
Pb – Pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
RNA - Ácido Ribonucléico
ROCV – Vírus Rocio
RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
RVSSC – Refúgio de Vida Silvestre Sauim-Castanheiras
SEMMA - Secretaria Municipal de Meio Ambiente
SIPAM- Sistema de Proteção da Amazônia
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis.
TCMV – Vírus Tacaiúma
TRIS - Hidroximetilaminometano
WNV - Vírus do Nilo Ocidental
WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste
YFV – Vírus da Febre Amarela
UFAM- Universidade Federal do Amazonas
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. As Aves Silvestres: Contexto Geral.....	12
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1. Aspectos Etiológicos e Epidemiológicos dos Arbovírus.....	12
2.2. Os vírus a serem estudados: Os <i>Flavivirus</i>	14
2.3. Análise Laboratorial.....	19
3. Justificativa	20
4. Objetivos	21
4.1. Geral.....	21
4.2 Específicos.....	21
5. Material e Métodos	22
5.1. Locais de Captura.....	22
5.1.1. Capturas in-situ.....	23
5.1.2. Capturas <i>ex-situ</i>	24
5.2. Colheitas de sangue.....	24
5.3 Análises Laboratoriais.....	25
5.3.1. Extração de RNA.....	25
5.3.2. RT-PCR e Multiplex-Nested PCR (BRONZONI, et al., 2005).....	25
6. Resultados	29
6.1. As aves silvestres.....	29
6.2. Resultados da RT-PCR e Multiplex-Nested PCR (BRONZONI, et al., 2005).....	30
6.3. Aves silvestres e <i>Flavivirus</i>	32
7. Discussão	33
8. Conclusão	42
9. Referências Bibliográficas	43
ANEXOS	53

1. Introdução

1.1. As Aves Silvestres: Contexto Geral

O Brasil abriga uma das mais diversas avifaunas do mundo, com o número de espécies em torno de 1832, sendo que o maior número de espécies de aves residentes (1.300) e a maior taxa de endemismo do país (20%) ocorrem na Amazônia (MITTERMEIER, et.al., 2003; STOLTZ, et.al., 1996; CBRO, 2011). Noventa e dois por cento das aves brasileiras são espécies residentes, sendo apenas 8% espécies migrantes (SICK, 1993). Entre as espécies migrantes, 61% são oriundas do hemisfério norte (neárticas), em sua maioria aves aquáticas que migram por longas distâncias e se congregam, sazonalmente, ao longo da costa ou nas grandes bacias hidrográficas. As espécies migratórias do sul (austrais) representam 39% das espécies migrantes, mas cujos movimentos e história natural são comparativamente menos estudados que aqueles migrantes do norte (SICK, 1997).

Entretanto, sabe-se que as aves atuam como importantes hospedeiros amplificadores de cerca de 80 espécies diferentes de arbovírus em todo mundo, mas somente alguns destes podem afetar prejudicialmente a saúde destes animais. A maioria dos arbovírus evoluiu junto com seus hospedeiros, e geralmente, não causam morbidade ou mortalidade nas aves hospedeiras (McLEAN e UBICO, 2007).

2. Revisão da Literatura

2.1. Aspectos Etiológicos e Epidemiológicos dos Arbovírus

Arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus denominado arbovírus, segundo a expressão inglesa *arthropod borne virus*, que significa vírus transmitidos por artrópodes. A manutenção destes vírus na natureza ocorre em ciclos complexos envolvendo um ou mais hospedeiro-vertebrado (aves, roedores, marsupiais, primatas, morcegos, répteis entre outros) e vetores artrópodes hematófagos (principalmente mosquitos e carrapatos) que se infectam ao realizarem o repasto sanguíneo no vertebrado virêmico, passando a transmitir o microorganismo ao sugarem, posteriormente, outros animais (NATHANSON, 2007; BEATY, et.al., 1995).

Apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, mas estão presentes predominantemente nos trópicos, devido as condições climáticas favoráveis a manutenção do ciclo viral. De aproximadamente 500 vírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus e outros Vírus de Vertebrados, cerca de 100 espécies de arbovírus são conhecidas por infectarem humanos e 40 por infectarem animais domésticos (KARABASTOS, 1985). Entretanto, muitas arboviroses caracterizadas por síndromes sistêmicas inespecíficas ou pela baixa incidência, freqüentemente permanecem sem identificação mesmo em países com maior apoio laboratorial para os diagnósticos, o que causa uma sub-notificação dos casos (BRÉS, 1998).

Além disso, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus levam a alterações em seus ciclos, podendo haver adaptação a novos reservatórios e, com isto, aumentar sua multiplicação e o risco da emergência (FIGUEIREDO, 2007). Alguns arbovírus adaptaram-se à infecção humana e desenvolveram ciclo urbano, como o vírus da dengue (DENV), cujo vetor é um mosquito urbano do gênero *Aedes* e o reservatório vertebrado é o homem (VASCONCELOS et.al., 1998)

Quase todos os grupos de vertebrados terrestres podem servir como hospedeiros de arbovírus. As aves respondem pela terceira posição como fonte de isolamento de arbovírus, após humanos e roedores (KARABASTOS, 1985). Os hospedeiros vertebrados dos arbovírus tem um papel decisivo na manutenção e amplificação viral; pois nestes, a replicação deverá ser suficiente para que possa servir como fonte de infecção para o hospedeiro invertebrado no momento do repasto sanguíneo (CALISHER, 1998).

No Brasil, os arbovírus, especialmente os transmitidos por mosquitos, encontram-se distribuídos em várias regiões, principalmente na região Amazônica, considerada o maior reservatório destes vírus no mundo. Entre os mais de 200 tipos de arbovírus isolados na Amazônia brasileira, 34 são comprovadamente patogênicos para o homem, porém a maioria ainda é de patogenicidade desconhecida (TRAVASSOS da ROSA et.al., 1998). O grande número de arbovírus encontrados na Amazônia está relacionado, entre outros fatores, à grande diversidade de espécies de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres (VASCONCELOS et.al., 2001a). Além disso, face às condições climáticas relativamente estáveis durante todos os meses do ano, o ciclo de

transmissão se mantém de forma praticamente ininterrupta, ao contrário do que se verifica nas regiões de clima temperado onde, nos períodos de frio, a cadeia de transmissão cessa completamente (PINHEIRO, et al., 1997).

Estudos realizados ao longo de várias décadas na Amazônia brasileira e sintetizados por Degallier, e colaboradores (1992a), mostraram que 31 tipos diferentes de arbovirus já foram isolados a partir de sangue ou órgãos, ou evidenciados indiretamente pela presença de anticorpos no plasma de aves silvestres. Assume importância em saúde pública os vírus causadores de encefalites como: Encefalite Equina do Leste (EEEV) e Encefalite Equina do Oeste (WEEV) (*Togaviridae*), vírus Saint Louis (SLEV), vírus Rocio (ROCV) e vírus Ilhéus ILHV (*Flaviviridae*), dentre outros (DEGALLIER et al., 1992a).

Os arbovírus são um grupo diverso representado por 12 famílias diferentes, mas a maioria dos arbovírus conhecidos é vírus de RNA agrupados nas famílias: *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (FIGUEIREDO, 2007). Dentre os arbovírus que ocorrem no Brasil destacam-se os *Flavivirus*, tanto pela maior circulação em humanos e animais observada em estudos prévios (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1992; CRUZ et.al., 2009), como pela gravidade das doenças causadas, provocando febres hemorrágicas e meningoencefalites (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1998; McLEAN e UBICO, 2007).

2.2. Os vírus a serem estudados: Os *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* é taxonomicamente composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* e é representada por partículas esféricas envelopadas de 40 a 60nm de diâmetro, com genoma RNA de fita simples e polaridade positiva. O genoma dos *Flavivirus* contém aproximadamente 11000 nucleotídeos e inclui dez genes que codificam 3 proteínas estruturais (proteína do core-C, da membrana-M e a glicoproteína de superfície-E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), das quais a proteína NS5 apresenta seqüências nucleotídicas mais conservadas entre as espécies do gênero (LINDEBACH e RICE, 2001). No presente projeto foram selecionadas várias combinações de *primers* gênero-específicos a partir da região NS5,

previamente descritas para os *Flavivirus* YFV, SLEV, ROCV, ILHV, DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 e BSQV, com características semelhantes quanto à proporção de GC e à temperatura de ligação, os quais pudessem detectar todos os arbovírus estudados, originando produtos (*amplicons*) de tamanhos distintos e visualmente discrimináveis e, ainda, que não produzissem bandas inespecíficas.

No Brasil já foram isolados os *Flavivirus* da Febre Amarela (YFV), da Dengue (DENV) 1, 2, 3 e 4, Encefalite de Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Bussuquara (BSQV), Iguape (IGUV) e Cacipacoré (CACV). Muitos destes vírus são zoonóticos no meio silvestre e podem, eventualmente, infectar o homem, como os vírus YFV, SLEV, ROCV, ILHV e BSQV (COIMBRA, et.al., 1993; TRAVASSOS da ROSA et.al., 1998). Entre os *Flavivirus*, destaca-se também o vírus do Nilo Ocidental (WNV), que recentemente sua circulação foi demonstrada no país, pela presença de anticorpos neutralizantes em eqüinos, no pantanal (PAUVOLID-CORREA, A. et.al., 2011).

Dos 16 *Flavivirus* que foram isolados a partir de aves no mundo, seis (entre eles ROCV e SLEV) causam infecções no sistema nervoso central em humanos, pelo menos três causam doença clínica em animais domésticos e dois causam morbidade e mortalidade em aves silvestres (entre eles o WNV) (McLEAN e UBICO, 2007). A ampla variedade de padrões de doenças causadas por *Flavivirus* depende da espécie viral e dos hospedeiros envolvidos, e incluem: sub-clínico, agudo, doença crônica progressiva e morte. Assim, a severidade da doença pode não ser idêntica nas diferentes espécies de aves afetadas. Além da espécie, fatores como a idade das aves e a cepa viral possuem influência nas conseqüências clínico patológicas da infecção (PHALEN e DAHLHAUSEN, 2004; McLEAN e UBICO, 2007).

O vírus Ilhéus (ILHV) está distribuído nas Américas do Sul e Central, inclusive no Brasil, onde tem sido relacionado à doença febril aguda. (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1998). Este vírus foi primeiramente isolado de mosquitos *Aedes sp* e *Psorophora sp* capturados em 1944, na cidade de Ilhéus (BA). Entre os artrópodes, a manutenção de ILHV na natureza é atribuída a espécie *Psorophora ferox* como principal hospedeiro invertebrado (TURREL et al., 2005). Entretanto partículas virais identificadas a ILHV também já foram isoladas em espécimes identificados a *Psorophora albipes*, *Aedes fulvus* e *Haemagogus leucocelaenus* (VASCONCELOS, et al., 1991).

Este vírus tem sido isolado de humanos em vários países da América do Sul e de diferentes espécies de aves em Trinidad e Panamá (KARABASTOS, 1985). Anticorpos foram detectados em uma espécie de cutia (*Dasyprocta punctata*) no Panamá e em morcegos em Trinidad (McLEAN e UBICO, 2007). Recentemente, ILHV foi isolado de aves silvestres como: coleirinho (*Sporophila caerulescens*), chupim (*Molothrus bonariensis*), e detectados anticorpos em: *Columbina talpacoti*, *Geopelia cuneata*, *Molothrus bonariensis* e *Sicalis flaveola*, no Parque Ecológico do Tietê, Brasil (PEREIRA, et.al., 2001). Aves migratórias como *Sporophila caerulescens* podem estar disseminando ILHV para outras regiões do Brasil (McLEAN e UBICO, 2007).

O vírus Rocio (ROCV) foi o causador de uma epidemia severa de encefalite em humanos, ocorrida no Vale do Ribeira, litoral sul do estado de São Paulo, entre 1973 e 1980. Foram aproximadamente 1000 casos humanos de encefalite notificados, com uma letalidade de 10% e entre os sobreviventes, cerca de 20% apresentaram sequelas motoras ou de equilíbrio (FIGUEIREDO, 2000). Durante a epidemia, em 1975, este vírus foi isolado de uma ave silvestre, *Zonothrichia capensis*, e foram encontrados anticorpos em uma variedade de aves domésticas (galinhas, patos e pombos), morcegos, roedores e marsupiais (LOPES et al. 1978; IVERSSON 1989). Há evidências que as aves, tanto silvestres como domésticas podem atuar como reservatórios nos ciclos silvestres e peri-domésticos, respectivamente. (McLEAN e UBICO, 2007). O vírus também foi isolado de mosquitos *Psorophora ferox*, assim como *Aedes scapularis*, os quais foram demonstrados experimentalmente serem vetores competentes deste vírus (IVERSSON et al., 1997).

