



**UFAM**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
BÁSICA E APLICADA**

**Soroprevalência do vírus *Mayaro* em Manaus e em Coari**

Mestranda: Nadielle Castro Pereira

Orientador: Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani

MANAUS – AM  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
BÁSICA E APLICADA

NADIELLE CASTRO PEREIRA

**Soroprevalência do vírus *Mayaro* em Manaus e em Coari**

Orientador: Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do título de Mestre.

MANAUS – AM  
2017

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P436s Pereira, Nadielle Castro  
Soroprevalência do vírus Mayaro em Manaus e em Coari /  
Nadielle Castro Pereira. 2017  
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. vírus Mayaro. 2. Epidemiologia. 3. Amazonas. 4. Prevalência. I.  
Lalwani, Pritesh Jaychand II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título

NADIELLE CASTRO PEREIRA

**Soroprevalência do vírus *Mayaro* em Manaus e em Coari**

APROVADO EM:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani – Presidente  
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia

---

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

---

Dr.<sup>a</sup> Michele de Souza Bastos  
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT – HVD

MANAUS – AM  
2017

## DEDICATÓRIA

*Ao homem da minha vida, Robson, pelo apoio incondicional em todos os momentos, especialmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos trajetos.*

*Aos meus filhos, Gabriel e Kailo, que me apoiaram e tiveram paciência comigo durante meus estresses e cansaços.*

*A minha sogra, Isabel, que cuidou muito bem dos meus filhos durante minha ausência.*

*A minha pastora, Maria de Jesus Correa, que me auxiliou espiritualmente sempre que eu precisava.*

*A minha mãe, Carmencilvia, e minhas irmãs, Daniele, Adriele, Suziellen e Fabiele, que, mesmo de longe, ajudaram dando-me forças quando me sentia incapaz.*

*Aos meus amados sobrinhos, Lucas e Juliana, que me fazem sentir querida todas as vezes que eu os visito.*

*Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!*

## AGRADECIMENTOS

- ✚ Quero agradecer primeiramente ao senhor Jesus Cristo, que me deu forças, sabedoria, discernimento e capacitação durante toda a minha vida.
- ✚ Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pelo apoio estrutural e pela organização durante o meu Mestrado; em especial ao secretário do Programa, Edson Augusto, que é um profissional atencioso, dedicado e gentil.
- ✚ Ao meu orientador, Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, por seu apoio e paciência, além de sua dedicação, competência e especial atenção nos experimentos e nas sugestões, fatores que foram fundamentais para a conclusão do meu Mestrado.
- ✚ À professora Dr.<sup>a</sup> Jaila Dias Borges, que me instruiu durante o meu desenvolvimento na escrita científica.
- ✚ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro durante o meu Mestrado.
- ✚ A todos os professores do Programa PPGIBA, que de alguma forma contribuíram para minha formação.
- ✚ Aos colegas do laboratório de Infeccion Disease and Immunology – IDI –, do PPGIBA, pelo companheirismo que tiveram comigo desde o início dessa trajetória.
- ✚ Aos moradores do município de Coari, que me receberam e me apoiaram durante as coletas de dados.
- ✚ Aos meus familiares e amigos (recentes e antigos) que sempre me ajudaram, incentivando-me durante esse trajeto.

AGRADEÇO!

“Ele nos capacitou para sermos ministros de uma nova aliança, não de letra, mas do Espírito; porquanto a letra mata, mas o Espírito vivifica!”

**2 Coríntios 3:6**

## RESUMO

### **SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS *MAYARO* EM MANAUS E EM COARI**

O vírus *Mayaro* (MAYV) é um arbovírus que pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alfavírus*, considerado emergente da Floresta Amazônica. É transmitido pelo mosquito *Haemagogus janthinomys* e causa a febre *Mayaro*, uma doença infecciosa febril aguda, cujos principais sintomas são: febre >38°C com duração de 4 a 5 dias, dor de cabeça, erupções cutâneas, mialgia e artralgia; em alguns indivíduos, a artralgia pode persistir por pelo menos seis meses ou mais, apresentando sintomas semelhantes à artrite. O objetivo deste estudo é descrever a soroprevalência do MAYV nas populações dos municípios de Manaus e Coari, localizados no Estado do Amazonas, e identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção do MAYV. Amostras de sangue de indivíduos foram coletadas no período de outubro de 2014 a maio de 2016, e os questionários contendo informações sociodemográficas e econômicas foram analisados para investigar as causas envolvidas na circulação viral. Anticorpos IgG foram detectados por teste de Imunoensaio enzimático indireto, e amostras positivas foram confirmadas por teste de Microneutralização. Testou-se um total de 900 amostras, distribuídas por Manaus (n= 449) e Coari (n= 451). Encontrou-se uma prevalência global de 36% (324 soropositivos) e relativa de 14% em Manaus; e 57,8% em Coari. A prevalência encontrada foi maior comparada a estudos anteriores realizados no Amazonas. Os achados soropidemiológicos mais relevantes associados à infecção por MAYV estão relacionados ao município, sexo masculino, baixo nível socioeconômico, ocupação (agropecuários e florestais), problemas de saúde e medidas não preventivas. Os dados observados nesse estudo foram relevantes e contribuirão para uma maior compreensão da distribuição e da circulação do vírus *Mayaro* na Região Amazônica.

**Palavras -chave:** vírus *Mayaro*, Epidemiologia, Amazonas, Soroprevalência.

## ABSTRACT

### **SOROPREVALENCE OF THE *MAYARO* VIRUS IN MANAUS AND COARI**

*Mayaro* virus (MAYV) is an arbovirus belonging to the family *Togaviridae*, genus *alfavirus*, considered to be emerging from the Amazon rainforest. It is transmitted by the mosquito *Haemagogus janthinomys* and causes *Mayaro* fever, an acute febrile infectious disease, whose main symptoms are: fever  $>38^{\circ}\text{C}$  lasting 4 to 5 days, headache, rash, myalgia and arthralgia; in some individuals arthralgia may persist for at least six months or more, presenting symptoms similar to arthritis. The aim of this study is to describe the seroprevalence of the MAYV in the populations of the municipalities of Manaus and Coari, located in the state of Amazonas, and to identify the possible risk factors associated with the MAYV infection. Blood samples from individuals were collected from October 2014 to May 2016, and questionnaires containing socio-demographic and economic information were analyzed to investigate the causes involved in viral circulation. IgG antibodies were detected by indirect enzyme immunoassay, and positive samples were confirmed by Microneutralization test. The total of 900 samples, distributed by Manaus ( $n = 449$ ) and Coari ( $n = 451$ ), were tested. An overall prevalence of 36% (324 seropositives) and a relative prevalence of 14% in Manaus; and 57.8% in Coari was found. The prevalence found was higher compared to previous studies in Amazonas. The most relevant seroepidemiological findings associated with MAYV infection are related to the municipality, male gender, low socioeconomic level, occupation (agricultural and livestock), health problems and non-preventive measures. The data observed in this study were relevant and will contribute to a better understanding of the distribution and circulation of the *Mayaro* virus in the Amazon region.

**Keywords:** *Mayaro virus*, Epidemiology, Amazonas, Seroprevalence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características estruturais do alfavírus .....	19
Figura 2. Modelo esquemático da localização das proteínas estruturais e não estruturais do alfavírus .....	20
Figura 3. Ciclo de transmissão do vírus <i>Mayaro</i> no ambiente silvestre.....	21
Figura 4. Replicação do alfavírus na célula do hospedeiro .....	23
Figura 5. Mapa de Prevalência do vírus <i>Mayaro</i> nas Américas .....	29
Figura 6. Mapa de Prevalência do vírus <i>Mayaro</i> no Brasil .....	34
Figura 7. Mapa de Prevalência do vírus <i>Mayaro</i> em Manaus .....	35
Figura 8. Localização geográfica dos municípios de Manaus e Coari, no Estado do Amazonas .....	38
Figura 9. Delineamento experimental.....	40
Figura 10. Padronização das diluições de anticorpos primário e secundário .....	42
Figura 11. Fluxograma do roteiro utilizado para o ensaio de imuno-histoquímica para detecção de anticorpos IgG contra MAYV. ....	43
Figura 12. Desenho do ensaio da placa e cálculo do Cut-Off .....	45
Figura 13. Fluxograma do resultados dos imunoensaios.. .....	50
Figura 14. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> na população de estudo.....	51
Figura 15. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> de acordo com o sexo.....	52
Figura 16. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo faixa etária.....	53
Figura 17. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> na população total e entre municípios segundo cor da pele/raça .....	54
Figura 18. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo a renda familiar. ....	55
Figura 19. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo a escolaridade.....	56
Figura 20. Soroprevalência na população positiva de Manaus e Coari segundo histórico clínico.....	58
Apêndice A – Figura 21. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo histórico clínico de vários tipos de doenças. ....	79
Apêndice B – Figura 22. Soroprevalência em amostras positivas na população total de Coari segundo o contato com florestamento. ....	80
Apêndice C – Figura 23. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo medidas não preventivas. ....	81
Apêndice D – Figura 24. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo informações das características do mosquito (criadouro mais comum). ....	82
Apêndice E – Figura 25. Soroprevalência de amostras positivas do município de Coari segundo o tempo de picada mais frequente de mosquitos. ....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> nas Américas .....	28
Tabela 2. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> no Brasil .....	33
Tabela 3. Informações sobre a população do estudo.....	38
Tabela 4. Caracterização da população estudada. ....	48
Tabela 5. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> de acordo com o sexo.....	51
Tabela 6. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo a faixa etária.....	52
Tabela 7. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo cor da pele/raça.....	53
Tabela 8. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo renda familiar.....	54
Tabela 9. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> segundo escolaridade. ....	55
Tabela 10. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> na população total e entre municípios segundo ocupação. ....	57
Tabela 11. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> na população total e entre municípios segundo histórico clínico. ....	60
Tabela 12. Soroprevalência do vírus <i>Mayaro</i> na população de Coari segundo possíveis fatores de risco. ....	62
Tabela 13. Regressão logística multivariada para avaliar as variáveis com maior influência na prevalência para MAYV no município de Coari. ....	64
Apêndice F – Tabela 14. Lista de tampões utilizados durante o processo de Imuno-histoquímica. ....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ac** – Anticorpo

**BHK-21** – *Baby hamster kidney cell* – (“Células de rins de filhote de hamster”)

**CCZ** – Centro de Controle de Zoonoses

**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa

**CHIKV** – *Chikungunya vírus* – (“vírus *Chikungunya*”)

**CP** – capsídeo

**DEMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High glucose* – (“meio Eagle modificado por Dulbecco – alta glicose”)

**DENV** – *Dengue vírus* – (“vírus da Dengue”)

**ECP** – Efeito Citopático

**EDTA** – *Ethylenediaminetetraacetic acid* – (“ácido etilenodiamino tetra-acético”)

**EIA-ICC** – *immunoenzymatic method using infected cells as antigens* – (“Ensaio Imunoenzimático utilizando cultura de células infectadas como antígenos”)

**EIHI** – Ensaio de Imuno-histoquímica Indireto

**FA** – Febre amarela

**FMT-HVD** – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado

**HRC** – Hospital Regional de Coari

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IH** – Inibição da Hemaglutinação