O ROCV produz doença clínica somente em humanos, e não há evidências da manifestação de doença em animais selvagens, mas existem algumas evidências que o vírus causou a morte de galinhas e porcos durante a epidemia em 1975 (McLEAN e UBICO, 2007). Muitos aspectos da epidemiologia do ROCV permanecem desconhecidos e os fatores responsáveis pelo aparecimento e desaparecimento no Vale do Ribeira continuam um mistério (FIGUEIREDO, 2000).

O vírus Bussuquara (BSQV) provavelmente distribuiu-se vastamente pelas florestas tropicais da América do sul. Por anos, acreditava-se que o principal ciclo de transmissão envolvia roedores e mosquitos, com os primatas e seres humanos participando como hospedeiros acidentais. Entretanto, a detecção de anticorpos contra

BSQV em aves silvestres na Amazônia e o fato do vírus ter sido isolado de dois gêneros de mosquitos (*Coquillettidia* e *Aethini*) indicam uma provável participação das aves silvestres e mosquitos ornitofílicos no ciclo de transmissão (KARABASTOS, 1985; DEGALLIER et.al., 1992a; TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1998). Apenas um caso de infecção humana, caracterizado, principalmente, por febre aguda, foi relatado (FIGUEIREDO, 2000).

O vírus da encefalite Saint Louis (SLEV) distribui-se descontinuamente em uma extensa área nas Américas, do Canadá à Argentina. O primeiro isolamento do SLEV ocorreu durante um surto, em 1933, nas cidades de Saint Louis e Kansas (EUA) (McLEAN e UBICO, 2007). No Brasil, SLEV foi primeiramente isolado em 1960, de um *pool* de *Sabethes belisarioi* capturados na estrada Belém- Brasília (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1980). Estudos sobre o ciclo do SLEV mostram *Culex declarator* e *Culex coronator* como vetores e aves silvestres, primatas, preguiças e marsupiais como reservatórios (VASCONCELOS et al., 1998). Na Amazônia, através de um estudo sorológico realizado em mais de 11 mil espécimes de aves, 54 espécies foram consideradas hospedeiras, inclusive com isolamento viral em 18 delas (VASCONCELOS et al., 1991). Em outro relevante inquérito sorológico, desta vez realizado em área de Mata Atlântica no sul de SP, a presença de anticorpos monotípicos inibidores da hemaglutinação por SLEV foi detectada em espécimes identificados a 49 espécies de aves silvestres, sendo 25 residentes e oito migratórias estritas (FERREIRA et al., 1994) Nos EUA, em função do aumento das infecções por SLEV em populações de aves ocorrerem principalmente no verão, durante a época do ciclo de transmissão do mosquito, e as suas amplificações nas aves normalmente precederem casos humanos de SLEV, as aves selvagens têm sido usadas eficientemente como vigilância urbana da doença (LORD et.al., 1974).

Apesar do SLEV não estar relacionado a epidemias, dados sorológicos indicam a presença de anticorpos específicos circulantes na população localizada próximo às áreas florestais da Amazônia e Mata Atlântica, indicando que é enzoótico nestas regiões (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1998). A alta prevalência de anticorpos na população brasileira sugere que as infecções do SLEV estão sendo sub-notificadas e sua importância sendo subestimada. Além disso, no Brasil não existe ainda nenhum programa de vigilância para o SLEV e os profissionais da saúde, normalmente, não

consideram o vírus entre seus diagnósticos diferenciais. Pode-se, assim, notificar o primeiro surto de SLEV detectado no Brasil, sendo este mascarado por uma epidemia de dengue. Durante este surto, inclusive, foi possível detectar infecção simultânea por DENV-3 e SLEV em uma paciente com diagnóstico de dengue hemorrágico (MONDINI, et.al., 2007).

O vírus Cacipacoré (CACV) foi isolado pela primeira vez em 1977, de uma ave da região amazônica (Pará, Brasil), porém seus vetores, reservatórios e até mesmo a doença ainda são desconhecidos (TRAVASSOS DA ROSA et.al., 1998). Batista (2007) descreveu o primeiro isolamento do vírus em seres humanos, em Rondônia, em um paciente que veio a óbito apresentando co-infecção por *Leptospira spp.* e CACV. O vírus foi recentemente encontrado infectando *Aedes aegypti*, na cidade de Manaus, sugerindo que a infecção com doença por este vírus possa estar ocorrendo em outros locais do Brasil, sendo provavelmente, confundidos com dengue, inclusive, no diagnóstico sorológico por pesquisa de IgM, pois teoricamente, sendo um vírus da mesma família, por reação cruzada, poderia o CPCV, dar resultado falso positivo para DENV (Mário Luís Garcia Figueiredo, informação pessoal, 2010).

2.3. Análise Laboratorial

Nos últimos anos, métodos de biologia molecular como a Transcrição Reversa (*Reverse Transcription-RT*) seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*), vêm sendo utilizados para a detecção e identificação de vários agentes infecciosos, incluindo os *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*. Tais métodos são adequados ao diagnóstico laboratorial das arboviroses, principalmente por apresentarem resultados rápidos, de alta sensibilidade e especificidade, bem como, por permitirem o sequenciamento nucleotídico dos produtos amplificados que visam à identificação viral, estudos filogenéticos e de genotipagem.

Neste aspecto, a RT-PCR tem se limitado ao diagnóstico de alguns poucos arbovírus para a detecção e identificação dos arbovírus, utilizando *primers* vírus-específicos. Por outro lado, o uso de *primers* universais, especialmente os gênero-específicos, possibilita a detecção de vários vírus dentro de um mesmo grupo, permitindo, desta forma, o diagnóstico de um número maior de arboviroses. Isto beneficia, principalmente, a detecção de arbovírus cujo diagnóstico não é usual, bem como a detecção e caracterização de novos vírus (KUNO, 1998). Neste sentido, *primers* gêneros-específicos foram descritos para a detecção dos *Alphavirus* (PFEFFER et al., 1997; SÁNCHEZ-SECO et al., 2001), *Flavivirus* (FULOP et al., 1993; KUNO, et al., 1998, SCARAMOZZINO, et al., 2001; BALEOTTI, et al., 2003; MAHER-STURGESS, et.al., 2008) e *Orthobunyavirus* (DUNN et al., 1994).

3. Justificativa

As aves são os principais reservatórios de arbovírus pouco estudados como: ILHV, SLEV, WNV, ROCV, vírus Mayaro (MAYV,) vírus Oropouche (OROV), e vírus Tacaiúma (TCMV). Entretanto, ainda não se sabe qual a susceptibilidade das espécies silvestres (residentes e migratórias) do país em atuarem como potenciais reservatórios, condutores e transmissores desses vírus. O monitoramento em animais possibilita a identificação da entrada de novos arbovírus no país, antecipando a ocorrência de eventuais casos humanos e, dessa maneira, reforçando as medidas de controle e vigilância.

Teoricamente, a disseminação de arboviroses vinculada às aves, como hospedeiro-vetorado (reservatório), pela capacidade de realizar movimentos migratórios de longas distâncias, nos leva a uma grande preocupação em relação ao aparecimento de grandes epidemias urbanas e rurais, pela introdução destes agentes infecciosos em novas localidades.

O desmatamento, o uso do subsolo, a construção de represas e de rodovias e a urbanização acelerada têm sido as principais modificações ambientais introduzidas pelo homem e associadas à emergência ou reemergência de importantes arbovírus, inclusive alguns com atividade patogênica em seres humanos. Nesse contexto, a atividade antrópica desordenada pode proporcionar um maior contato entre as aves silvestres, que são potenciais portadores de vários patógenos, com aves domésticas, e pessoas de áreas urbanas e rurais. Dessa forma, alguns arbovírus pouco conhecidos poderiam emergir como problema de saúde pública, adaptando-se a novos hospedeiros e deixando de ser restritos aos seus nichos ecológicos silvestres, o que precisa ser melhor pesquisado.

Considerando a escassez de estudos sobre níveis de infecção por *Flavivirus* em seres humanos, animais domésticos, silvestres e vetores, justifica-se a realização de avaliações dessa natureza objetivando o conhecimento da epidemiologia desses vírus. Nesse aspecto, o emprego de métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia de polimerase precedida de transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR), permite o estabelecimento de um trabalho prático, rápido e seguro para o diagnóstico de arboviroses brasileiras.

4. Objetivos

4.1. Geral:

Detectar genoma de *Flavivirus* em amostras de sangue de aves silvestres capturadas *in-situ* e *ex-situ* na Amazônia Central.

4.2 Específicos:

- 1) Identificar espécies de *Flavivirus* em amostras de sangue das aves coletadas através da reação em cadeia de polimerase conjugada a transcrição reversa (RT-PCR) e M-N-PCR (BRONZONI et.al., 2005).

- 2) Avaliar a técnica de RT-PCR para detecção de *Flavivirus* em aves silvestres.

5. Material e Métodos

5.1. Locais de Captura

As capturas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (Nº: 21722-1) para atividades com finalidade científica de coleta e transporte de material biológico *in-situ* (Alter do Chão, PA) e *ex-situ* (Manaus, AM).

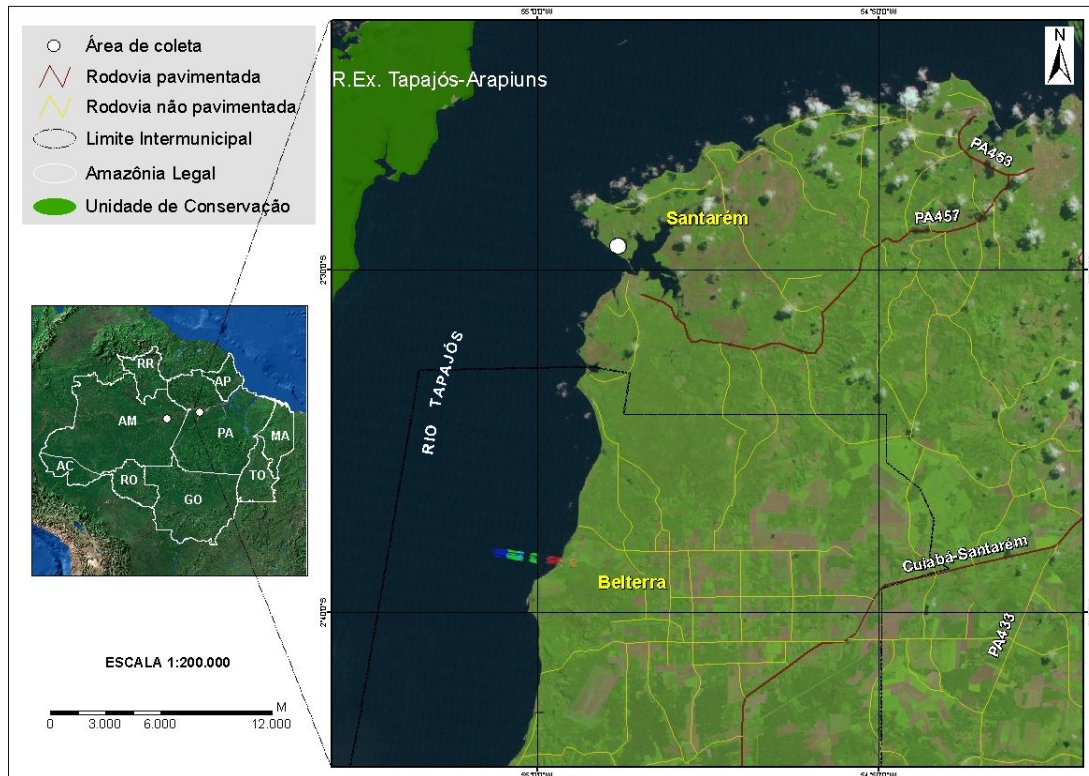


Figura 1: Localização das áreas de captura das aves silvestres: Manaus/AM e Alter do Chão/PA. A imagem ampliada mostra o local das capturas *in-situ*, na península em frente ao distrito de Alter do Chão, PA. **Nota Técnica:** Mapa elaborado a partir da base cartográfica digital 1: 250.000 dados da Amazônia Legal fornecidos pelo SIPAM/IBGE/IBAMA, 2009. Imagem LANDSAT TM5 cena 227/62 de 01/07/2005. Fonte: INPE.

5.1.1. Capturas *in-situ*

As capturas *in-situ* foram realizadas na península próxima ao distrito de Alter do Chão. Com aproximadamente 3 km de comprimento e com 1 a 2 km de largura, situada na margem direita do rio Tapajós (2°31'S, 55°00'W), no oeste do estado do Pará, Brasil. Este local está situado próximo ao centro de uma extensa área de savana circundada por floresta decídua. A região tem uma estação seca bem definida, que vai de julho a dezembro, e um período chuvoso de janeiro a junho.



Figura 2. Vista aérea do local das capturas *in-situ*, em outubro de 2009, na seca (A) e em maio de 2010, na cheia (B). Em destaque a área de savana amazônica onde as aves foram capturadas. **Fotos:** Samuel Franco Lopes

Por ser uma região utilizada por espécies migratórias, neárticas e austrais, como local de descanso durante os longos deslocamentos, foram realizadas 2 saídas de campo, uma em outubro de 2009 (seca), e outra em maio de 2010 (chuva). Para as capturas, foram utilizadas redes de neblina (mist-nets), medindo 2,5 metros de altura por 12 metros de comprimento e malha de 36 milímetros para captura das aves. Durante os trabalhos, as redes foram abertas antes do nascer do sol até o final da manhã, e reabertas no final da tarde até o anoitecer. As revisões eram realizadas a cada 30 minutos, sendo as aves capturadas levadas ao acampamento para identificação, pesagem e colheita de sangue. As aves foram identificadas até espécie e receberam uma anilha fornecida pelo Centro de Estudo de Migração de Aves (Cemave/Ibama). Após os procedimentos, as aves eram soltas no mesmo local da captura.

5.1.2. Capturas *ex-situ*

As capturas *ex-situ* foram realizadas durante os meses de abril e maio de 2010. Algumas espécies de aves, como as pertencentes às ordens Strigiformes, Psittaciformes e Falconiformes, raramente são capturadas com a utilização de redes de neblina, por isso foram realizadas coletas em cativieiro (*ex-situ*) no Refúgio de Vida Silvestre Sauim-Castanheiras (RVSSC), que recebe animais de resgates e apreensão, em Manaus. O RVSSC é uma unidade de conservação administrada pela Prefeitura de Manaus, por meio da Secretaria Municipal de Meio Ambiente - SEMMA.

5.2. Colheitas de sangue

A quantidade de sangue colhetada era calculada em função do peso corporal da ave, sendo padronizada a quantidade máxima de sangue como 1% do peso do animal. As vias de colheita de sangue nas aves com peso acima de 200 gramas são as veias jugulares, veias basilicas ou alares e veias metatársicas utilizando seringa de insulina devidamente heparinizada. Em aves de pequeno porte apenas algumas gotas de sangue podem ser colhetadas em tubo capilar. Após a colheita de sangue, as amostras eram acondicionadas em criotubos devidamente identificados, e armazenadas em um barril de nitrogênio líquido para posteriormente serem transferidas para um freezer -70°C.

5.3 Análises Laboratoriais

O Presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Virologia (NB3) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), no laboratório de Genética da UFAM, e no laboratório de Virologia do INPA. O diagnóstico laboratorial foi realizado pela detecção de antígeno viral em sangue total através da reação em cadeia de polimerase conjugada a transcrição reversa (RT-PCR).

5.3.1. Extração do RNA

Precedeu as técnicas de amplificação genômica dos *Flavivirus*, a extração do RNA viral. Portanto, buscou-se minimizar a influência de fatores que pudessem diminuir a eficiência das amplificações ou que degradassem o RNA obtido. O RNA foi extraído a partir de 140µl de sangue total das aves, utilizando, para tanto, o mini kit QIAamp[®] viral RNA (QIAGEN, USA), de acordo com as instruções do fabricante, que é indicado por vários autores para a extração do RNA de arbovírus em sobrenadante de culturas celulares (SCARAMOZZINO, et al., 2001), (ANDERSON, et al., 2004). O volume final obtido foi de 60µl.

5.3.2. Reação em cadeia da Polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e Multiplex-Nested PCR. (BRONZONI, et al., 2005).

O protocolo utilizado foi descrito por Bronzoni et.al. (2005). A metodologia envolve inicialmente a detecção gênero-específica dos *Flavivirus* por uma reação em cadeia de polimerase precedida de transcrição reversa do RNA-(RT-PCR), seguido por multiplex nested PCR (MN-PCR) ou nested PCR (N-PCR) para testes de identificação espécie-específicos.

Na primeira fase do teste realizou-se a transcrição reversa (RT) a partir de 8µl do extrato de RNA, 20 unidades (U) da enzima transcriptase reversa (*Superscript-III*-Invitrogen, USA), 4µl de solução tampão cinco vezes concentrada (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,5µl de DTT a 0,1M (*Dithiothreitol*), 1µl de cada *primer* (sFG1 e cFG2) a 100µM, 1µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP (*DeoxynucleosideTriphosphate*), 20U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-

Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20 μ l. A mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos (min) e a 95°C por 5 min. Todas as incubações da síntese de c-DNA foram feitas em termociclador (Mastercycler[®] Gradient, EPPENDORF).

A mistura da PCR consistiu de 8 μ l do produto da RT, 1U da enzima polimerase (*Platinum Taq DNA polymerase*-Invitrogen, USA), 5 μ l da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2 μ l de MgCl₂ a 50mM, 1 μ l de cada *primer* (FG1 e FG2) a 100 μ M, 1 μ l da mistura contendo 250 μ M de cada dNTP e água suficiente para completar 50 μ l. Em termociclador (Mastercycler[®] Gradient, EPPENDORF), a mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min.

Primer	Sequências (5' - 3')	Amplicon (pb)
sFG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	980
cFG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATACAGCATAACA	975

Tabela 1. Primers senso e anti-senso, gênero-específicos para *Flavivirus*. (BRONZONI, et al., 2005). Onde: pb = pares de bases.

Na segunda etapa desta técnica realizou-se uma multiplex-nested-PCR ou uma nested PCR que detecta *Flavivirus* em nível de espécie. Para tanto, a mistura consistiu de 1 μ l do produto obtido na primeira PCR, 1U da enzima polimerase (*Platinum Taq DNA polymerase*-Invitrogen, USA), 5 μ l da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2 μ l de MgCl₂ a 50mM, 1 μ l do *primer* externo sFG1 (a 15 μ M), 1 μ l de cada *primer* interno espécie-específico (a 15 μ M), mostrado na **Tabela 2**, 1 μ l da mistura contendo 250 μ M de cada dNTP e água suficiente para completar 50 μ l. A mistura foi submetida a 25 ciclos térmicos iguais aos descritos para a PCR.

Ainda, vale ressaltar que para evitar o risco de resultados falso-positivos na *multiplex-nested*- PCR tomaram-se medidas de segurança incluindo separação de áreas de pré- e pós-PCR, uso de pipetas exclusivas para cada área, além do uso de ponteiros

com filtros e de controles negativos em cada reação, a fim de evitar contaminação indesejável.

Tabela 2. Primers internos espécie-específicos para *Flavivirus*. (BRONZONI, et al., 2005).

Primer	Sequências (5'- 3')	Etapa	Amplicon (pb)*
nDEN1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	MN-PCR	472
nDEN2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC	MN-PCR	316
nDEN3	CCCATTGGTTCTCCTCTGTG	MN-PCR	628
nYF	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	MN-PCR	253
nDEN4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	N-PCR	222
nSLE	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	N-PCR	232
nROC	TCACTCTTCAGCCTTTCG	N-PCR	230
nILH	TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA	N-PCR	474
nBSQ	AAGTGACACCTGTTTCAGGGTA	N-PCR	388

*Tamanho do *amplicon*, em pares de bases, resultante da amplificação com o primer espécie-específico correspondente.

Para detectar os produtos amplificados foi feita eletroforese em gel de agarose a 1,8% em solução tampão Tris-Borato-EDTA 0,5M de pH 8,0. A visualização de bandas foi feita após coloração com brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

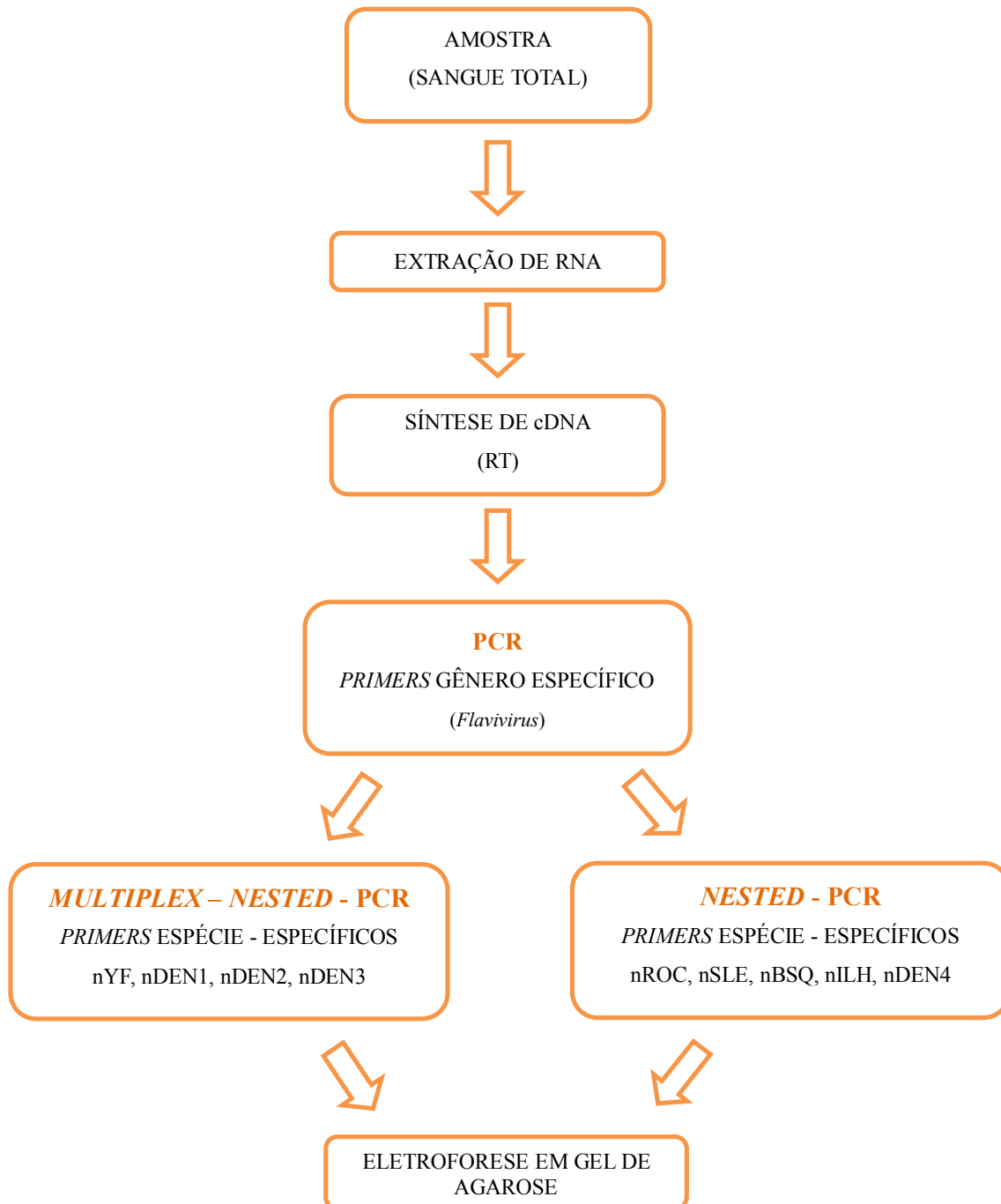


Figura 3. Fluxograma mostrando a metodologia aplicada às amostras de aves silvestres.

6. Resultados

6.1. As aves silvestres

Durante as duas expedições *in-situ* (cheia/seca) e nas capturas *ex-situ* no RVSSC foram coletadas amostras de sangue de um total de 189 indivíduos, de cerca de 50 espécies diferentes distribuídas em 23 famílias e 11 ordens (*Passeriformes*, *Galbuliformes*, *Coraciiformes*, *Accipitriformes*, *Strigiformes*, *Psittaciformes*, *Falconiformes*, *Anseriformes*, *Pelicaniformes*, *Columbiformes* e *Cathartiformes*) (Tabela 3).