**LD** – Leite desnatado

**MAC-ELISA** – Ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos IgM

**MAYV** – *Vírus Mayaro* – (“*Mayaro vírus*”)

**MHC** – *Major histocompatibility complex* – (“*Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade*”)

**MT** – Mato Grosso

**ODs** – *Optical density* – (“*Densidades Ópticas*”)

**OR** – *Odds Ratio* (“*razão de chances*”)

**Overnight** – Durante a noite

**PBS** – *Phosphate buffered saline* – (“*Tampão fosfato-salino*”)

**PD** – Distância Proporcional

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

**PPGIBA** – Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada

**RER** – *Rough Endoplasmic Reticulum* – (“*Retículo Endoplasmático Rugoso*”)

**RNA** – *Ribonucleic acid* – (“*Ácido Ribonucleico*”)

**RPM** – *Revolutions per minute* – (“*rotação por minuto*”)

**SFB** – *Fetal Bovine Serum* – (“*Soro Fetal Bovino*”)

**SFV** – *Semliki forest virus* – (“*Vírus da floresta de Semliki*”)

**SM** – salário(s)-mínimo(s)

**TCID<sub>50</sub>** – *Tissue culture infective dose 50%* – (“*50% da dose infectante em cultura de células*”)

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TMB** – Tetramethylbenzidine – (“*Tetrametilbenzidina*”)

**TMN** – Teste de Microneutralização

**UFAM** – Universidade Federal do Amazonas

## LISTA DE SÍMBOLOS

**(+) ssRNA**– *Positive-sense single-stranded RNA viruses* – (“Vírus RNA de cadeia simples com sentido positivo”)

$\chi^2$  - Teste do Qui-Quadrado

$\mu\text{L}$  – Microlitro(s)

**IC<sub>95%</sub>** – Intervalo de confiança de 95%

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
2.1.	Características estruturais do MAYV.....	19
2.2.	Ciclo de Transmissão do MAYV.....	21
2.3.	Vetor, reservatório e hospedeiro acidental.....	22
2.4.	Replicação de um alfavírus na célula do hospedeiro .....	22
<b>3</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
3.1.	América do Norte .....	25
3.2.	América Central .....	25
3.3.	América do Sul.....	26
<b>4</b>	<b>BRASIL</b> .....	<b>29</b>
4.1.	Manaus – Amazonas.....	34
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
5.1.	Geral .....	36
5.2.	Específicos.....	36
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>37</b>
6.1	Aspectos éticos .....	37
6.2.	População do estudo .....	37
6.3.	Amostragem.....	37
<b>7.</b>	<b>CULTIVO DE LINHAGEM CELULAR</b> .....	<b>38</b>
7.1	Preparo do estoque viral .....	39
7.2	Titulação do vírus pelo método de <i>Tissue culture infectious dose 50%</i> (TCID <sub>50</sub> ) 40	
<b>8</b>	<b>Teste de Imuno-histoquímica Indireto para detecção de anticorpos IgG anti-MAYV</b> .....	<b>41</b>
8.1	Desenho do ensaio na placa e cálculo do <i>Cut-Off</i> .....	44
<b>9</b>	<b>TESTE DE MICRONEUTRALIZAÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>47</b>
<b>11</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
11.1	Caracterizações da população estudada .....	47
<b>12</b>	<b>INQUÉRITO SOROLÓGICO</b> .....	<b>49</b>
<b>13</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>14</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>15</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>71</b>
<b>16</b>	<b>CRONOGRAMA</b> .....	<b>72</b>
<b>17</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>

<b>ANEXO 1 – Documento de aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 2 – Questionário epidemiológico e socioeconômico para população investigada.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Mayaro* é um vírus que pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *alfavírus*. O gênero *alfavírus* compreende aproximadamente 31 espécies de vírus distribuídos mundialmente, cuja característica em comum são mosquitos como seu principal vetor (FENNER, FRANK *et al.*, 1974). As principais espécies de *alfavírus* patogênicos são encontradas nas regiões das Américas. Dentre elas, estão os *Vírus da Encefalite Equina do Leste* (EEEV), *Vírus da Encefalite Equina Venezuelana* (VEEV), *Vírus da Encefalite Equina do Oeste*, *Vírus Chikungunya* (CHIKV) e o vírus *Mayaro* (MAYV) (CARRERA *et al.*, 2013; LAMBERT; MARTIN; LANCIOTTI, 2003; RICO-HESSE *et al.*, 1995; SW; OW; AL, 1983; TESH *et al.*, 1999).

O vetor principal do MAYV pertence ao gênero *Haemagogus* da espécie *Haemagogus janthinomys* (VASCONCELOS *et al.*, 1998), e os mosquitos dessa espécie pertencem à família *culicidae*, de hábito silvestre (SEGURA; CASTRO, 2007). A transmissão do MAYV ocorre durante o repasto sanguíneo do mosquito para o hospedeiro, que normalmente se encontra presente no solo ou na copa de árvores (PAJOT; GEOFFROY; CHIPPAUX, 1985). As características estruturais da partícula do MAYV o mostram externamente formado por um envelope lipídico e duas glicoproteínas estruturais E1 e E2, identificadas como proteínas precursoras, ambas exibidas em sua superfície, um nucleocapsídeo arranjado em simetria icosaédrica e um genoma RNA de cadeia simples com sentido positivo (+ssRNA); no geral, a partícula viral exibe um tamanho aproximado de ~70nm de diâmetro (MEZENCIO; REBELLO, 1993; ZHANG *et al.*, 2011).

A doença causada pelo MAYV é denominada de febre *Mayaro*, que causa sintomas inespecíficos similares a outras arboviroses como febre aguda (> 38°C) com duração de 4 a 5 dias, dor de cabeça, dor nos olhos, erupções cutâneas, mialgia e artralgia, podendo durar de 3 a 6 meses ou evoluir para uma doença crônica exibindo um aspecto similar à artrite (HALSEY *et al.*, 2013).

Em 1957, o MAYV foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago durante um estudo entomológico com mosquitos *Mansonia venezuelensis* (AITKEN *et al.*, 1960). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em seres humanos localizados no município de Belém, no Estado do Pará, em 1954 (CAUSEY; MAROJA, 1957). Durante um surto epidemiológico no município de Belterra, em 1979, também localizada no Pará, o vírus foi isolado de 43 pacientes febris (PINHEIRO, FRANCISCO

P. *et al.*, 1981). Países como Bolívia e Guiana Francesa têm como característica em comum a Floresta Amazônica em seu território, que coincide com presença de relatos de casos de febre *Mayaro* em moradores dessas regiões. A Floresta Amazônica pode ser considerada um possível fator de risco para a transmissão do vírus nessas regiões, uma vez que o vetor principal possui hábito silvestre e encontra-se preferencialmente presente nas copas de árvores (FRIEDRICH-JÄNICKE *et al.*, 2014; TAYLOR; PATEL; HEROLD, 2005). Acredita-se que o desmatamento do meio ambiente causado pelo ser humano, o urbanismo desenfreado, a implantação de barragem, as baixas condições de saneamento básico da população mais carente podem ser também fatores de risco para a transmissão do vírus (GUBLER, 2002).

Em 2010, durante um surto de febre aguda na Venezuela, foram notificado 77 casos de febre *Mayaro* em moradores de uma aldeia. (AUGUSTE *et al.*, 2015). No Equador, em 2011, durante uma investigação epidemiológica sobre o MAYV, 14% dos indivíduos tiveram anticorpos IgG anti-*Mayaro* positivo, e 6,2% tiveram IgM positivo (IZURIETA *et al.*, 2011). Em 2013, no Peru, também durante uma investigação envolvendo (n= 2,094) pacientes febris, 0,8% desses pacientes tiveram IgM positivo, e o vírus pôde ser isolado em 11 desses pacientes (HALSEY *et al.*, 2013). O primeiro estudo desenvolvido sobre a soroprevalência do MAYV no Estado do Amazonas, em Manaus, foi em 2008, durante um surto de febre aguda envolvendo (n= 631) pacientes com sintomas febris; 5,2% desses pacientes tiveram anticorpos IgM positivos contra o *Mayaro* (MOURÃO *et al.*, 2012). O segundo estudo realizado em Manaus foi em 2012, envolvendo moradores de uma área rural localizada próximo do município de Presidente Figueiredo. 44,1% apresentaram anticorpos IgG positivos (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012). Contudo, apesar de o MAYV já ter sido identificado em indivíduos de diversas regiões das Américas e principalmente no Brasil (BUCKLEY *et al.*, 1972; CAUSEY; MAROJA, 1957; CAUSEY; THEILER, 1958; FIGUEIREDO *et al.*, 1989; FORSHEY *et al.*, 2010; IZURIETA *et al.*, 2011; TALARMIN *et al.*, 1998), ainda assim são necessários mais estudos sobre as consequências que o vírus pode causar no Estado do Amazonas, uma vez que os sintomas causados pelo MAYV são similares aos de outras arboviroses (PIALOUX *et al.*, 2007). Com isso, o objetivo principal deste estudo é investigar a soroprevalência do vírus *Mayaro* (MAYV) em duas populações distintas localizadas em Manaus e em Coari, realizando pesquisa de anticorpos (IgG) específicos para o MAYV e a confirmação das amostras positivas por

teste de Microneutralização, considerado padrão-ouro para o diagnóstico de arboviroses.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Características estruturais do MAYV

A família *Togaviridae* é dividida em dois gêneros: o gênero *Rubivirus*, que possui apenas uma espécie de vírus (Rubéola), e o gênero *alfavírus*, que apresenta aproximadamente 31 espécies de vírus conhecidos (FENNER, FRANK *et al.*, 1974). As características demonstradas na Figura 1 representam a partícula do vírus *Mayaro* com, aproximadamente, ~70 nm de diâmetro, um genoma RNA contornado por um capsídeo (C) de simetria icosaédrica, que apresenta 240 cópias de (C), e um envelope viral constituído de uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro e que inclui glicoproteínas estruturais em sua superfície, denominadas de E1 e E2 (MEZENCIO *et al.*, 1990).