A ordem *Passeriforme* teve a maior representatividade, apresentando 12 famílias e 47 espécies diferentes correspondendo a 58,7 % (n=111) dos espécimes coletados. Dentro dessa ordem, a família *Tyrannidae* (n=46) destacou-se com 7 espécies, correspondendo a 24,3 % do total de aves capturadas. Entre os membros da família *Tyrannidae*, destaque para a espécie *Elaenia cristata* (n=23). Outra família que apresentou representatividade foi a *Thamnophilidae* (n=22), com destaque para a espécie *Formicivora grisea* (n=15). Entre as aves não passeriformes, a família *Psittacidae* destacou-se com 9 espécies diferentes, equivalendo a 24,9 % (n=47) dos indivíduos amostrados.

Ordem	Nº de indivíduos	Localidade	Mês/Ano
<i>Passeriformes</i>	111	Alter do Chão (Santarém)	10/2009 e 05/2010
<i>Galbuliformes</i>	6	Alter do Chão (Santarém)	10/2009 e 05/2010
<i>Coraciiformes</i>	1	Alter do Chão (Santarém)	05/2010
<i>Psittaciformes</i>	47	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Strigiformes</i>	7	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Accipitriformes</i>	4	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Cathartiformes</i>	3	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Columbiformes</i>	2	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Pelicaniformes</i>	2	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Falconiformes</i>	2	RVSSC (Manaus)	04/2010
<i>Anseriformes</i>	4	RVSSC (Manaus)	04/2010
Total= 189			

Tabela 3: As 11 ordens de aves coletadas, número de indivíduos por ordem, local e data de coleta. Detalhes sobre a família, espécie e peso dos indivíduos em ANEXO.

A espécie com maior representatividade durante as coletas em Alter do Chão (PA) no período de seca (outubro de 2009) foi *Elaenia cristata* (n=14), e durante a estação chuvosa foram *Hylophilus pectoralis* e *Formicivora grisea* (ambas com n=8). Já nas coletas no RVSSC (AM) *Amazona festiva* (n=14) foi a espécie com mais indivíduos capturados.

6.2. Resultados da RT-PCR e Multiplex-Nested PCR (BRONZONI, et al., 2005).

Das 189 amostras em que se pesquisou *Flavivirus*, estes vírus foram detectados em 7 amostras (positividade de 4,23%). Entretanto, os genomas virais foram detectados, principalmente, na segunda fase do teste, a *multiplex-nested-PCR* vírus-específica, já que na primeira fase (RT-PCR para *Flavivirus*) apenas, nos controles-positivo, DENV-1, e DENV-4 observaram-se *amplicon*, do gênero, 980 pb, como mostra a **Figura 4**.

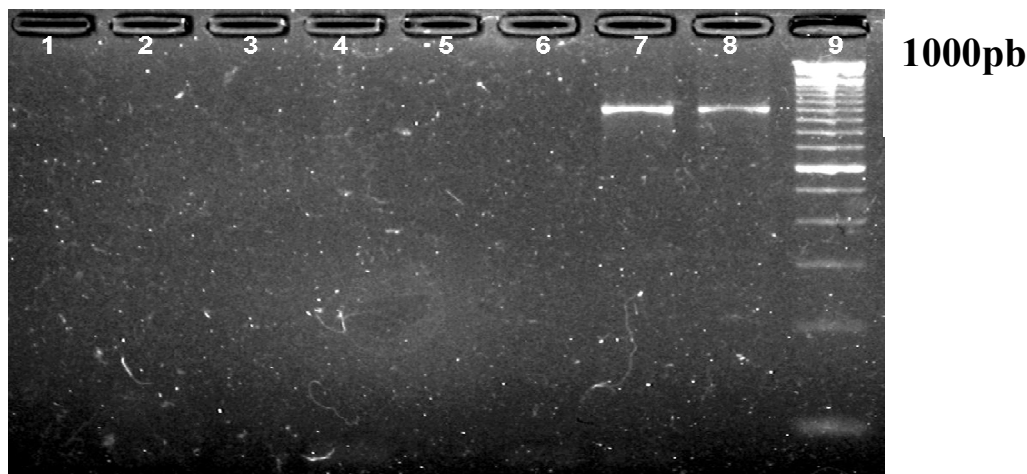


Figura 4. Foto de um gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando *amplicon* oriundo de RT-PCR. Na coluna 1 observa-se ausência de *amplicon* no controle negativo, água. Nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6 observam-se resultados negativos de extratos do RNA de amostras de aves de Alter do Chão, PA. Na coluna 9 observa-se o marcador tipo escada, de 100 pb (Fermentas Life Sciences). Nas colunas 7 e 8 observam-se *amplicons*, com aproximadamente 980 pb, correspondente aos controles positivos do teste, DENV-1 e DENV-4, respectivamente.

Utilizando a *multiplex-nested-RT-PCR* vírus-específica para *Flavivirus*, foi possível detectar presença de *amplicons* sugestivos de *Flavivirus*, somente na *nested-*

PCR, em 7 amostras, tanto de aves de vida livre (Alter do Chão, PA) como de cativeiro (RVVSC, AM), mostradas nas fotografias da **Figura 5**.

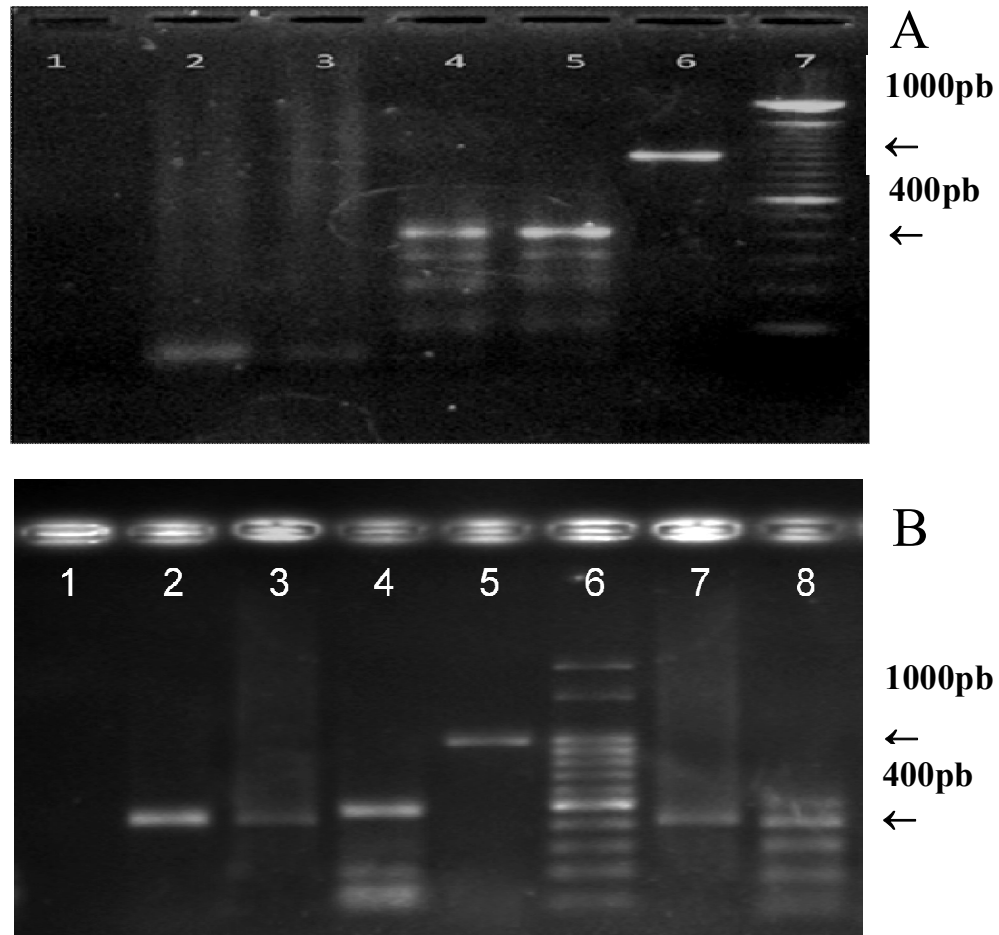


Figura 5 Fotografias mostrando *amplicons* obtidos pela *nested*-PCR espécie-específica para *Flavivirus*, em gel de agarose corado com brometo de etídio. O tamanho dos *amplicons* permitiu identificar preliminarmente a espécie viral segundo Bronzoni et.al., 2005. **A:** Coluna 1 observa-se ausência de *amplicon* no controle-negativo água. Nas colunas 2 (A-39) e 3 (A-40), observam-se ausência de *amplicons*, oriundos de amostras de Alter do Chão, PA. Observam-se nas colunas 4 (A-41), 5 (A-42), *amplicons* com tamanho de ~ 474 pb, compatíveis com vírus ILHV, oriundos de amostras de aves de Alter do Chão, PA. Na coluna 6 observa-se *amplicon* de ~1000pb correspondente ao controle positivo DENV-1. Na coluna 7 encontra-se o padrão de peso molecular, escada com 100pb (Fermentas Life Sciences). **B.** Na coluna 1 observa-se ausência de *amplicon* no controle-negativo, água. Observam-se nas colunas 2 (A-93), 3 (A-36), 4 (R-36), 7 (A-111) e 8 (A-58) *amplicons* com tamanho de ~ 474 pb, compatíveis com vírus ILHV, oriundos de amostras de aves silvestres de cativeiro e vida livre. Na coluna 5, observa-se *amplicon* de ~980pb correspondente ao controle positivo DENV-1. Na coluna 6 encontra-se o padrão de peso molecular, escada com 100pb (Ludwing Biotecnologia).

6.3. Aves silvestres e *Flavivirus*

Com base no tamanho dos *amplicons* obtidos, foram detectados ILHV infectando aves das espécies *Nystalus maculatus* (3), *Tolmomyias flaviventris* (1), *Dendroplex picus* (1) *Amazona festiva* (1), *Elaenia flavogaster* (1). Com exceção do indivíduo da espécie *Amazona festiva* do RVVSC, o restante das amostras com *amplicons* compatíveis com ILHV são de animais de vida-livre capturados em Alter do Chão. Informações sobre as espécies de aves das quais se detectou estes *Flavivirus* encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3 em Anexo.

Amostra	Localidade	Data	Espécie	Tamanho amplicon	Vírus compatível
A-36	Alter do Chão (PA)	10/2009	<i>Elaenia flavogaster</i>	~474	ILHV
A-41	Alter do Chão (PA)	10/2009	<i>Nystalus maculatus</i>	~474	ILHV
A-42	Alter do Chão (PA)	10/2009	<i>Nystalus maculatus</i>	~474	ILHV
A-58	Alter do Chão (PA)	10/2009	<i>Dendroplex picus</i>	~474	ILHV
A-93	Alter do Chão (PA)	05/2010	<i>Nystalus maculatus</i>	~474	ILHV
A-111	Alter do Chão (PA)	05/2010	<i>Tolmomyias flaviventris</i>	~474	ILHV
R-36	Manaus (AM)	04/2010	<i>Amazona festiva</i>	~474	ILHV

Tabela 4. Informações sobre as aves em cujos extratos de RNA foram possíveis obter produtos amplificados sugestivos de *Flavivirus*, os quais foram identificados com base no tamanho do amplicon (BRONZONI, et.al. 2005).

7. Discussão

A região amazônica brasileira, dentro de sua vasta abrangência territorial, apresenta uma enorme biodiversidade ainda pouco conhecida. Nesse ambiente complexo, coabitam inúmeras espécies de vertebrados silvestres e de artrópodes hematófagos que servem como hospedeiros e vetores, respectivamente, para muitos agentes patogênicos, dentre os quais, os arbovírus assumem grande importância em saúde pública, na região. A ação antrópica indiscriminada nesse ecossistema tem provocado, ao longo dos anos, o surgimento de várias arboviroses e de outras doenças virais. Durante o período de 1954 a 2006, foi possível o isolamento de, pelo menos, 196 tipos diferentes de arbovírus, dos quais, 160 foram isolados, pela primeira vez, no Brasil (principalmente na Amazônia brasileira), com, pelo menos, 100 tipos novos para o mundo (NUNES et.al., 2009).

A transformação contínua de extensas áreas de florestas em pastagens e/ou monocultivos agrícolas tem acontecido ao longo das últimas décadas, vêm levando a um importante processo de migração desordenada, bem como à fragmentação de biomas naturais da região, culminando em alterações climáticas significativas, tais como a diminuição da pluviosidade e o aumento de temperatura (ROSELEM, 2005). Portanto, mudanças ambientais podem decorrer de modificações climáticas naturalmente cíclicas ou do resultado de ações antrópicas como o desmatamento, construções de hidrelétricas, rodovias e minerações. Dessa forma, o manejo ambiental inadequado pode romper o estado estável da floresta, levando a uma série de fenômenos, incluindo entre eles, o aumento da incidência de vírus conhecidos ou a emergência de novos vírus, tornando possível o contato direto do homem com esses agentes.

Vasconcelos (1999) referiu várias arboviroses que emergiram ou reemergiram na região Amazônica brasileira e os elementos condicionantes dessa emergência ou reemergência. Dentre as arboviroses emergentes nessa região é mencionada a dengue que teve como provável fator para sua emergência o inadequado controle dos mosquitos vetores e o aumento da urbanização nos trópicos; e a febre do Oropouche, com admissível fator responsável pela sua emergência o desmatamento, o aumento da colonização humana e a urbanização não planejada na Amazônia (VASCONCELOS *et al.*, 2001a). Portanto, as tarefas que venham a ser exercidas pelo homem, como construção de estradas, desmatamento, urbanização acelerada poderão resultar em um

deslocamento dos vetores de arbovírus das áreas florestais até os arredores das cidades, podendo resultar em risco aumentado de transmissão de arbovírus. Por outro lado, as pessoas que adentrarem as áreas silvestres de circulação de arbovírus poderão se infectar com os mesmos, participando desta maneira, acidentalmente, do ciclo biológico desses vírus. Mesmo as pessoas que não cheguem até as áreas enzoóticas, mas que possam frequentar lugares próximos poderão estar sujeitas às arboviroses, desde que haja um aumento da atividade viral, associada ou não, a baixa imunidade dos hospedeiros vertebrados.

Os *Flavivirus* que ocorrem no Brasil se mantêm na natureza em ciclos complexos envolvendo culicídeos e seus animais-reservatório, principalmente mamíferos e aves. As arboviroses em quase sua totalidade são zoonoses mantidas em ambiente silvestre. Conseqüentemente, as pessoas que mantêm contato com os focos enzoóticos são as que correm maior risco de adquirir a infecção. (CRUZ *et.al.*, 2009). As áreas objeto do estudo oferecem características climáticas e ecológicas que favorecem a existência e manutenção de uma densa e variada população de culicídeos nas mesmas. Entretanto, níveis atuais de anticorpos para *Flavivirus* mesmo na população humana são desconhecidos nesses locais. Da mesma forma, desconhecem-se a maioria dos *Flavivirus* que ocorrem nos vertebrados silvestres e ainda, mesmo daqueles vírus já identificados, desconhece-se a diversidade genética.

Na Amazônia brasileira, os trabalhos a respeito da identificação de *Flavivirus* em aves silvestres realizados utilizam geralmente diferentes testes sorológicos e/ou isolamento viral como forma de identificação viral (VASCONCELOS *et al.*, 1991; DEGALLIER *et al.*, 1992a; FERREIRA *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2009). O presente trabalho representa um estudo pioneiro na padronização da técnica de RT-PCR em amostras de sangue total de aves silvestres para identificação gênero e espécie-específica de *Flavivirus*, na região amazônica.

No início das análises laboratoriais, foi testado um par de *primers* gênero-específico para *Flavivirus* (FL100F e FL200R) desenhados a partir de 60 cepas de 50 espécies diferentes de *Flavivirus*, por Maher-Sturgess, *et.al.* (2008). Entretanto, por serem *primers* bastante degenerados existe um maior risco da ocorrência de ligações inespecíficas e reações cruzadas, diminuindo a especificidade da técnica. Mesmo após sucessivas tentativas de clonagem e sequenciamento destes *amplicons* em diferentes laboratórios de virologia e genética localizados em Manaus (FMT, UFAM e ILMD),

não se obteve resultados satisfatórios. Acreditamos que o insucesso nos resultados utilizando este protocolo, ocorreu por tratar-se de uma técnica não padronizada em relação à quantidade e concentração dos reagentes utilizados na RT-PCR, segundo o artigo publicado pelos autores.

Por isso, os resultados apresentados nesse trabalho são baseados na utilização de uma técnica padronizada para amostras humanas, por Bronzoni, et. a. (2005), adaptada para amostras de aves, onde foram utilizadas cepas de *Flavivirus* isoladas no Brasil para o desenho dos *primers* gênero-específicos (**Tabela 1**) e espécie-específicos (**Tabela 2**).

Neste estudo, os *Flavivirus* foram basicamente detectados por técnicas de biologia molecular que incluíram a amplificação genômica, diretamente do sangue total das aves silvestres, por RT-PCR.

A metodologia de RT-PCR seguida por *multiplex-nested-PCR* foi a escolhida para buscar por *Flavivirus* nas aves silvestres de diferentes locais e realmente, permitiu detectar estes vírus em 4,23% das espécies estudadas. Esta metodologia, desenvolvida por Bronzoni et al., 2005, utiliza primeiramente a RT-PCR para detectar todos os *Flavivirus*, para tanto, utilizando *primers* (*primers* sFG1 e cFG2, gênero-específicos) que amplificam parte do gene viral que codifica a proteína NS5. Dentre as sete proteínas não-estruturais dos *Flavivirus*, a NS5 é a maior, apresentando aproximadamente 980 aminoácidos, além de ser a mais conservada, devido, provavelmente, às suas funções de RNA polimerase RNA-dependente e metiltransferase, essenciais no processo replicativo viral. Fulop, et al. (1993), observaram que as regiões correspondentes aos *primers* sFG1 e cFG2, que foram usados no presente trabalho, eram conservadas nos 13 *Flavivirus* estudados. Segundo estes mesmos autores, os vírus avaliados para a escolha dos *primers* correspondiam a apenas 20% dos *Flavivirus* conhecidos, porém, eram representativos, já que pertenciam a grupos genotipicamente distintos. Em vista disso, sugerem que estas seqüências conservadas estejam presentes no genoma da maioria dos *Flavivirus*. A segunda parte do método de Bronzoni, et al. (2005), a *multiplex-nested-PCR* permite identificar *Flavivirus* a nível de espécie com base no tamanho do *amplicon*. Portanto, após a detecção gênero-específica por RT-PCR, passou-se à identificação de espécie com os *primers* espécie-específicos. Também, com o objetivo de diminuir tempo e custo de sucessivas reações de *nested-PCR*, nas quais cada amostra é testada frente a vários *primers*, Bronzoni, et al. (2005) desenvolveram uma *multiplex-nested-PCR*, combinando inicialmente os *primers* nDEN1, nDEN2, nDEN3 e nYF-243 e

posteriormente os outros 7 *primers* espécie-específicos. Em virtude da proximidade do tamanho dos produtos amplificados pelos *primers* espécie-específicos nSLE (~232pb) e nROC (~230pb), durante a *nested*-PCR, os mesmos eram utilizados em mixes separados, evitando assim, possíveis dúvidas na visualização dos *amplicons*.

Também, deve-se ressaltar no presente trabalho uma dificuldade importante encontrada e que se relacionou a perda substancial do escasso material contido nas amostras, que foi consumido, em algumas amostras em tentativas de isolamento viral em cultura celular (dados não mostrados) e durante o processo de purificação dos *amplicons* para sequenciamento. Ainda, a repetição destes procedimentos, contribuiu muito para o esgotamento destes materiais.

São escassos os trabalhos encontrados acerca dos potenciais vetores de arboviroses em regiões de savana amazônica. Silva, et.al. (2010) identificaram 5 espécies diferentes de *Culicoides spp.* (*Ceratopogonidea*), em zonas de praia em Alter do Chão. Outro trabalho realizado relativamente próximo a Santarém, em áreas impactadas no sudoeste do Pará, por Nunes, et.al. (2009), identificaram artrópodes hematófagos em dois municípios localizados na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém, capturando indivíduos pertencentes a 3 famílias: *Culicidae*, *Psychodidae* e *Ceratopogonidae*, sendo os gêneros *Culex spp.*, *Wyeomyia spp.*, *Coquillettidia spp.*, *Haemagogus spp.*, *Anopheles spp.*, *Mansonia spp.* e *Psorophora spp.*, os mais representativos, e o maior número de espécimes capturados durante a estação chuvosa.

Em surto de febre amarela no Brasil central 2000, Vasconcelos *et al.* (2001b) demonstraram que a maior transmissão de febre amarela foi associada com uma maior incidência de chuvas, dentre outros fatores interligados. Por outro lado, em estudos amazônicos, foi previamente demonstrado que ocorre maior densidade de mosquitos capturados durante o período de chuvas, pois ocorre formação de maior número de criadouros (DEGALLIER *et al.*, 1992b; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1992). Talvez esta situação não seja tão notável nas aves silvestres, visto a taxa de infecção de *Flavivirus* ter sido maior na seca (6,89%) em relação à cheia (3,33%), nas capturas *in-situ*. Quando são incluídas as amostras de cativeiro, as quais foram realizadas durante a estação chuvosa, esta diferença aumenta ainda mais: 6,89% na seca e 2,29% na cheia.

A maior parte dos resultados que sugerem positividade é proveniente de uma região de savana amazônica, próximo ao distrito de Alter do Chão, que é utilizada por aves migratórias como área de descanso durante os longos deslocamentos realizados, e,

onde foi capturado o maior número de indivíduos, representados, principalmente pela ordem *Passeriforme*. Sendo assim, estes resultados serão discutidos com maiores detalhes, visto o maior número de fatores eco-epidemiológico associados. Vale ressaltar que esta região apresenta-se como um local em potencial para o aumento de atividades antrópicas como ecoturismo, desmatamento e urbanização acelerada.

Sanaïotti e Cintra (2001) registraram 144 espécies de aves nas regiões de savana em Alter do Chão, entre elas, 13 espécies migratórias que utilizam a região em diferentes épocas do ano. Sete delas, *Piranga flava*, *Pandion haliaetus*, *Sirystes sibilator*, *Myiarchus swainsonii*, *Stelgidopteryx ruficollis*, *Falco femoralis* e *Dendroica striata*, foram vistas entre maio e novembro. Seis espécies, *Elaenia pawirostris*, *Hirundo rustica*, *Ictinea plumbea*, *Herpetotheres cachinnans*, *Tersina viridis* e *Tyrannus savana*, foram registradas durante a estação chuvosa, janeiro a junho. Entre as espécies migratórias, capturou-se 3 indivíduos da espécie *Myiarchus swainsoni* (migratória austral) durante as 2 expedições para Alter do Chão, entretanto apenas uma amostra apresentou *amplicon* de aproximadamente 550pb, o qual não é compatível com os alvos da técnica utilizada (BRONZONI, et.al., 2005), não apresentando resultados no sequenciamento. As espécies migrantes austrais migram sazonalmente e diferem das neárticas por migrarem distâncias menores (menos de 15% alcançam a Amazônia), serem dominadas por alguns grupos taxonômicos (tiranídeos, fringilídeos e anatídeos) e proporcionalmente haver um menor número de migrantes de altitudes elevadas. Cerca de um terço dos migrantes austrais são da família *Tyrannidae*, que domina o sistema de migração austral (CHESSER, 1994; ALVES, 2007).

Em cativeiro foram obtidas amostras de 3 indivíduos de *Dendrocygna autumnalis* (marreca asa-branca), que é uma espécie migratória regional (NUNES e TOMAS, 2004). Entretanto, não se observaram *amplicons* na eletroforese destas amostras. Apesar da ausência de positivos em aves migratórias, não se pode deixar de admitir a competência desses animais na difusão dos arbovírus, uma vez que, o seu poder de deslocamento tem sem dúvida um papel importante na propagação desses agentes infecciosos.

Distintas famílias de aves têm sido responsabilizadas como participantes dos ciclos de manutenção de um grande número de arbovírus que incidem na Amazônia brasileira como seus hospedeiros primários. As aves silvestres têm grande importância na epidemiologia dos vírus causadores de várias encefalites (VASCONCELOS *et al.*,

1991). Dessa forma, aves e mosquitos são os principais componentes do ciclo enzoótico dos vírus das encefalites equinas do leste e oeste (*Alphavirus*), do SLEV, do WNV e possivelmente do ROCV (*Flavivirus*) (PINHEIRO *et al.*, 1986). Mesmo se as aves não foram os primeiros vertebrados infectados por arbovírus, como foi suposto por MATTINGLY (1960), as suas capacidades de deslocamento tiveram sem dúvida um papel primordial na distribuição dos arbovírus associados (DEGALLIER *et al.*, 1992a).