**Figura 1. Características estruturais do alfavírus**

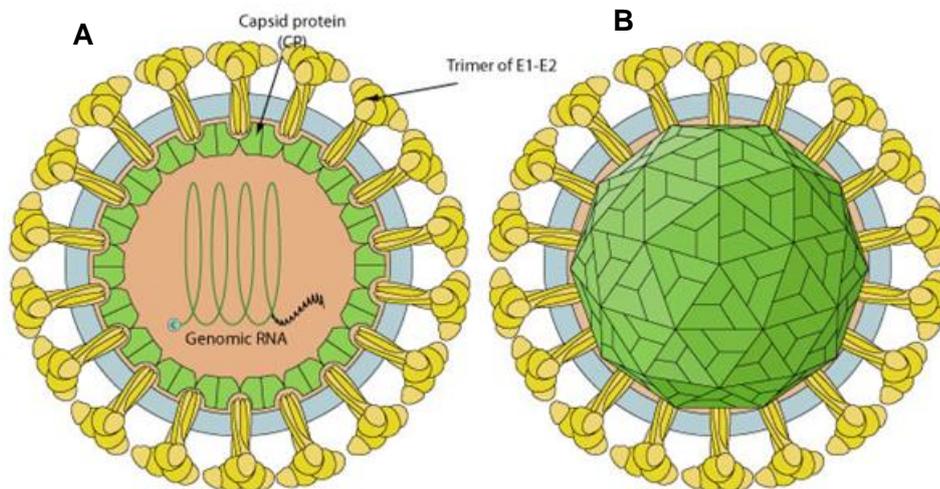


Figura 1. Características estruturais de um *alfavírus*. (A) Representação da partícula viral do *alfavírus*, apresentando um envelope viral e, em sua superfície, glicoproteínas estruturais denominadas de E1 e E2; e, na parte interna, um genoma RNA de cadeia simples com sentido positivo (+) ssRNA. (B) Representação da estrutura completa do vírus destacando o capsídeo (CP) em simetria icosaédrica. Fonte: <http://viralzone.expasy.org>.

O genoma RNA de cadeia simples e polaridade positiva (+ssRNA) do MAYV é linear, não segmentado e apresenta ~11kb. Nas extremidades 3', situam-se as proteínas estruturais E1, que apresentam como unidade de massa atômica (~54kDa), 6k, E2 (~50kDa), E3 (~10kDa) e C (34kDa), exibindo uma cauda de poliadenilato denominada de Poli-A; e, nas extremidades 5', denominadas de Cap 5' (resíduo 7-metilguanossina), situam-se as proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). O MAYV é identificado por meio de suas características antigênicas, desempenhadas pelas proteínas do capsídeo e do envelope (FIRTH *et al.*, 2008; KIELIAN *et al.*, 2000; MEZENCIO; REBELLO, 1993).

A estrutura do genoma viral é dividida em duas partes principais, demonstradas na Figura 2. A primeira parte, localizada próximo da extremidade 5', envolve dois terços do RNA viral, visto que é lido de modo direto como RNAm exercendo a função de codificação das quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). A segunda parte é localizada próximo da extremidade 3', que codifica as glicoproteínas estruturais E1 e E2 sob o domínio de um RNA subgenômico identificado como 26S (MEZENCIO; REBELLO, 1993). A transcrição do RNA - 26S é realizada por meio de um intermediário de cadeia negativa, que é dependente do RNA genômico e que posteriormente é submetido à fragmentação por enzimas, dando origem às glicoproteínas estruturais (MEZENCIO *et al.*, 1990).

**Figura 2. Modelo esquemático da localização das proteínas estruturais e não estruturais do alfavírus**

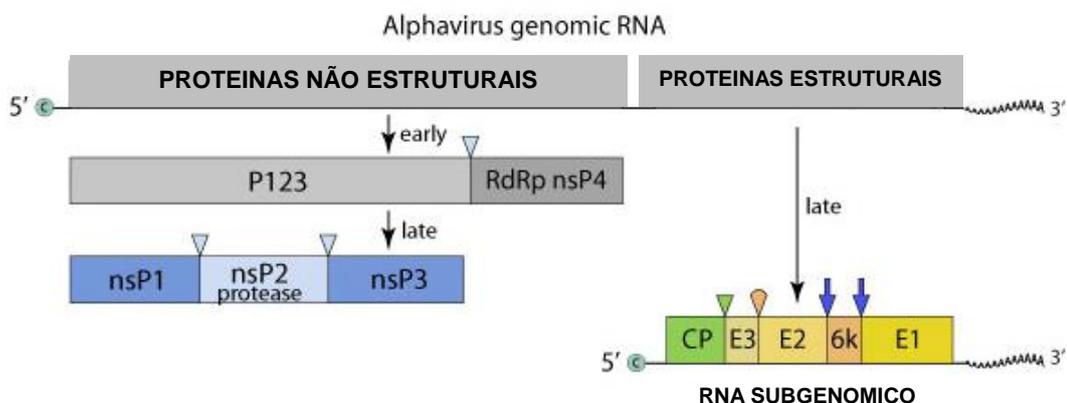


Figura 2. Modelo esquemático de organização das proteínas estruturais e não estruturais do alfavírus. Fonte: <http://viralzone.expasy.org>. Tradução dos genes das proteínas não estruturais localizadas próximo à extremidade 5', que resulta na produção de uma poliproteína que é clivada à medida que vai sendo produzida, dando origem às proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. mRNAs subgenômicos

(26S) são traduzidos, originando uma poliproteína, que é então clivada, dando origem às proteínas estruturais do capsídeo (CP) e às glicoproteínas do envelope E3, E2, 6k e E1, localizadas na extremidade 3'.

## 2.2. Ciclo de Transmissão do MAYV

A transmissão do MAYV inicialmente ocorre em um ambiente silvestre incluindo várias espécies de animais que atuam como reservatórios multiplicadores do vírus. O vetor principal do MAYV é o mosquito da espécie *Haemagogus Janthinomys* (TALARMIN *et al.*, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 1998). Normalmente os seres humanos são infectados pelo MAYV de forma acidental, ao adentrar um ambiente silvestre, ficando susceptíveis ao contato com o vetor do vírus. Estudo aponta que moradores de áreas rurais que exercem funções como caçar, desmatar e cultivar agricultura estão mais susceptíveis à infecção pelo MAYV (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012). A disseminação do vírus para áreas urbanas e periurbanas inicia-se com pessoas infectadas na área rural que migram para áreas de aproximações com o homem, animais domésticos e outros vetores presentes em ambientes urbanos (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012; MOURÃO *et al.*, 2012; SERRA *et al.*, 2016; TESH *et al.*, 1999).

**Figura 3. Ciclo de transmissão do vírus *Mayaro* no ambiente silvestre**

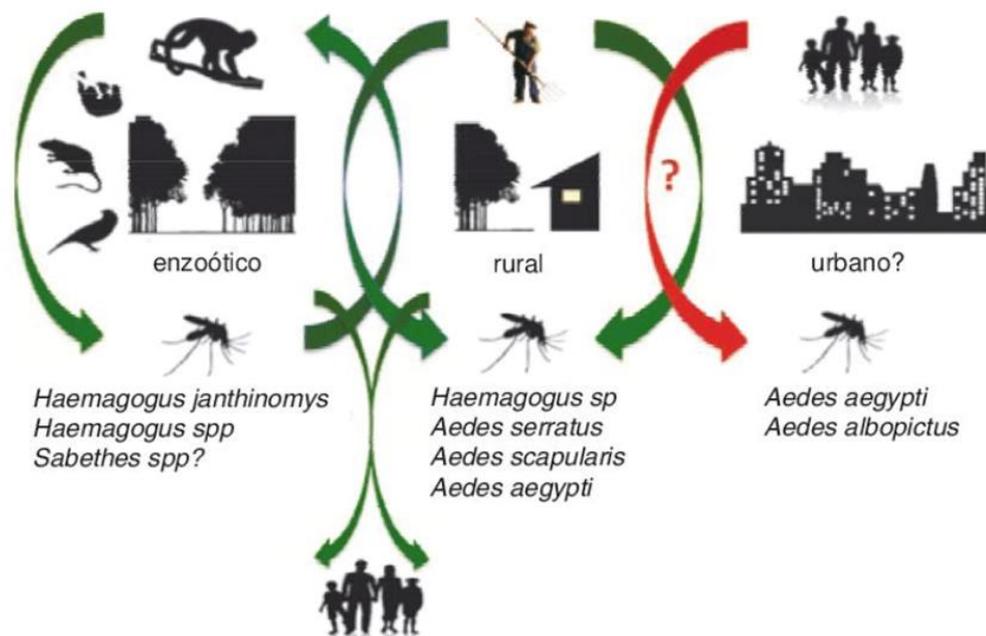


Figura 3. Ciclo de transmissão do vírus *Mayaro* no ambiente silvestre. Na natureza, o vírus é mantido por meio de um ciclo silvestre; animais selvagens são considerados

reservatórios do vírus. O mosquito *Haemagogus janthinomys* é o vetor principal. Os seres humanos no ambiente rural que fazem uso constante do *habitat* florestal como desmatamento, caça e trabalho com agricultura podem estar susceptíveis à infecção pelo MAYV. Fonte: (MUÑOZ; NAVARRO, 2012).

### 2.3. Vetor, reservatório e hospedeiro acidental

O vetor principal do MAYV pertence ao gênero *Haemagogus*, família *Culicidae*, da espécie *Haemagogus janthinomys*, mosquito comumente encontrado nas copas de árvores (HOCH *et al.*, 1981; VASCONCELOS *et al.*, 1998); outros gêneros de mosquitos também podem atuar como vetores do MAYV, tais como *Sabethes spp*, *Culex spp*, *Psorophora spp*, *Coquillettidia spp*, *Aedes spp* e *Mansonia spp* (AITKEN *et al.*, 1960; LONG *et al.*, 2011; MS, 2014; SERRA *et al.*, 2016).

Animais de várias espécies e gêneros que vivem em ambientes silvestres também são susceptíveis à infecção pelo vírus, por isso são considerados hospedeiros primários multiplicadores do MAYV. Dados apontam títulos de anticorpos elevados em diferentes espécies de animais como *Xenarthra*, *Marsupiais*, *Rodentia*, *Carnivora*, *Artiodactyla*, *Primata*, *perissodáctilos*, *Crocódilia* e várias espécies de aves migratórias, tais como *Vireo olivaceus*, *Icterus spurius*, *Dumetella carolinensis*, *Piranga rubra*, *Piranga olivácea*, entre outras (CALISHER *et al.*, 1974; DE THOISY *et al.*, 2003; LAROQUE *et al.*, 2014; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2015).

Normalmente a transmissão do MAYV para os humanos ocorre de forma acidental, e conseqüentemente os seres humanos infectados desenvolvem vários sintomas inespecíficos como febre aguda, dor de cabeça, mialgia, artralgia e erupções cutâneas. Tais sintomas são semelhantes aos de outras arboviroses como vírus da dengue (DENV), vírus *chikungunya* (CHIKV) e febre amarela (FA) (CAUSEY; MAROJA, 1957; HALSEY *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 1998).

### 2.4. Replicação de um alfavírus na célula do hospedeiro

A penetração do alfavírus nas células do hospedeiro primeiramente se inicia com a interação das proteínas estruturais E1 e E2 presentes na superfície do vírus com os receptores presentes na superfície da célula do hospedeiro, seguida de internalização das partículas virais por endocitose (MEZENCIO *et al.*, 1990). A liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula ocorre após a fusão do envelope viral com a membrana dos endossomos, o que ocorre sob pH baixo (pH 5 á 6). O desnudamento ocorre por meio da interação das proteínas do nucleocapsídeo com os

ribossomos da célula hospedeira. A primeira etapa após o desnudamento é a tradução direta de parte do RNA genômico pelos ribossomos. A tradução dos genes das proteínas não estruturais localizadas próximo à extremidade 5' resulta na produção de uma poliproteína que é clivada à medida que vai sendo produzida, dando origem às proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (Figura 4) (NAPOLEÃO-PEGO *et al.*, 2014).