No caso do WNV, por exemplo, as diferentes espécies de aves americanas apresentam grande variabilidade de susceptibilidade à infecção e também potenciais distintos de transmissão. Os passeriformes (pássaros cantores, rabos-de-palha e pardais), chadriiformes (aves de pernaltas), corujas e falconiformes desenvolvem níveis de viremia suficientes para infectar uma grande parcela dos mosquitos que realizam o repasto sangüíneo (KOMAR *et al.*, 2003b). Pombos, pica-paus, gansos, marrecos e patos não desenvolvem altos títulos de vírus no sangue e assim não infectam eficientemente os mosquitos hematófagos. Os corvídeos (corvos e gralhas) possuem um papel epidemiologicamente importante, pois são muito susceptíveis ao agente e desenvolvem altos níveis de viremia (LaDEAU *et al.*, 2007; KOMAR, 2003a; b). Estes animais também apresentam alta morbidade e mortalidade, o que os atribui um importante papel de sentinelas naturais da infecção (KOMAR, 2003b).

Estudos realizados por Degallier *et al.* (1992a), o ILHV apresentou uma taxa de infecção de 0,09% em aves, agrupando-se os resultados positivos da virologia e sorologia. O presente estudo sugere uma taxa de infecção de 4,23% para ILHV, sendo maior em aves de vida livre (5,08%) em relação às amostras de cativeiro (3,33%).

A espécie *Dendroplex picus* acompanha bandos mistos de aves insetívoras, geralmente no sub-bosque e no estrato médio, escala troncos e ramos horizontais em busca de insetos e outros invertebrados (SICK, 1997). Entre os cinco indivíduos dessa espécie capturados em Alter do Chão durante a seca e a cheia, a amostra A-58 apresentou *amplicon* compatível com o tamanho esperado (~474) para ILHV na nested-PCR espécie-específica.

A espécie *Nystalus Maculatus* apresentou a maior prevalência de *Flavivirus* (3 positivos em 5 capturados) entre as espécies positivas. Esta espécie alimenta-se principalmente de artrópodes no estrato baixo da savana, em folhagens ou no solo, além de escavar ninhos em barrancos (SIGRIST, 2009). Dessa forma, o comportamento alimentar e reprodutivo desta espécie podem influenciar uma maior susceptibilidade à

infecção por ILHV, ficando expostos aos vetores que ocorrem com abundância no estrato baixo da savana conforme observado durante as capturas realizadas na savana de Alter do Chão.

A espécie *Tolmomyias flaviventris* é encontrada solitária ou raramente aos pares, alimenta-se basicamente de insetos, forrageia no estrato médio e alto nas matas, no cerrado e nas restingas (SIGRIST, 2009). Neste trabalho, foram capturados 2 indivíduos desta espécie na coleta *in-situ* durante a estação chuvosa, sendo que a amostra A-111, apresentou *amplicon* compatível com o tamanho esperado para ILHV (~474pb) durante a nested-PCR, espécie-específica.

Encontrou-se *amplicon* sugestivo de ILHV em um indivíduo de *Elaenia flavogaster*, considerada a espécie mais comum e mais abundante entre os membros desse gênero, no Brasil, durante as coletas no período de seca em Alter do Chão. Esta espécie habita orla de capoeiras, campos de cultura com árvores e quintais (SICK, 1997). São aves muito ativas, movimentam-se por áreas abertas e copas das matas, buscando invertebrados e pequenos frutos (SIGRIST, 2009). Favorecida por habitats perturbados é uma espécie importante do ponto de vista de saúde pública, pela proximidade com a espécie humana, provavelmente susceptível a vetores em comum.

Portanto, sugere-se que o ILHV seja um vírus bastante versátil em regiões de savana amazônica infectando espécies de aves silvestres que ocorrem em diferentes estratos da vegetação (baixo, médio e alto), assim como demonstrado por Degallier, et.al. (1992a), em estudo realizado em 18 localidades diferentes da Amazônia.

Entre as amostras de cativeiro, *Amazona festiva* foi a única espécie que apresentou *amplicon* compatível com o tamanho esperado (~474pb) para ILHV. Poucos casos de infecção por *Flavivirus* em psittacídeos foram encontrados na literatura científica. Nos Estados Unidos, casos fatais de infecção por WNV foram relatados em 12 espécies diferentes de psittacídeos por Komar (2003a), entre elas *Amazona viridigenalis*. No Brasil, Degallier, et.al. (1992a) obteve resultado negativo para diferentes famílias de arbovírus, utilizando métodos sorológicos e virológicos em amostras de 2 indivíduos de *Amazona amazonica*.

No que refere ao ILHV cuja identificação foi demonstrada nesse trabalho, Pinheiro e colaboradores (1986) fizeram referência a sua ampla distribuição na América Central e na América do Sul e, que o mesmo tem um ciclo tipicamente do tipo aves-mosquitos. Entretanto, vários outros vertebrados foram encontrados como portadores de

anticorpos ou dos quais foi isolado esse arbovírus, tais como roedores, marsupiais, edentados (KARABASTOS, 1985), morcegos (HERVÉ *et al.*, 1986), macacos (DEGALLIER *et al.*, 1989). Neste estudo esse vírus foi detectado em quatro espécies de aves silvestres de vida livre (*Nystalus maculatus*, *Tolmomyias flaviventris*, *Elaenia flavogaster* e *Dendroplex picus*) e uma de cativeiro (*Amazona festiva*).

Entre as espécies de vida livre em que foram detectados *amplicons* sugestivos do ILHV, todas apresentam entre suas preferências alimentares, insetos, sugerindo a possibilidade de transmissão desse vírus pela ingestão de mosquitos infectados, por aves insetívoras, resultando em infecção e viremia, assim como foi demonstrado experimentalmente, por Komar (2003b), com o WNV, que por sua vez é a espécie de *Flavivirus* que foi mais intensamente estudada em aves silvestres.

A ausência de *amplicons* encontrados pela utilização dos *primers* espécie-específicos nDEN1, nDEN2, nDEN3 e nYF-243 durante a *multiplex-nested-PCR* é esperada, visto a ausência de isolamentos virais dos diferentes sorotipos de dengue em aves silvestres. Thoisy *et al.* (2009) demonstraram através de métodos moleculares, pela primeira vez, mamíferos silvestres (morcegos, roedores e marsupiais) infectados pelos quatro sorotipos de dengue na Guiana Francesa. Em relação à febre amarela, apesar de seus principais reservatórios silvestres serem primatas, recentemente Cruz *et al.* (2009), identificou anticorpos inibidores da hemaglutinação em duas espécies de aves silvestres (*Geotrygon Montana* e *Thamnophilus aethiops*) na Amazônia brasileira. No entanto, nenhuma amostra analisada neste estudo apresentou *amplicon* compatível com o YFV.

A ausência de *amplicons* sugestivos para os vírus SLEV, ROCV e BSQV entre as 189 amostras analisadas não descarta a possibilidade da circulação destes vírus nos locais estudados, pois diferentes autores têm encontrado evidências sorológicas da circulação destes vírus na Amazônia (DEGALLIER *et al.*, 1992a; FERREIRA *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2009).

Além disso, para que os arbovírus sejam detectáveis a partir da técnica de RT-PCR, as aves precisam estar na fase virêmica, e este período em aves é caracteristicamente curto, durando cerca de três dias (MONATH *et al.*, 1978).

Os resultados apresentados neste estudo são de grande importância, pela relevância e pioneirismo, considerando tanto a ausência de estudos dessa natureza em regiões de savana amazônica, como na utilização de métodos moleculares (RT-PCR) para identificação de arbovírus em aves silvestres. Assim, a pesquisa sugere a circulação

de ILHV nas áreas estudadas, indicando que eles se mantêm ativamente circulantes nos locais de captura *in-situ* e *ex-situ*. É importante ressaltar que esta espécie de *Flavivirus* identificada nas aves silvestres, é patogênica para humanos, apresenta intenso neurotropismo, causando doença febril aguda com cefaléia intensa, calafrios, mialgia fraqueza, inclusive com três casos de meningoencefalite leve já descritos (FIGUEIREDO, 2000).

Entretanto, no presente trabalho, apesar de termos encontrado produto sugestivo de genoma de *Flavivirus* em 7 amostras de aves, após diversas tentativas de sequenciamento, não foram encontradas sequências compatíveis com nenhuma espécie viral. Justificamos este rendimento dos sequenciamentos pelo múltiplo descongelamento das amostras, o que deve ter permitido a ação de RNAses e de lisozimas inibidoras da polimerase as quais teriam degradado o material genômico viral. Por outro lado, a ação de RNAses degradando genoma viral causaria os rastros de material genético que foram observados em alguns géis de agarose, sugerindo a degradação do material e perda das amostras.

Com efeito, estudos sobre a epidemiologia destes vírus, principalmente em relação à identificação de novos hospedeiros (vertebrados e invertebrados), e estudos entomológicos acerca das preferências tróficas dos vetores seriam necessários para avaliar o papel relativo de cada um desses hospedeiros vertebrados nos diversos ciclos de manutenção dessas importantes zoonoses. Para isso, existe a necessidade de estudos integrados com especialistas de diferentes áreas (entomologistas, virologistas, veterinários, médicos, ornitólogos, mastozoólogos) sobre os aspectos eco-epidemiológico relacionados às arboviroses, principalmente em locais onde ocorre atividade antrópica intensa e desordenada na Amazônia brasileira.

Finalmente, o trabalho fornece métodos rápidos, simples e eficientes para a detecção e identificação de *Flavivirus*. Estes métodos, aliados aos métodos convencionais existentes, vêm contribuir melhorando a eficiência do diagnóstico e do monitoramento das arboviroses brasileiras.

8. Conclusão

Amplificaram-se genomas sugestivos do vírus Ilhéus em 7 (4,23%) das 189 amostras estudadas.

A metodologia de detecção gênero-específica de *Flavivirus* por RT-PCR, seguida de multiplex-*nested*-PCR espécie-específica mostrou-se adequada ao estudo com aves silvestres.

O presente estudo sugere a circulação enzoótica do ILHV em distintas localidades na Amazônia brasileira, entre os anos de 2009 e 2010, reforçando o papel das aves silvestres como hospedeiro no ciclo de transmissão desta zoonose.

As evidências virológicas da presença do arbovírus ILHV nas regiões estudadas, aliada às demais condições existentes no país para disseminação viral, constituem um problema de saúde pública que deve ser motivo de ações preventivas por parte das autoridades de saúde.

9. Referências Bibliográficas

ALVES, M. S. Sistemas de migrações de aves em ambientes terrestres no Brasil: exemplos, lacunas e propostas para o avanço do conhecimento. **Revista Brasileira de Ornitologia**. v.15, 231-238, 2007.

ANDERSON, J.F.; ANDREADIS, T.G.; MAIN, A.J.; KILINE, D.L. Prevalence of west Nile vírus in tree canopy-inhabiting *Culex pipiens* and associated mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.7, p.112-119, 2004.

BALEOTTI, F.G.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v 98,p 379-382, 2003.

BATISTA, W.C. **Mapeamento das arboviroses no Estado de Rondônia**. 110 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BEATY, B.; CALISHER, C.H. & SHOPE, R.E. - Arboviruses. In: SCHMIDT, N.J.; EMMONS, E., ed. Diagnostic procedures for viral, chlamydial and rickettsial infections. 6 ed. Washington, **American Public Health Association**, p.797-855, 1995.

BRÉS P. Impact of arboviruses on human and animal helath. In: Monath TP. **The Arboviruses: Epidemiology and ecology**. V.1. Florida: CRC Press Inc, p. 1-18, 1998.

BRONZONI, R.V.M., NOGUEIRA, R.M.R., NUNES, M., FIGUEIREDO, L.T.M.. Detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses by multiplex RT-PCR, **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p 696-702, 2005.

CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and Taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U. S. A. and Brazil In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS da ROSA, J.F.S, (Eds). **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém; p. 32-41, 1998.

CHESSER, R. T. Migration in South America: an overview of the austral system. **Bird Conservation International**. v.4: p. 91-107, 1994.

COIMBRA, T. L.; NASSAR, E. S.; NAGAMORI, A. H.; FERREIRA, J. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M. Iguape, a newly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil, **Intervirolgy**, v. 36, p. 144-152, 1993.

Comitê Brasileiro de Registro Ornitológico. **Lista das Aves Brasileiras**. Disponível em <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

CRUZ, A.C.; PRAZERES, A.S.; GAMA, E.C.; LIMA, M.F.; AZEVEDO, R.S.; CASSEB, L.M.; NUNES NETO, J.P.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.25: p.2517-2523, 2009.