Os mRNAs subgenômicos (26S) são traduzidos, originando uma poliproteína, que é, então, clivada, dando origem às proteínas estruturais do capsídeo (C) e às glicoproteínas do envelope E1 e E2 (Figura 04). As glicoproteínas são sintetizadas pelos ribossomos, associados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (MEZENCIO *et al.*, 1990).

A montagem dos nucleocapsídeo ocorre associada com membranas no citoplasma, pela conjugação do RNA genômico recém-formado com múltiplas cópias da proteína do capsídeo. Os nucleocapsídeos são transportados até a membrana plasmática, onde interagem com as caudas das glicoproteínas recém-inseridas e completam a maturação por brotamento. O ciclo de replicação do vírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula, demonstrada na Figura 4 (MEZENCIO *et al.*, 1990).

**Figura 4. Replicação do alfavírus na célula do hospedeiro**

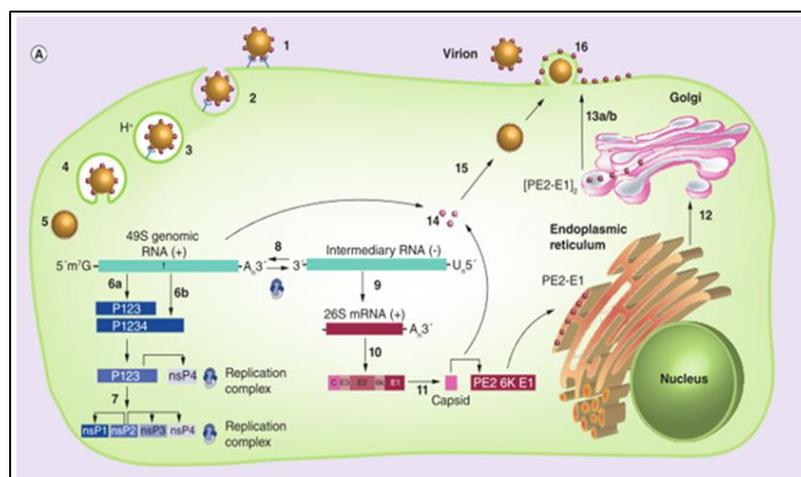


Figura 4. Replicação do alfavírus na célula do hospedeiro. (1) Ligação com receptor; (2) Endocitose mediada por receptores; (3) acidificação do vacúolo; (4) fusão de membrana; (5) Desmontagem do nucleocapsídeo; (6a) Tradução; (6b) Tradução de leitura; (7) Processamento; (8) Transcrição; (9) Transcrição; (10) Tradução; (11) Processamento; (12) Processamento e maturação de glicoproteínas; (13a) Transporte de glicoproteínas processadas para a membrana plasmática; (13b) Furin-ativação de espiga; (14) embalagem de RNA genômico; (15) Conjunto de nucleocápsidos; (16) Brotamento das partículas virais. Fonte: MOTA *et al.*, 2015).

### 3 EPIDEMIOLOGIA

Casos de infecções por MAYV já foram descritos em vários países da América do Norte, Central e do Sul (ANDERSON, CHARLES R. *et al.*, 1957; AUGUSTE *et al.*, 2015; BUCKLEY *et al.*, 1972; CAUSEY; MAROJA, 1957; FIGUEIREDO *et al.*, 1989; FORSHEY *et al.*, 2010; TALARMIN *et al.*, 1998). Geralmente as infecções por MAYV ocorrem em áreas rurais, por meio de casos esporádicos ou surtos. Estudos evidenciam que a febre *Mayaro* é bastante antiga e apresenta um aspecto clínico e epidemiológico similar ao vírus *da floresta de Semliki* podendo ser vista em artigos datados de 1957 (ANDERSON, CHARLES R. *et al.*, 1957).

Ao longo dos últimos 62 anos, têm-se catalogado casos de infecção por MAYV em várias regiões das Américas, principalmente na América do Sul (MOTA *et al.*, 2015). Atualmente existem três diferentes genótipos do MAYV em circulação. O primeiro, representado como D, que foi isolado na Venezuela, Peru, Bolívia, Brasil, Trindade e Tobago. O segundo, representado como L, identificado como circulante apenas no Brasil, apresentando uma diferença de 15 a 19%, comparado ao genótipo anterior. O terceiro, representado como N, isolado em 2010, na cidade de Puerto Maldonado, no Peru (AUGUSTE *et al.*, 2015).

A América do Sul compreende 12 países: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela; todos os países apresentam climas tropicais (quente e úmido), com períodos chuvosos extensos nas florestas. O clima tropical é considerado um dos possíveis fatores de risco que promovem um ambiente propício para proliferação de vetores, uma vez que a água da chuva vacuola ao entrar em contato com os ovos dos mosquitos *Haemagogus Janthinomys* presentes na copa das árvores, auxilia na eclosão desses ovos e, com isso, na aceleração da proliferação de mosquitos dentro do ambiente silvestre (ALENCAR *et al.*, 2009).

O MAYV foi descoberto pela primeira vez em 1954, numa região denominada *Mayaro*, localizada em Trindade e Tobago, o que originou seu nome. O vírus foi isolado a partir do sangue de quatro trabalhadores florestais e de uma jovem que morava numa área urbana (ANDERSON, CHARLES R. *et al.*, 1957). Em 1957, o MAYV foi isolado de mosquitos *Mansonia venezuelensis*, capturados dentro de uma floresta na mesma ilha (AITKEN *et al.*, 1960). A partir de então, o vírus foi encontrado

em outros países, na Região Amazônica e seus arredores, sob a forma de surtos (CAUSEY; MAROJA, 1957).

### 3.1. América do Norte

Em 2006, no México, analisaram-se (n=35) pacientes atendidos em um instituto de saúde com diagnóstico suspeito de dengue hemorrágica, dos quais 5,7% (2) apresentaram anticorpos IgM anti-*Mayaro* positivo (NAVARRETE-ESPINOSA, JOEL; GÓMEZ-DANTÉS, HÉCTOR, 2006).

### 3.2. América Central

SRIHONGSE; STACY; GAULD (1973) realizaram um estudo envolvendo trabalhadores indígenas e não indígenas de uma construção de canal no Panamá. A coleta de sangue ocorreu alguns dias antes da entrada dos trabalhadores na área, durante a permanência de três a seis meses no local e envolveu trabalhadores recrutados no local. Ao todo, 1.475 soros de 965 trabalhadores foram analisados para 21 tipos de arbovírus; no grupo de indivíduos não indígenas, 1% tinha anticorpos contra arbovírus do grupo A (são vírus da família *Togaviridae* e gênero *alfavírus*); 60% contra arbovírus do grupo B (são vírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivírus*); e no grupo trabalhadores indígenas 56% tinham anticorpos contra um ou mais arbovírus, incluindo vírus do grupo A e do grupo B. Dentre estes, oito indivíduos do grupo não indígena e quatro do grupo indígena apresentaram soro conversão para algumas espécies de vírus, incluindo o vírus *Mayaro*.

Recentemente, em 2016, foi relatado o primeiro caso de infecção por MAYV envolvendo uma criança de oito anos de idade. Os resultados do diagnóstico revelaram que a criança estava coinfetada com MAYV e DENV-1. A criança era moradora de uma área rural do Haiti, que refletia um ambiente diferente da Região Amazônica. A respeito da transmissão, ainda não se sabe como ocorreu, uma vez que pouco se conhece sobre vetores do MAYV no Haiti, e animais reservatórios continuam sem identificação dentro da região (LEDNICKY *et al.*, 2016).

### 3.3. América do Sul

Em 1955, o *Mayaro* foi isolado pela primeira vez no Brasil, próximo às margens do rio Guamá, na cidade de Belém, no Estado do Pará, durante um surto de doença febril dentro de uma comunidade rural envolvendo 115 trabalhadores da pedreira e florestas, dos quais 5,2% (n=6) dos indivíduos tiveram o vírus isolado (CAUSEY; MAROJA, 1957).

No Peru, em 1965, a prevalência do MAYV realizada com (n=100) indivíduos saudáveis mostrou que 70% (70) dos indivíduos tinham anticorpos inibidores de hemaglutinação; e, dentre esses indivíduos, em 97,1% (68) foi confirmada a presença de anticorpos neutralizantes contra o MAYV (BUCKLEY *et al.*, 1972).

No Município de Santa Cruz, na Bolívia, após um surto envolvendo (n=114) indivíduos febris, 54,4% (62) tinham anticorpos contra o MAYV; destes, 33,8% (21) tinham IgM positivo, e 82,2% (51) IgG positivo contra o MAYV, conforme resultado obtido pelo método de EIA-ICC (Ensaio Imunoenzimático utilizando cultura de células infectadas como antígenos). De acordo com outro método de diagnóstico MAC-ELISA (Ensaio Imunoenzimático de captura de anticorpos IgM), 75,8% (47) tinham IgM positivo contra o vírus (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

A prevalência do MAYV analisada numa população de (n=1.962) da Guiana Francesa foi de 6,3% (124) IgG anti-*Mayaro* positivo, e apenas um indivíduo teve IgM anti-*Mayaro* positivo (TALARMIN *et al.*, 1998). Soro de indivíduos febris (n=20.880) de 13 localidades do Equador, Peru, Bolívia e Paraguai foram analisados. Dentre esses indivíduos, 40 tiveram o vírus isolado, e 9,7% (7) apresentaram IgM anti-*Mayaro* positivo; dos indivíduos que tiveram o vírus isolado, 15 eram residentes na Bolívia, e 25 residiam no Peru (FORSHEY *et al.*, 2010).

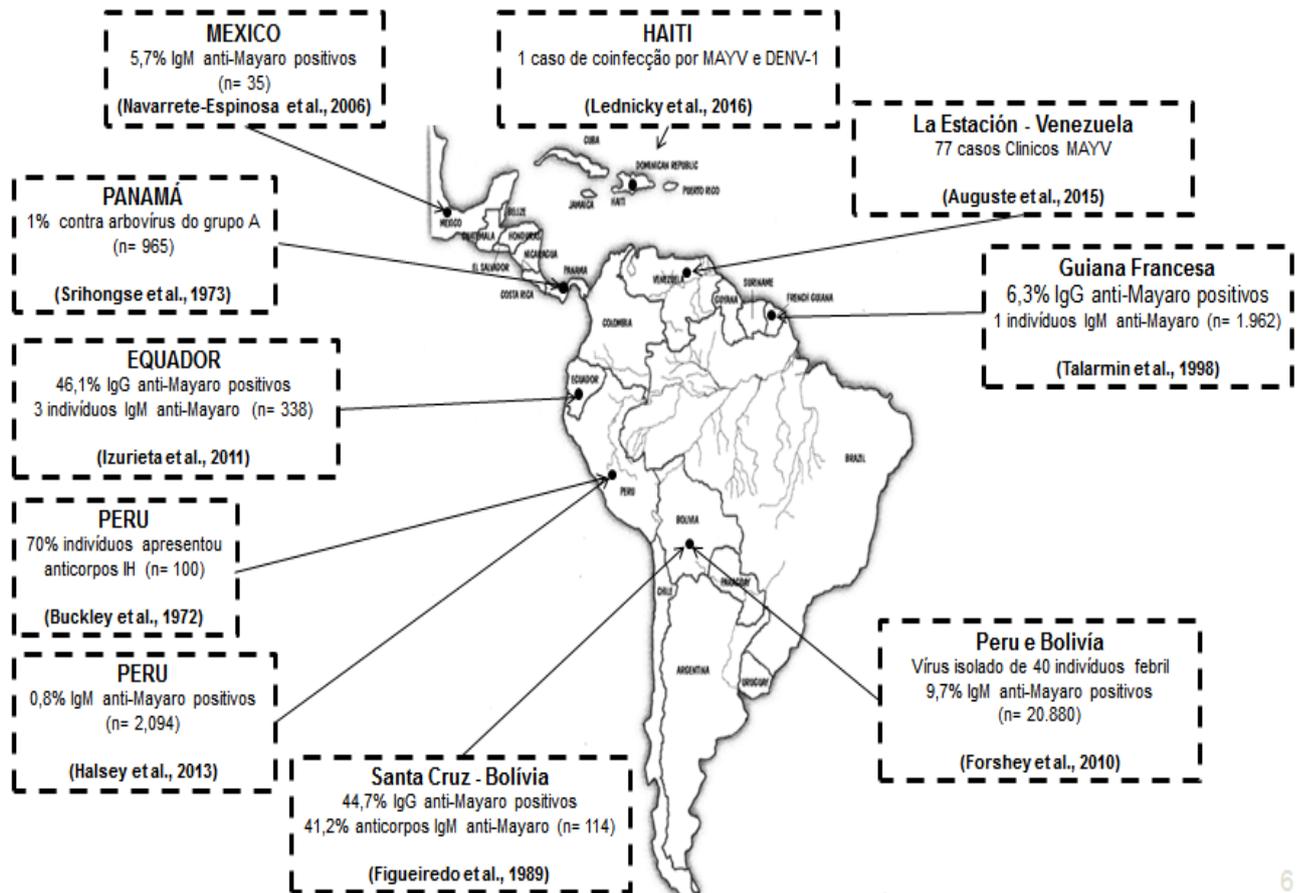
No Equador, em 1997, (n= 338) soros de indivíduos de uma guarnição militar foram analisados; 14% (n=48) dos indivíduos tinham IgG anti-*Mayaro* positivo, e 6,2% (n=3) dos membros da guarnição apresentaram IgM anti-*Mayaro* positivo (IZURIETA *et al.*, 2011). Logo abaixo do Equador, no Peru, (n=2,094) indivíduos febris foram atendidos em 15 centros de saúde localizados em quatro cidades do Peru: Iquitos, Yurimaguas, Chanchamayo e Puerto Maldonado. 0,8% (n=16) dos indivíduos tinham anticorpos IgM anti-*Mayaro* positivo, e o vírus foi isolado de 11 indivíduos (HALSEY *et al.*, 2013).

Em 2010, depois de um surto de febre *Mayaro* numa aldeia rural, situada na vila La Estación, na Venezuela, 77 casos foram relatados; destes, 24,6% (n=19) dos casos foram confirmados com febre *Mayaro* tendo sido o vírus isolado de (n=6) indivíduos (AUGUSTE *et al.*, 2015).

Tabela 1. Soroprevalência do vírus *Mayaro* nas Américas

REGIÃO	SOROPREVALÊNCIA	REFERÊNCIA
<b><u>Trindade e Tobago</u></b> Investigação durante surto	Vírus isolado de 05 indivíduos febris	(ANDERSON, CHARLES R. et al., 1957)
<b><u>Trindade e Tobago</u></b> Investigação entomológica	MAYV isolado de 01 pool de mosquitos <i>Mansonia venezuelensis</i>	(AITKEN et al., 1960)
<b><u>Peru</u></b> Investigação epidemiológica	70% (70) indivíduos apresentou anticorpos Inibidores de Hemaglutinação - IH (n= 100)	(BUCKLEY et al., 1972)
<b><u>Santa Cruz – Bolívia</u></b> Investigação durante surto	44,7% (51) indivíduos IgG positivo 41,2% (47) IgM positivo MAYV (n= 114)	(FIGUEIREDO et al., 1989)
<b><u>Guiana Francesa</u></b> Investigação epidemiológica	6,3% (124) IgG anti-Mayaro positivo (n= 1.962) 1 indivíduo teve IgM positivo MAYV	(TALARMIN et al., 1998)
<b><u>Equador, Peru, Bolívia e Paraguai</u></b> Investigação epidemiológica	15,2% (98) IgM anti-Mayaro positivo (n= 645) Vírus isolado de 40,8% (40) indivíduos febris	(FORSHEY et al., 2010)
<b><u>Equador</u></b> Investigação epidemiológica	46,1% (42/91) IgG anti-Mayaro positivo (n= 338) 2% indivíduos nativos de outras regiões (3) indivíduos IgM anti-Mayaro positivo	(IZURIETA et al., 2011)
<b><u>Peru</u></b> Investigação epidemiológica	0,8% (16) IgM anti-Mayaro positivo (n= 2,094) Vírus isolados de 11 indivíduos febris	(HALSEY et al., 2013)
<b><u>La Estación - Venezuela</u></b> Investigação durante surto	77 casos clínicos MAYV 24,6% (19) amostras de soro de fase aguda vírus isolado de 06 indivíduos febris	(AUGUSTE et al., 2015)

**Figura 5. Mapa de Prevalência do vírus *Mayaro* nas Américas**



#### 4 BRASIL

Em 1953, foram estudadas 17 regiões localizadas próximo do rio Amazonas. Dentre estas, estavam as cidades de Abaetetuba, Cametá, Altamira, Óbidos, Santarém, Fordlândia, Belterra, Manaus, Lábrea e Tefé. No total foram coletadas (n= 509) amostras de sangue de indivíduos sem suspeita de doença febril. Os indivíduos eram trabalhadores de laboratório de virologia, crianças de escola pública, trabalhadores agrícolas, moradores de duas aldeias, madeireiros e serralheiros, todos localizados de várias regiões da Amazônia; 10% (n=51) dos indivíduos apresentaram anticorpos neutralizantes para o vírus da floresta de *Semliki* (CAUSEY; THEILER, 1958). Entretanto, com a ocorrência de surto de doença febril tanto em Trindade quanto numa comunidade às margens do rio Guamá, no Estado do Pará (CASALS, JORDI; WHITMAN ANDLORING, 1957), afirmaram que o MAYV é um agente intimamente relacionado imunologicamente com o vírus *Semliki*

obtendo-se evidências de que os resultados positivos obtidos por meio do Teste de Neutralização com o vírus Semliki são devido aos anticorpos produzidos por infecção pelo MAYV (ANDERSON, CHARLES R. *et al.*, 1957; CAUSEY; MAROJA, 1957). Logo depois, em 1978, ainda no Brasil, no Estado do Pará – município de Belterra, 76% (n=55) dos casos foram confirmados para MAYV do total de (n=72) indivíduos, dos quais o vírus foi isolado de 43 indivíduos febris (PINHEIRO, FRANCISCO P. *et al.*, 1981).

Na costa do Oceano Atlântico, mais precisamente no Município de Valença – Bahia, um (01) caso foi confirmado para MAYV, por meio da presença de anticorpos hemaglutinantes e neutralizantes. Importante ressaltar que o indivíduo relatou ter morado por três anos no município de Paragominas, no Pará; e na ocasião havia tido uma doença febril com fortes dores nas articulações, precedida por exantema; ele integra um total de (n= 288) indivíduos sem sintomas de doença febril (TAVARES-NETO *et al.*, 1986a).

Durante um surto de dengue o laboratório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), localizado em Manaus, iniciou em 1998 um programa de vigilância e diagnóstico de doenças arbovírus com o intuito de investigar os seus agentes etiológicos. Os testes de diagnósticos foram feitos por estudos sorológicos utilizando o teste MAC-ELISA para detecção de anticorpos IgM. Foram analisadas (n= 22) amostras de soros de pacientes com suspeita de doença febril, dos quais 36,3% (n=8) dos soros apresentaram anticorpos positivos para o MAYV (FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Em 2008, outro surto de dengue ocorrido no município de Santa Bárbara, localizado no Estado do Pará, mostrou que, de (n=105) indivíduos que apresentavam sintomas de doença febril, 34,3% (n=36) tinham anticorpos IgM positivo contra o MAYV; destes, 52% dos indivíduos eram estudantes, 31% agricultores, e 17% exerciam outras atividades. Contudo dois indivíduos e um *pool* de mosquitos *Haemagogus janthinomys* capturados na região tiveram o vírus isolado (AZEVEDO *et al.*, 2009).

Por seu turno, com o intuito de se avaliar a prevalência de arbovírus no município de Juruti, situado à margem direita do rio Amazonas, no Estado do Pará, soros de sangue de indivíduos foram coletados por punção venosa, na unidade municipal de saúde de Juruti, com base na demanda passiva de pessoas com ou sem sintomas de doença febril, em quatro excursões, durante o período de fevereiro de 2007 a abril de 2008. Foram analisados (n= 1.597) soros humanos, dos quais 1,25% (n=20) soros de indivíduos

apresentou anticorpos inibidores da hemaglutinação positivo para MAYV; e 5 indivíduos, IgM anti-*Mayaro* positivo (CRUZ *et al.*, 2009).

Ainda no Estado do Pará, por meio de outro estudo, amostras de sangue foram coletadas de (n=1.398) indivíduos residentes de Trairão e Novo Progresso, municípios localizados ao longo da rodovia BR 163. Os resultados da análise apontaram que 5,5% (n=78) dos indivíduos febris tinham anticorpos IH positivos para o MAYV; e em 10 indivíduos foram constatados anticorpos IgM anti-*Mayaro* positivos (NUNES *et al.*, 2009a).

No Amapá, no ano de 2012, (n=22) comunidades localizadas numa reserva extrativista do Rio Cajari mostraram que (n=306) indivíduos sem sintomas de doenças febris foram analisados; e, de acordo com as análises dos resultados laboratoriais, foi possível mostrar que 17,3% (n=53) desses indivíduos tinham anticorpos IH positivos para MAYV(SOUTO; SOUTO, 2012a). Não obstante, em 2013, no município de Boa Vista – Roraima, (dados não publicados), mostrou-se que, entre (n=72) indivíduos febris que foram negativos para o DENV, 9,7% (n=7) dos indivíduos foram detectados com RNA do MAYV positivo utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real específico para o vírus (MENESES, CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO, 2013).