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; HERVÉ, J. P.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; SÁ, FILHO, G. C.; PINHEIRO, F. P. Modifications of arbovirus ecoepidemiology in Tucuruí, Pará Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam. In: UREN, M.F.; BLOK, J.; MANDEMON, L. H. Arbovirus Research in Australia Proceedings Fifth Symposium, August 28 September, Brisbane, Australia. Eds. CSIRO **Tropical Animal Science**, p.124- 135, 1989.

DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SILVA, J.M.C., RODRIGUES, SG., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., SILVA, G.P., SILVA, R.P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**, Série: Zoologia 1992; v.8, n.1, p.69-111, 1992a.

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; HERVE, J. P.; SÁ FILHO, G. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; RODRIGUES, S. G. Modifications of arbovirus transmission in Brazilian Amazonia. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.44, p.124-135, 1992b.

DUNN, E. F.; PRITLOVE, D. C.; ELLIOTT, R. M. The S genome segment of Batai, Cachê Valley Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway bunyaviruses: sequence determination and analysis. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 597-608, 1994.

FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO I.M.; MARTI, A.T.; SOUZA, L.T.M.; IVERSSON, L.B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil: Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1994; v.36, n.3, p.265-274, 1994.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, p.1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.2, Mar-Apr, p.224-9. 2007.

FULOP, L.; BARRETT, A.D.T.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R.W. Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene

sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.

HERVÉ, J. P.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Arboviroses: aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, Belém: Ed. **Fundação Serviços de Saúde Pública**. v.1,p. 409- 437, 1986.

IVERSSON, L.B.. Rocio Encephalitis. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**., MONATH, T.P. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. vol. 4. p. 77–92. 1989.

IVERSSON, L.B.; TIRIBA, A.C. Encefalite por arbovírus Rocio. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, Atheneu, São Paulo, p.233-239, 1997.

KARABASTOS N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. **American Society of Tropical Medicine & Hygiene**; 3 ed. San Antonio: 1985.

KOMAR, N. West Nile virus: epidemiology, and ecology in North America. **Advances in Virus Research**, v.61, p.185- 234, 2003a.

KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S.; NEMETH, N. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.76-78, 2003b.

KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R; KARABATSOS, N.; CROPP,C.B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*.. **Journal of Virological Methods**.v 72, p.73-83, 1998.

LaDEAU, L. S.; KILPATRICK, M.A, MARRA, P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. **Nature**, v.447, p.710-713, 2007.

LINDEBACH, B.D.; RICE, C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fundamental Virology**. 4.ed. Philadelphia: LW&W, p.589-640, 2001.

LOPES, O. S.; SACCHETTA L. A.; COIMBRA T. L. M.; PINTO G.H.; GLASSER C.M. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil.II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. **American Journal of Epidemiology** 108: p.394–401. 1978.

LORD, R.D., CALISHER, C.H.; CHAPPEL, W.A.; METZGER, W.R.; FISHER G.W. Urban St. Louis encephalitis surveillance through wild birds. **American Journal of Epidemiology**. p.360–363, 1974.

MAHER-STURGESS, S. L.; FORRESTER, N. L.; WAYPER, P. J.; GOULD, E. A.; HALL, R. A.; BARNARD, R. T.; GIBBS, M. J. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. **Virology Journal** .p.5:16, 2008.

MATTINGLY, P. F. Symposium on the evolution of arborvirus diseases. II. Ecological aspects of the evolution of mosquito-borne virus diseases. **Review Society Tropical Medicine Hygiene**, v.54, p.97-112, 1960.

McLEAN, R. G; UBICO S. R.. Arboviruses in Birds. THOMAS, N. J., HUNTER, D.B., ATKINSON C.T. In: **Infectious Diseases of Wild Birds**. Blackwell Oxford, England. p.17–62, 2007.

MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; BROOKS, T. M.; PILGRIM, J. D.; KONSTANT, W. R., FONSECA, G.A.B.; KORMOS, C. Wilderness and biodiversity

conservation. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.100, p.10309-10313, 2003.

MONATH, T. P.; KEMP, G. E.; CROPP, C. B. & BOWEN, G. S. - Experimental infection of house, sparrows (*Passer domesticus*) with Rocio virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v.27, p.1251-1254, 1978.

MONDINI, A.; CARDEAL, I. L. S.; LAZARO, E.; NUNESs, S. H.; MOREIRA, C. B.; RAHAL, P.; MAIA, I. L.; FRANCO, C.; GONGORA, D. V. N.. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, p.176–178, 2007.

NATHANSON, N. Epidemiology. In: KNIPE, D. M.; HOLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**, v.1, p.424-446, 2007

NUNES, A.P.; TOMAS, W.M. Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: Caracterização e conservação. **Série Documentos, EMBRAPA-CPAP**, v.62, p.1-29, 2004.

NUNES M. R. T., BARBOSA T. F. S., CASSEB L. M. N., NUNES NETO J. P., SEGURA N. O., MONTEIRO H. A. O. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.25, n.12, p. 2583-2602 2009.

PAUVOLID-CORREA, A; MORALES, M. A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; COUTO-LIMA D; CAMPOS, Z. NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.; NOGUEIRA, R.M.T.; SCHATZMAYR, H.G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do. Instituto. Oswaldo Cruz** . v.106, n.4, p. 467-474, 2011.

PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R. M.; KAADEN, O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 709-718, 1997.

PHALEN, D.N.; DAHLHAUSEN, B. West Nile Virus. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v.13, p.67-78, 2004.

PEREIRA, L.E.; SUZUKI, A.; COIMBRA, T.L.M.; SOUZA, R.P.; CHAMELET, E.L.B. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulea* e *Molothrus bonariensis*). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n.2, p.119-123, 2001.

PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., FREITAS, R. B., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses: aspectos Clínico-epidemiológicos. In: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Ed. **Fundação Serviços de Saúde Pública**, Belém, 1: p.375-408. 1986.

ROSELEM, R. **O impacto do desmatamento no ciclo hidrológico: um estudo de caso para a rodovia Cuiabá-Santarém**. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2005.

SANAIOTTI, T. M.; CINTRA, R. Breeding and migrating birds in an Amazonian savanna. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, n. 1, p.23-32. 2001.

SÁNCHEZ-SECO, M.; ROSARIO, D.; QUIROZ, E.; GUZMÁN, G.; TENORIO, A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 153-161, 2001.

SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J.; JOUAN, A.; DEBRIELI, D.A.; STOLL, F.; GARIN, D. Comparison of flaviviruses universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested RT-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p.1922-1927, 2001.

SICK, H. **Birds in Brazil: A natural history**. Princeton, EUA University Press. Princeton, p. 570, 1993.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro, Ed. Nova Fronteira. 1997

SIGRIST, T. **Avifauna brasileira: guia de campo** Avis Brasilis. São Paulo: Avis Brasilis, v.2, 1080, 2009.

SILVA, F.D.F.; OKADA, Y.; FELIPPE-BAUER, M.L. *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) de la Villa de Alter do Chão, Santarém, Estado de Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v.1, n.3, p:69-74, 2010.

STOLTZ, D. F.; J.W. FITZPATRICK; T.A. PARKER III & D.K. MOSKOVITS.. **Neotropical birds: ecology and conservation**. Chicago, The University of Chicago Press,p 481, 1996.

THOISY, B.; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JOTDAN, J.; COLÓN, C., MAUFFREY, J.; DELAVAL, M.; CATZEFLIS, F.; KAZANJI, M.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; SETIÉN, A.A.; DEPARIS, X.; LAVERGNE, A. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector Borne Zoonotic Diseases**. v.9, p.157-170, 2009.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; FREITAS, E.N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P. Epidemiologia do vírus da encefalite de Saint Louis na Amazônia.. **Revista da FSESP**. v.25, p. 73-80, 1980.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., HERVÉ, J-P., VASCONCELOS, P. F. C., DÉGALLIER, N., RODRIGUES, S. G. Arboviruses in Serra Norte, Carajás region, Pará, Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44(2/3), p.158-161. 1992.

TRAVASSOS da ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHEIRO, F.P.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; DIAS, L.B.; CRUZI, A.C.R.. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts and their pathology for man. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A, VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS da ROSA, J.F.S, (Eds). **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém; p. 19-31, 1998.

TURREL, M.J.; O'GUINN, M.L.; JONES, J.W., SARDELIS, M.R., DOHM, D.J.; WATTS, D.M.; FERNADEZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; GUZMAN, H.; TESH, R.; ROSSI, C.A.; LUDWIG, G.V.; MANGIAFICO, J.A.; KONDIG, J.; WASIELOSKI, L.P.; PECOR, J.; ZYZAK, M.; SCHOELER G.; MORES, C.N.; CALAMPA, C.; LEE, J.S.; KLEIN, T.A. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera:Culicidae) collected in the Amazon basin region of Peru. **Journal of Medical Entomology**. v.42, n.5, p.891-898, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v.33, n.6, p.465-476, 1991

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., RODRIGUES, S.G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C, TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of arbovirology in Brazil and neighbouring Countries.** (eds.). Instituto Evandro Chagas Belém:, p.72- 99, 1998.

VASCONCELOS, P. F. C., Emergence of arboviruses in Brazilian Amazon region. **Virus Review and Research**, v.4: p.48-49, 1999.

VASCONCELOS, P.F.C, TRAVASSOS da ROSA, A.P.A; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS da ROSA, E. S.; DÉGALLIER, N.;TRAVASSOS da ROSA, J.F.S.. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 17 (suplemento): p.155-164, 2001a.

VASCONCELOS, P. F. C.; COSTA, Z. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LUNA, E.; RODRIGUES, S. G.; BARROS, V. L. R. S.; DIAS, J. P.; OLIVA, O.; VASCONCELOS, H. B.; OLIVEIRA, R. C.; SOUZA, M. R. S.; SILVA JR, J. B.; CRUZ, A. C. R.; MARTINS, E. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. An epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. **Journal of Medical Virology**, v 65, n.3, p.598-604, 2001b.

ANEXOS

ANEXO I. Lista das espécies de aves capturadas no período de seca em Alter do Chão (*in-situ*)

	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
A-01	Ramphocelus carbo	25g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-02	Ramphocelus carbo	26g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-03	Ramphocelus carbo	25g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-04	Ramphocelus carbo	23g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-05	Elaenia flavogaster	26g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-06	Notharchus tectus	30g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-07	Elaenia cristata	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-08	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-09	Formicivora rufa	12g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-10	Elaenia cristata	21g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-11	Ramphocelus carbo	24g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-12	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-13	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-14	Elaenia cristata	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-15	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-16	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-17	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-18	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-19	Tachyphonus rufus	36g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-20	Elaenia flavogaster	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-21	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-22	Lepidocolaptes angustirostris	34g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-23	Turdus leucomelas	65g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-24	Tachyphonus rufus	36g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-25	Lepidocolaptes angustirostris	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-26	Phaeomyias murina	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-27	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-28	Tangara cayana	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-29	Elaenia cristata	18g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-30	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-31	Phaeomyias murina	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-32	Myiarchus swainsoni	20g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-33	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-34	Myiarchus swainsoni	20g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-35	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-36	Elaenia flavogaster	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-37	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão

ANEXO I. (continuação).

		g	Outubro de 2009	Alter do Chão
	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
A-39	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-40	Cantorchilus leucotis	18g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-41	Nystalus maculatus	37g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-42	Nystalus maculatus	37g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-43	Stelgidopteryx ruficollis	15g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-44	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-45	Formicivora grisea	11g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-46	Pachyrampus rufus	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-47	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-48	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-49	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-50	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-51	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-52	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-53	Elaenia flavogaster	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-54	Elaenia flavogaster	19g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-55	Elaenia cristata	17g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-56	Troglodytes musculus	12g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-57	Myiarchus tyrannulus	28g	Outubro de 2009	Alter do Chão
A-58	Dendroplex picus	39g	Outubro de 2009	Alter do Chão

ANEXO II. Lista das espécies de aves capturadas no período de cheia em Alter do Chão (*in-situ*)