Recentemente, nos últimos três anos, foram publicados três investigações epidemiológicas sobre o MAYV no Estado de Mato Grosso (MT). O primeiro foi em 2014, durante um surto de dengue envolvendo (n=604) pacientes apresentando sintomas de doença febril com mais de cinco dias de febre, atendidos em unidades de saúde de 20 municípios do MT. As amostras de soro dos pacientes foram submetidas à extração de RNA seguida por RT-PCR Semi-Nested multiplex específico para o vírus; de acordo com os resultados, 2,5% (n=15) dos pacientes tiveram o genoma do MAYV detectado nas amostras de soro; entre os quais 12 desses pacientes encontravam-se coinfectedos tanto pelo MAYV quanto pelo DENV (vírus da Dengue); e o resultado do sequenciamento de nucleotídeos obtidos das amostras dos pacientes positivos identificou duas genótipos de MAYV classificadas como (BeH 343148) e (BeAr 5054118), ambas pertencentes ao genótipo D e L (ZUCHI *et al.*, 2014).

A segunda publicação epidemiológica sobre o vírus também foi durante um surto de dengue, em 2015, no município de Sinop – MT, quando (n=200) pacientes com sintomas de doença febril atendidos no serviço de emergência do município foram selecionados para o estudo. As amostras de soro dos pacientes positivos foram

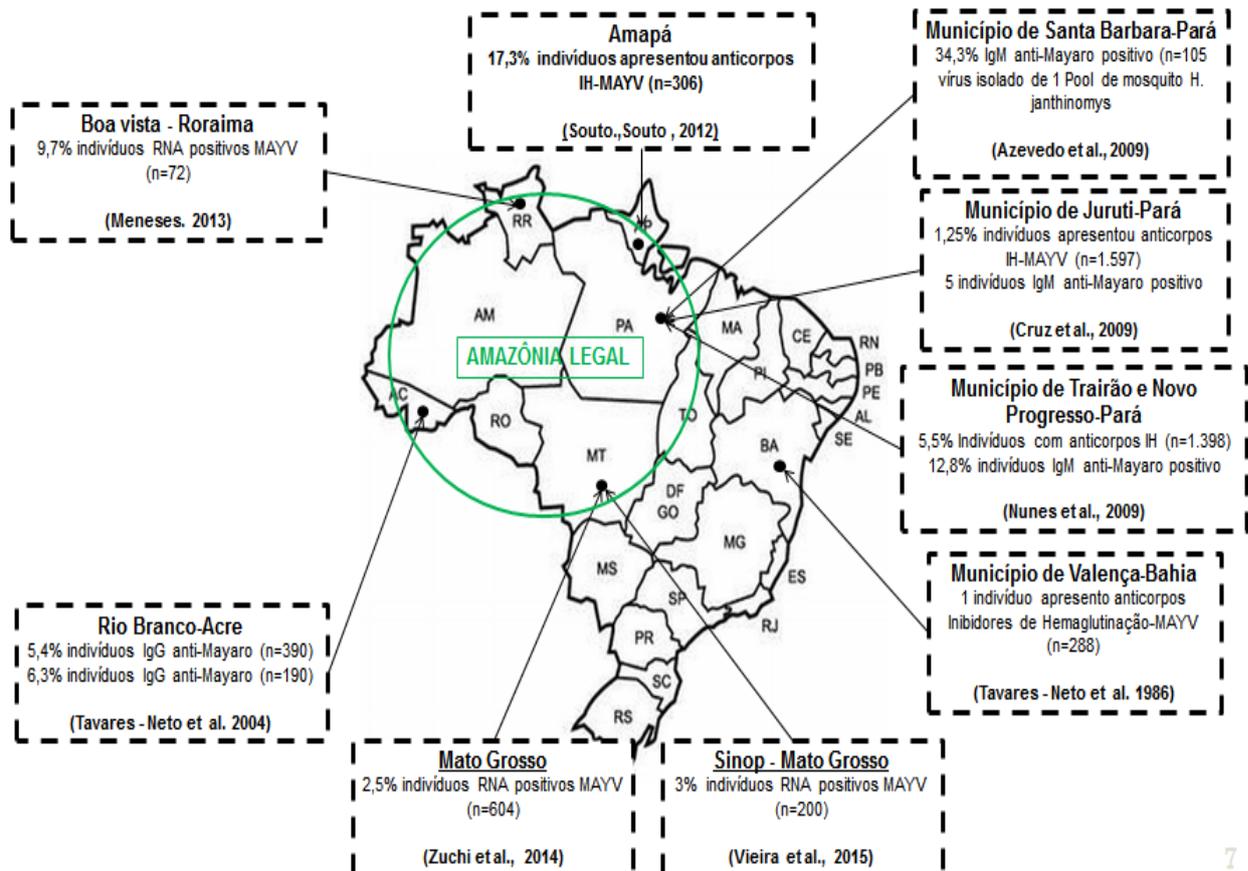
submetidas ao ensaio de RT-PCR e sequenciamento de nucleotídeos específico para o vírus; os resultados mostraram que 3% (n=6) dos pacientes tiveram o RNA genômico do MAYV detectado, e a genótipo circulante identificada classificada de (BR/MT-SINOP/210/2011) pertencia também ao genótipo L, comumente circulante no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2015).

E a terceira publicação foi uma investigação entomológica publicada no início de 2016, especificamente no município de Cuiabá – MT, em que foram capturadas diversas espécies de mosquitos da família dos *culicídeos*, nas regiões norte, sul, centro-oeste e centro-leste de Cuiabá, com o intuito de investigar a frequência de infecção natural (FIN) e a taxa de infecção mínima (TIM) de MAYV e DENV por meio de confecção de *pool* de cada espécie de mosquitos capturados nas diferentes regiões da cidade. Os resultados das análises mostraram que somente as regiões sul e centro-leste da cidade apontaram frequência do MAYV em mosquitos; já os mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquesfasciatus* foram capturadas na região sul de Cuiabá com FIN de (3.97 - 17.6) aproximadamente, comparado com a TIM de (9.09 - 1.39) entre as duas espécies; já as mesmas espécies de mosquitos capturadas na região centro-leste apresentaram uma FIN de (9.2 - 2.7) aproximadamente, em comparação com a TIM de (4.23 - 16) nessa região (SERRA *et al.*, 2016).

Tabela 2. Soroprevalência do vírus *Mayaro* no Brasil

REGIÃO	SOROPREVALÊNCIA	REFERÊNCIA
<b>Belém – Pará</b> (Rio Guamá) Investigação Durante surto	MAYV isolado de 06 trabalhadores rurais (n= 115)	(CAUSEY; MAROJA, 1957)
<b>Vale Amazônico (17 localidades)</b> Investigação Epidemiológica	9,6 % (53) indivíduos apresentou anticorpos Neutralizantes para vírus da floresta de <i>Semliki</i> (n= 551)	(CAUSEY; THEILER, 1958)
<b>Belterra – Pará</b> Investigação durante surto	76% (55) indivíduos apresentou anticorpos Neutralizantes MAYV (n= 72) Vírus isolado de 43 indivíduos febris	(PINHEIRO, FRANCISCO P. et al., 1981)
<b>Município de Valença - Bahia</b> Investigação epidemiológica	01 indivíduo apresentou anticorpos IH para MAYV (n= 288)	(TAVARES-NETO et al., 1986)
<b>Rio Branco – Acre</b> Investigação epidemiológica	5,4% (21) indivíduos apresentaram anticorpos para MAYV durante o ano de 1999 (n= 390) 6,3% (12) indivíduos apresentaram anticorpos para MAYV durante o ano 2000 (n= 190)	(TAVARES-NETO et al., 2004)
<b>Manaus e outros Municípios – Amazonas</b> Investigação epidemiológica	36,3% (08) IgM anti-Mayaro positivo (n= 22)	(FIGUEIREDO et al., 2004)
<b>Município de Santa Barbara – Pará</b> Investigação durante surto	34,3% (36) IgM anti-Mayaro positivo (n= 105) Vírus isolado de 02 indivíduos febris e de 01 pool de mosquitos <i>H. janthinomys</i>	(AZEVEDO et al., 2009)
<b>Município de Juruti – Pará</b> Investigação epidemiológica	1,25% (20) indivíduos com anticorpos IH positivo (n= 1.597) 05 indivíduos IgM anti-Mayaro positivos	(CRUZ et al., 2009)
<b>Município de Trairão e Novo Progresso – Pará</b> Investigação epidemiológica	5,5 % (78) indivíduos apresentou anticorpos IH positivo (n= 1.398) 12,8% (10) IgM anti-Mayaro positivos	(NUNES et al., 2009)
<b>Reserva extrativista do Rio Cajari – Amapá</b> Investigação epidemiológica	17,3% (53) indivíduos sem sintomas de doença febril apresentou anticorpos IH positivo MAYV (n= 306)	(SOUTO; SOUTO, 2012)
<b>Manaus – Amazonas</b> (Rio Pardo) Investigação epidemiológica	44,1% (119) indivíduos IgG anti-Mayaro positivo (n= 270)	(ABAD-FRANCH et al., 2012)
<b>Manaus – Amazonas</b> Investigação epidemiológica	5,2% (33) indivíduos IgM anti-Mayaro positivo (n= 631)	(MOURÃO et al., 2012)
<b>Boa vista - Roraima</b> Investigação epidemiológica	9,7% (07) indivíduos febris RNA positivo MAYV (n= 72)	(MENESES, CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO, 2013)
<b>Mato Grosso</b> Investigação durante surto	2,5% (15) indivíduos febris RNA positivo MAYV (n= 604)	(ZUCHI et al., 2014)
<b>Sinop - Mato Grosso</b> Investigação durante surto	3% (06) indivíduos febris RNA positivo MAYV (n= 200)	(VIEIRA et al., 2015)

**Figura 6. Mapa de Prevalência do vírus *Mayaro* no Brasil**



7

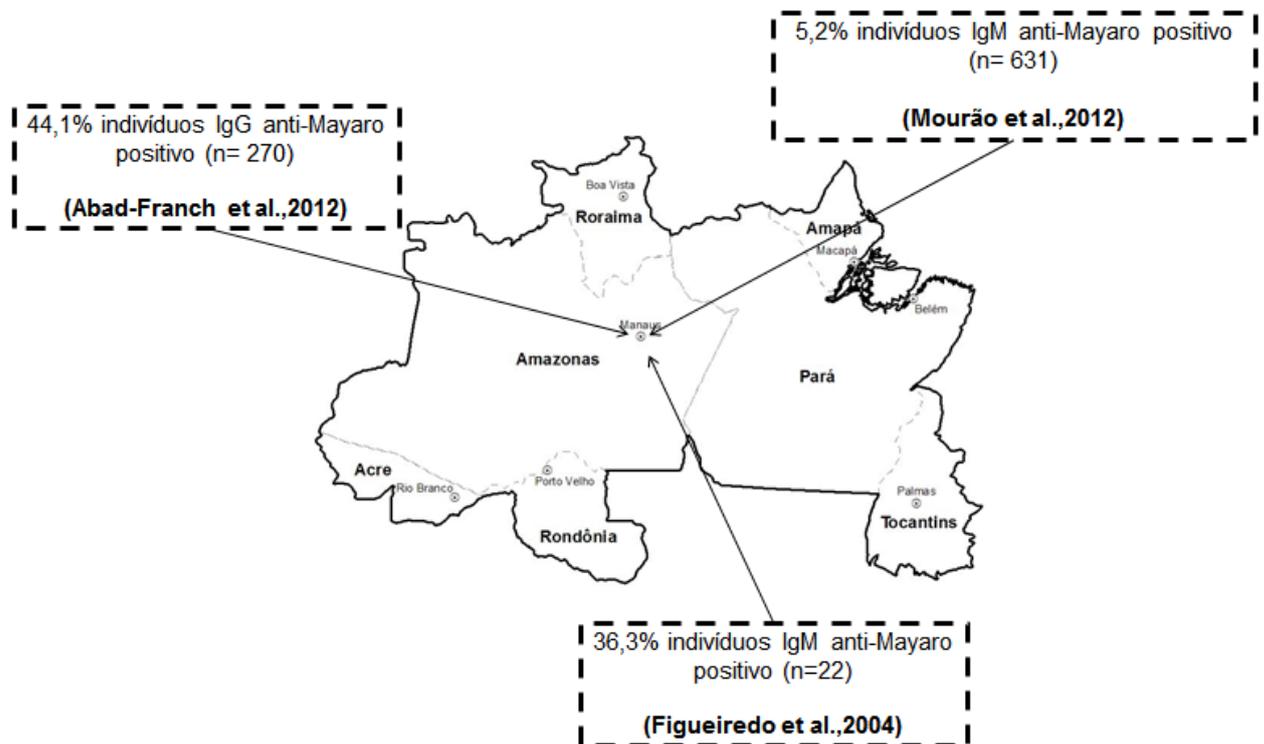
#### 4.1. Manaus – Amazonas

Em 2012, o Amazonas foi alvo de duas investigações epidemiológicas envolvendo arbovírus. A primeira foi desenvolvida por meio de um programa de vigilância de doença febril aguda, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008, na FMT-HVD (Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado), quando (n=631) pacientes foram atendidos na Fundação apresentando sintomas inespecíficos; destes, foi constatado que 5,2% (n=33) dos pacientes tinham IgM-anti-*Mayaro* positivo; e, de acordo com as análises, grande parte dos pacientes positivos eram moradores de áreas urbanas de Manaus (MOURÃO *et al.*, 2012).

A segunda investigação epidemiológica desenvolvida foi numa área rural localizada próxima às margens do rio Pardo, em que foram analisados (n=270) indivíduos sem sintomas de doença febril; 44,1% (n=119) desses indivíduos tinham anticorpos IgG positivo contra o MAYV; e, de acordo com os fatores de risco analisados, a maioria dos

indivíduos não tinha mosquiteiro e vivia próximo de terrenos com lavouras (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012).

**Figura 7. Mapa de Prevalência do vírus *Mayaro* em Manaus**



## 5 OBJETIVOS

### 5.1. Geral

- Estimar a soroprevalência do vírus *Mayaro* em Manaus e em Coari.

### 5.2. Específicos

- Padronizar o método de Imunoensaio para detecção de anticorpos IgG anti-MAYV.
- Padronizar o método de Microneutralização para detecção de anticorpos específicos anti-MAYV.
- Investigar os possíveis fatores de risco associados à infecção pelo vírus *Mayaro*.

## 6 MATERIAL E MÉTODO

### 6.1 Aspectos éticos

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas sob o n.º de CAAE19328313.7.0000.5020 (anexo 1), para coleta de amostras em humanos e armazenamento em biorrepositório. Todos os indivíduos  $\geq 18$  anos de idade que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preencheram um questionário sociodemográfico. Os modelos do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do questionário encontram-se nos anexos 2 e 3.

### 6.2. População do estudo

Este estudo foi realizado em duas cidades do Amazonas: Manaus e Coari. Em Manaus a população do estudo foi composta por doadores de sangue do HEMOAM. Em Coari o recrutamento dos sujeitos da pesquisa foi feito em três instituições: Laboratório Central da Região (LACEN), Fundação de Medicina Tropical (FMT) e Hospital Regional de Coari (HCR) (Tabela 3).

### 6.3. Amostragem

Trata-se de um estudo transversal. A amostragem foi calculada usando OpenEpi (versão 3.01). Utilizaram-se os dados do contingente populacional proporcionado pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e da Secretaria de Saúde dos municípios estudados, com frequência de 50% (valor usado para frequências desconhecidas), nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), determinando, assim, um número de 400 amostras por região.

A coleta das amostras foi realizada convenientemente em Manaus (3.1292° S, 60.0214° W) e em Coari (4.0850° S, 63.1408° W) (Figura 9 e Tabela 3). 4ml de sangue total foram coletados e centrifugados imediatamente, e o sobrenadante contendo soro foi separado em microtubos, armazenados à temperatura de -80°C até análise.

**Tabela 3. Informações sobre a população do estudo**

Município	População	Local de coleta	Período de coleta
Manaus	Doadores de sangue	HEMOAM	Outubro a dezembro de 2014
Coari	População geral	LACEN, FMT e HRC	Abril a maio de 2016

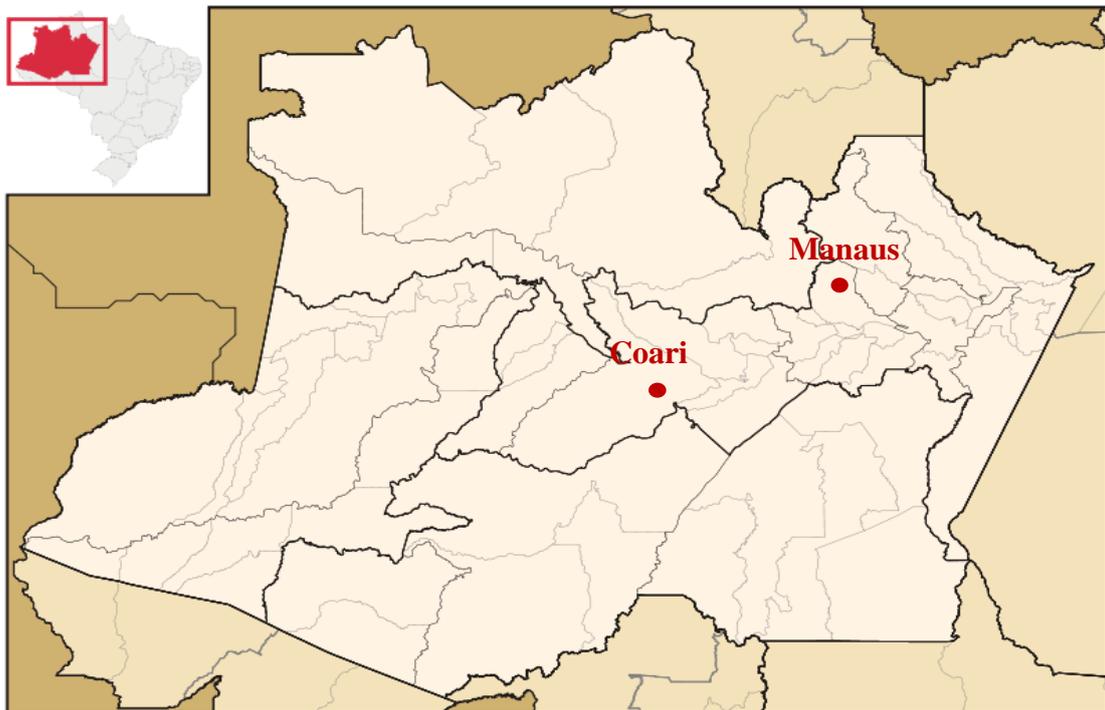


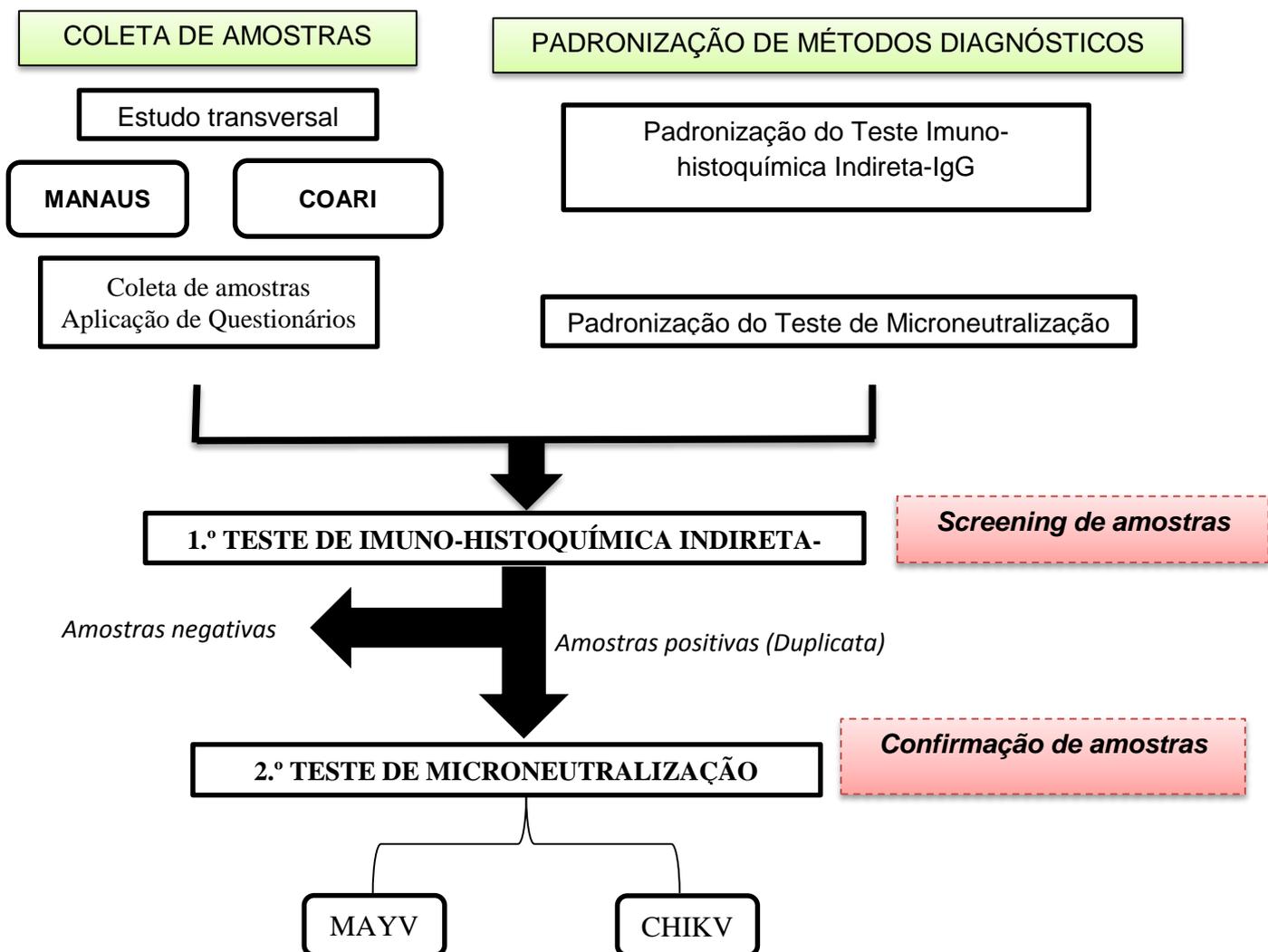
Figura 8. Localização geográfica dos municípios de Manaus e Coari, no Estado do Amazonas

## 7. CULTIVO DE LINHAGEM CELULAR

Foi utilizada a linhagem de células Baby Hamster Kidney (BHK)-21, cultivada em meio *Dulbeccos minimum essential medium* (DMEM) (SIGMA Life Science), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina. As células BHK-21 foram mantidas em frascos de cultivo de poliestireno, a uma temperatura de 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> até a formação de monocamada celular.