	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
A-60	<i>Elaenia cristata</i>	18g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-61	<i>Elaenia cristata</i>	17g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-62	<i>Hylophilus pectoralis</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-63	<i>Schistochlamys melanopis</i>	32g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-64	<i>Elaenia cristata</i>	15g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-65	<i>Elaenia cristata</i>	18g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-66	<i>Hylophilus pectoralis</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-67	<i>Formicivora grisea</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-68	<i>Hylophilus pectoralis</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-69	<i>Schistochlamys melanopis</i>	33g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-70	<i>Chloroceryle aenea</i>	13g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-71	<i>Elaenia cristata</i>	19g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-72	<i>Elaenia flavogaster</i>	21g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-73	<i>Thamnophilus punctatus</i>	21g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-74	<i>Tachyphonus rufus</i>	36g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-75	<i>Tangara cayana</i>	17g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-76	<i>Hemitriccus striaticollis</i>	8g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-77	<i>Myarchus tyrannulus</i>	29g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-78	<i>Formicivora grisea</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-79	<i>Camptostoma obsoletum</i>	7g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-80	<i>Nystalus maculatus</i>	35g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-81	<i>Thamnophilus punctatus</i>	22g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-82	<i>Elaenia flavogaster</i>	18g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-83	<i>Dendroplex picus</i>	41g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-84	<i>Thamnophilus punctatus</i>	22g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-85	<i>Elaenia cristata</i>	18g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-86	<i>Manacus manacus</i>	13g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-87	<i>Formicivora grisea</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-88	<i>Formicivora grisea</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-89	<i>Hylophilus pectoralis</i>	10g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-90	<i>Hylophilus pectoralis</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-91	<i>Hylophilus semicinereus</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-92	<i>Formicivora grisea</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-93	<i>Nystalus maculatus</i>	36g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-94	<i>Elaenia cristata</i>	16g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-95	<i>Chiroxiphia pareola</i>	19g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-96	<i>Dendroplex picus</i>	37g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-97	<i>Formicivora grisea</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão

ANEXO II. (continuação)			Maio de 2010	Alter do Chão
	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
A-99	<i>Hylophilus pectoralis</i>	13g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-100	<i>Hylophilus pectoralis</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-101	<i>Myiarchus swainsoni</i>	20g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-102	<i>Dendroplex picus</i>	38g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-103	<i>Manacus manacus</i>	13g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-104	<i>Manacus manacus</i>	13g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-105	<i>Manacus manacus</i>	14g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-106	<i>Thamnophilus punctatus</i>	19g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-107	<i>Hylophilus pectoralis</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-108	<i>Formicivora grisea</i>	10g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-109	<i>Elaenia flavogaster</i>	20g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-110	<i>Tolmomyias flaviventris</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-111	<i>Tolmomyias flaviventris</i>	12g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-112	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	26g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-113	<i>Thamnophilus punctatus</i>	21g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-114	<i>Nystalus maculatus</i>	40g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-115	<i>Schistochlamys melanopsis</i>	32g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-116	<i>Xenops minutus</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-117	<i>Xenops minutus</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-118	<i>Thamnophilus punctatus</i>	21g	Maio de 2010	Alter do Chão
A-119	<i>Formicivora grisea</i>	11g	Maio de 2010	Alter do Chão

ANEXO III. Lista das espécies de aves coletadas no período de cheia no Refúgio de Vida Silvestre Sauim-Castanheiras (RVSSC).

	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
R-01	<i>Athene cucularia</i>	160g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-02	<i>Asio clamator</i>	500g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-03	<i>Athene cucularia</i>	170g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-04	<i>Rupornis magnirostris</i>	330g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-05	<i>Rupornis magnirostris</i>	320g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-06	<i>Rupornis magnirostris</i>	330g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-07	<i>Rupornis magnirostris</i>	300g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-08	<i>Aratinga leucophthalma</i>	130g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-09	<i>Milvago chimachima</i>	340g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-10	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	130g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-11	<i>Pionus menstruus</i>	240g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-12	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	210g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-13	<i>Aratinga leucophthalma</i>	150g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-14	<i>Amazona amazonica</i>	300g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-15	<i>Amazona amazonica</i>	390g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-16	<i>Amazona amazonica</i>	200g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-17	<i>Aratinga leucophthalma</i>	100g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-18	<i>Ara ararauna</i>	920g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-19	<i>Anhima cornuta</i>	3,2kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-20	<i>Butorides striates</i>	170g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-21	<i>Amazona amazonica</i>	360g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-22	<i>Amazona festiva</i>	390g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-23	<i>Amazona amazonica</i>	270g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-24	<i>Amazona festiva</i>	420g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-25	<i>Amazona festiva</i>	480g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-26	<i>Amazona festiva</i>	330g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-27	<i>Amazona festiva</i>	380g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-28	<i>Amazona festiva</i>	320g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-29	<i>Amazona amazonica</i>	290g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-30	<i>Amazona festiva</i>	450g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-31	<i>Amazona amazonica</i>	400g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-32	<i>Amazona amazonica</i>	390g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-33	<i>Amazona amazonica</i>	330g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-34	<i>Amazona festiva</i>	380g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-35	<i>Amazona amazonica</i>	300g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-36	<i>Amazona festiva</i>	320g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-37	<i>Amazona festiva</i>	350g	Abril/Maio de 2010	RVSSC

ANEXO III. (continuação)		30g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
	Espécie	Peso	Período de coleta	Local
R-39	<i>Amazona festiva</i>	370g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-40	<i>Amazona amazonica</i>	350g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-41	<i>Aratinga leucophthalma</i>	180g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-42	<i>Amazona festiva</i>	410g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-43	<i>Amazona festiva</i>	290g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-44	<i>Milvago chimachima</i>	290g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-45	<i>Ara ararauna</i>	1,1Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-46	<i>Ara ararauna</i>	1,15Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-47	<i>Ara ararauna</i>	1,05Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-48	<i>Ara ararauna</i>	1,2Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-49	<i>Ara ararauna</i>	1Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-50	<i>Ara macao</i>	1,05Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-51	<i>Ara ararauna</i>	950g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-52	<i>Ara ararauna</i>	1,05Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-53	<i>Ara ararauna</i>	1,250Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-54	<i>Ara ararauna</i>	1,050Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-55	<i>Brotogeris sanctithomae</i>	45g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-56	<i>Brotogeris sanctithomae</i>	48g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-57	<i>Brotogeris sanctithomae</i>	48g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-58	<i>Megascops choliba</i>	85g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-59	<i>Geotrygon montana</i>	93g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-60	<i>Orthopsittaca manilata</i>	300g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-61	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	610g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-62	<i>Butorides striates</i>	140g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-63	<i>Coragyps atratus</i>	1,1Kg	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-64	<i>Coragyps atratus</i>	980g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-65	<i>Coragyps atratus</i>	950g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-66	<i>Geotrygon montana</i>	92g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-67	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	580g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-68	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	610g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-69	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	630g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-70	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	370g	Abril/Maio de 2010	RVSSC
R-71	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	620g	Abril/Maio de 2010	RVSSC

ANEXO IV. Lista das espécies de aves capturadas *in-situ* e *ex-situ*, com seu respectivo número de indivíduos, ordem e família.

Espécie	Nome Comum	Família	Ordem	Total
<i>Ramphocelus carbo</i>	Pipira vermelha	Thraupidae	Passeriformes	5
<i>Elaenia flavogaster</i>	Guaracava de barriga amarela	Tyrannidae	Passeriformes	8
<i>Elaenia cristata</i>	Guaracava de topete uniforme	Tyrannidae	Passeriformes	23
<i>Formicivora rufa</i>	Papa formiga vermelho	Thamnophilidae	Passeriformes	1
<i>Formicivora grisea</i>	Papa formiga pardo	Thamnophilidae	Passeriformes	15
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Maria cavaleira	Tyrannidae	Passeriformes	8
<i>Tachyphonus rufus</i>	Pipira preta	Thraupidae	Passeriformes	3
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Arapaçu de cerrado	Dendrocolaptidae	Passeriformes	2
<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá barranco	Turdidae	Passeriformes	1
<i>Phaeomyias murina</i>	Bagageiro	Tyrannidae	Passeriformes	2
<i>Tangara cayana</i>	Saíra amarela	Thraupidae	Passeriformes	2
<i>Myiarchus swainsoni</i>	Irré	Tyrannidae	Passeriformes	3
<i>Cantorchilus leucotis</i>	Garrinchão-de-barriga-vermelha	Troglodytidae	Passeriformes	1
<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Andorinha serradora	Hirundinidae	Passeriformes	1
<i>Pachyrhamphus rufus</i>	Caneleiro cinzento	Tityridae	Passeriformes	1
<i>Troglodytes musculus</i>	Corruíra	Troglodytidae	Passeriformes	1
<i>Dendroplex picus</i>	Arapaçu-de-bico-branco	Dendrocolaptidae	Passeriformes	5
<i>Schistochlamys melanopis</i>	Sanhaçu de coleira	Thraupidae	Passeriformes	3
<i>Hylophilus semicinereus</i>	Verdinho da várzea	Vireonidae	Passeriformes	1
<i>Camptostoma obsoletum</i>	Risadinha	Tyrannidae	Passeriformes	1
<i>Hemitriccus striaticollis</i>	Sebinho rajado amarelo	Rhynchocyclidae	Passeriformes	1
<i>Chiroxiphia pareola</i>	Tangará falso	Pipridae	Passeriformes	1
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	Bico chato amarelo	Rhynchocyclidae	Passeriformes	2
<i>Manacus manacus</i>	Rendeira	Pipridae	Passeriformes	4
<i>Xenops minutus</i>	Bico virado miúdo	Furnariidae	Passeriformes	2
<i>Hylophilus pectoralis</i>	Vite vite de cabeça amarela	Vireonidae	Passeriformes	8
<i>Thamnophilus punctatus</i>	Choca bate cabo	Thamnophilidae	Passeriformes	6
<i>Chloroceryle aenea</i>	Martinho	Alcedinidae	Coraciiformes	1
<i>Notharchus tectus</i>	Macuru pintado	Bucconidae	Galbuliformes	1
<i>Nystalus maculatus</i>	João bobo	Bucconidae	Galbuliformes	5
<i>Athene cunicularia</i>	Coruja buraqueira	Strigidae	Strigiformes	2
<i>Asio clamator</i>	Coruja orelhuda	Strigidae	Strigiformes	1
<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião carijó	Accipitridae	Accipitriformes	4
<i>Aratinga leucophthalma</i>	Periquitão maracanã	Psittacidae	Psittaciformes	4
<i>Milvago chimachima</i>	Carrapateiro	Falconidae	Falconiformes	2
<i>Graydidascalus brachyurus</i>	Curica verde	Psittacidae	Psittaciformes	2
<i>Pionus menstruus</i>	Maitaca de cabeça azul	Psittacidae	Psittaciformes	1

ANEXO IV. (continuação)		o mangue	Psittacidae	Psittaciformes	11
Espécie	Nome Comum	Família	Ordem	Total	
<i>Anhima cornuta</i>	Anhuma	Anhimidae	Anseriformes	1	
<i>Ara ararauna</i>	Arara canindé	Psittacidae	Psittaciformes	10	
<i>Butorides striata</i>	Socozinho	Ardeidae	Pelicaniformes	2	
<i>Amazona festiva</i>	Papagaio da várzea	Psittacidae	Psittaciformes	14	
<i>Brotogeris sanctithomae</i>	Periquito testinha	Psittacidae	Psittaciformes	3	
<i>Megascops choliba</i>	Corujinha do mato	Strigidae	Strigiformes	1	
<i>Geotrygon Montana</i>	Pariri	Columbidae	Columbiformes	2	
<i>Orthopsittaca manilata</i>	Maracanã do buriti	Psittacidae	Psittaciformes	1	
<i>Pulsatrix perspicillata</i>	Murucututu	Strigidae	Strigiformes	3	
<i>Coragyps atratus</i>	Urubu de cabeça preta	Cathartidae	Cathartiformes	3	
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	Asa branca	Anatidae	Anseriformes	3	
<i>Ara maçã</i>	Arara vermelha ou Araracanga	Psittacidae	Psittaciformes	1	
					Total= 189

ANEXO V



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21722-1	Data da Emissão: 24/09/2009 09:20
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Samuel Franco Lopes	CPF: 045.500.579-63
Título do Projeto: Avaliação sorológica de aves migratórias e residentes da Amazônia Central para detecção do vírus da febre do nilo ocidental	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas de campo Reman	09/2009	09/2009
2	Coletas de campo Alter do Chão	10/2009	10/2009

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	TANIA MARGARETE SANAIOTTI	Omitóloga	062.336.768-86	12952978 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MANAUS	AM	CETAS - NUFAS	Fora de UC
2	MANAUS	AM	Reman - Refinaria de Manaus	Fora de UC
3	SANTAREM	PA	alter do chão	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Passeriformes, Strigiformes, Falconiformes
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Passeriformes, Strigiformes, Falconiformes

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue
---	----------------------------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).