## 7.1 Preparo do estoque viral

Monocamada de células BHK-21 foram infectadas com o vírus *Mayaro* (MAYV) ou *Chikungunya* (CHIKV). Inicialmente foi desprezado todo o meio de cultivo da garrafa; em seguida, foram adicionados 200µl da semente viral e incubados por 1 hora em estufa à temperatura de 37 °C, homogeneizando a garrafa a cada 15 minutos. Após 1 hora de incubação, foi adicionado 5ml de meio de cultivo DMEM e incubados na estufa por 4 a 5 dias. As células foram observadas diariamente para avaliação do efeito citopático. Após lisar >90% das células, todo o conteúdo da garrafa foi recolhido para um tubo de 15ml e centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos. Em seguida, as partículas virais foram distribuídas em microtubos e armazenadas em *freezer* a -80 °C.



## Figura 9. Delineamento experimental

### 7.2 Titulação do vírus pelo método de *Tissue culture infectious dose 50%* (TCID<sub>50</sub>)

A titulação do MAYV e CHIKV foi feita pelo método de TCID<sub>50</sub> e calculada pelo método de Reed e Muench. Foi utilizadas placas de 96 poços com confluência de 90% das células BHK-21 para titulação viral. O vírus foi, primeiramente, descongelados e diluídos progressivamente (10<sup>1</sup> até 10<sup>8</sup>) em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Em seguida, todo o meio de cultura da placa de 96 poços foi desprezado e em seguida, adicionados 100µl de vírus diluídos em quadriplicata. Para o controle, foi adicionado às células somente o meio de cultivo DMEM suplementado com 2% de SFB. Depois, a placa foi incubada em estufa a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, por 4 dias. Após esse interregno, as células foram fixadas com formaldeído a 2% por 10 minutos e coloridas com o corante azul de brilhante por 10 minutos e lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante. Após a revelação da placa, foi feito um cálculo para saber a titulação do vírus.

#### Fórmula para o cálculo do TCID<sub>50</sub>

PROPORTIONATE DISTANCE (PD)	=	(% mortality at dilution next above 50%) - 50%
		-----
(% mortality at next Dilution above 50%)	_	(% mortality at next dilution below 50%)

## 8 Teste de Imunoensaio enzimático Indireto para detecção de anticorpos IgG anti-MAYV

A padronização do imunoensaio foi feita de acordo com as seguintes etapas:

- 1) Bloqueio das reações inespecíficas: o bloqueio foi testado com soro fetal bovino a 5% em PBS, soro de cavalo a 5% em PBS, *Bovineserum albumin* (BSA) a 1% em PBS e leite em pó desnatado a 1 e 10% em PBS. Após todos os testes, o leite em pó a 10% mostrou menor *background* à leitura espectrofotométrica das microplacas; ao fim do teste, foi a mais adequada para uso no ensaio.
- 2) Concentração dos anticorpos primários e secundários: a técnica de *checkerboard* foi usada para determinar concentrações de anticorpos primários ou amostras de pacientes, e secundário ou anticorpo anti-humano conjugado com enzima *Horse Radish Peroxidase* (HRP). Assim, foram feitas diluições seriadas de amostras positivas e negativas (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000) e anticorpo secundário (1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000) para realizar o ensaio (Figura 8). Também, para compreender melhor a reatividade das amostras dos pacientes, foram usadas três amostras positivas com título de anticorpos baixo, médio e alto previamente testados contra MAYV pelo teste de Inibição de Hemaglutinação (HAI). Após o ensaio, a diluição 1:1000 de anticorpo primário e a de 1:10000 para anticorpo secundário foram melhores para discriminação das amostras positivas e negativas nos imunoensaios padronizados.

Figura 10. Padronização das diluições de anticorpos primário e secundário

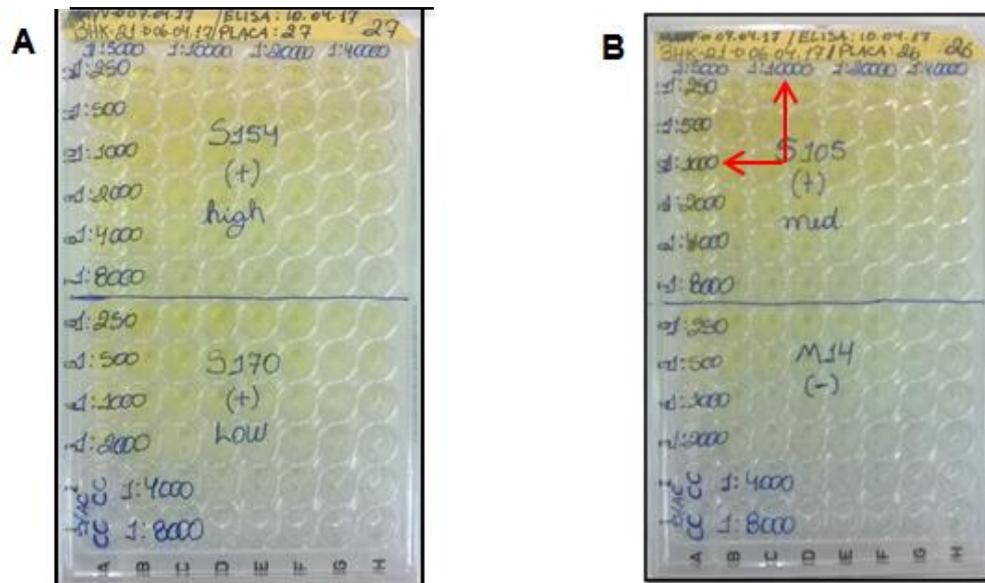
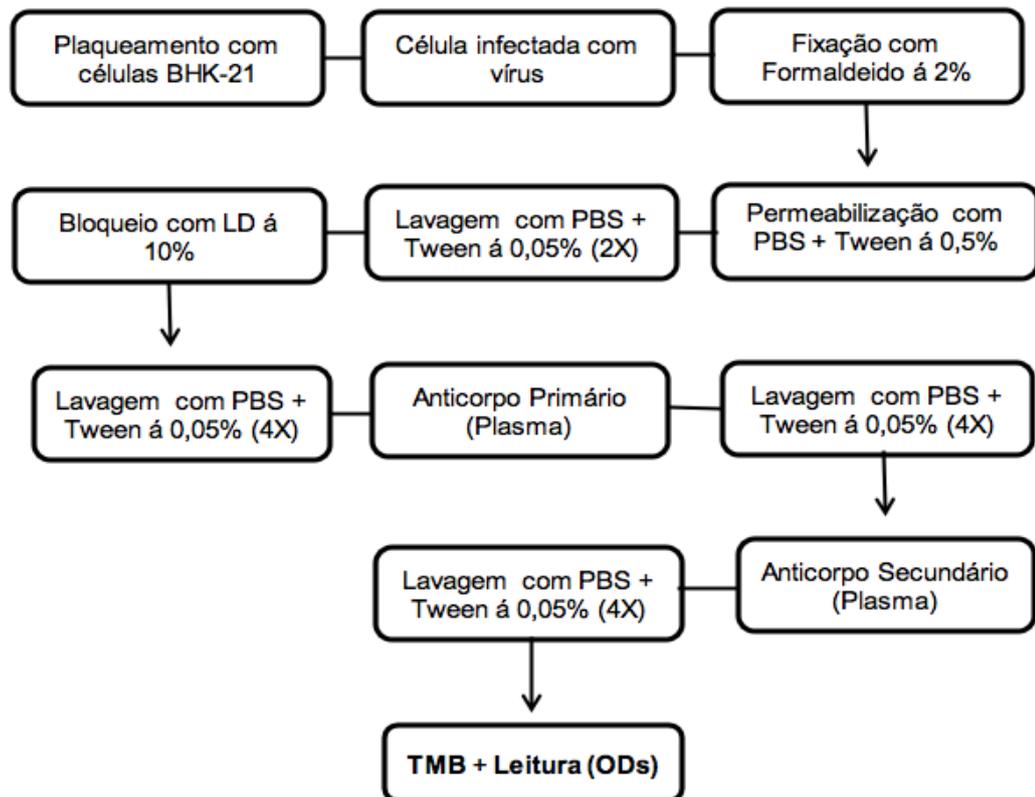


Figura 10. Padronização das diluições de anticorpos primário e secundário. O método do *checkerboard* foi utilizado para determinar a diluição dos anticorpos primários e secundários para o ensaio. Figuras A e B demonstram o desenho do ensaio realizado. Placa A tem amostras S154 positivo *high* (+++) e S170 positivo *low* (+); e Placa B tem amostras S105 positivo médio (++) e M14 negativo para MAYV testado previamente com teste de HAI. As amostras dos pacientes foram diluídas em filas (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000); e os anticorpos secundários, em colunas (1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000) para cada amostra. Todas as amostras foram avaliadas em duplicatas. Além disso, foram incluídos outros controles negativos na parte posterior da placa. Ao fim, o substrato TMB foi adicionado; a leitura feita a 450nm; e o resultado analisado. As diluições de 1:1000 para o anticorpo primário e de 1:10000 para o anticorpo secundário exibiram melhores resultados e foram usadas em todos os ensaios subsequentes.



**Figura 11. Fluxograma do roteiro utilizado para o Imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgG contra MAYV**

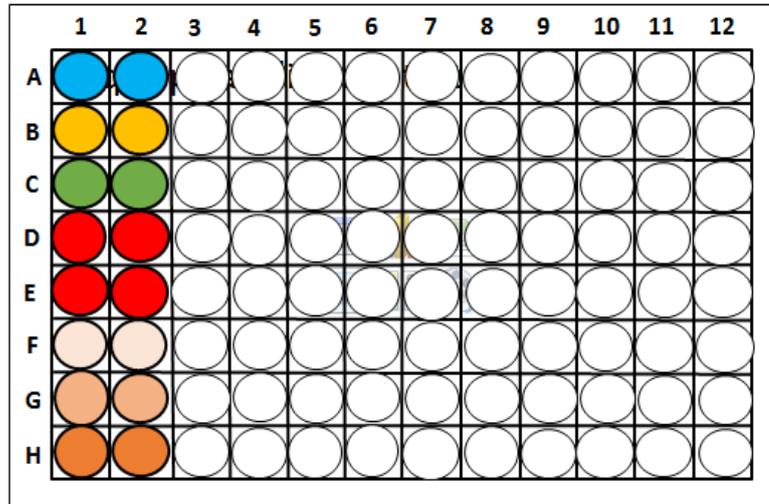
O teste é uma modificação do teste de ELISA indireto. Primeiramente, as células BHK-21 foram cultivadas em placa de 96 poços, sendo em seguida infectada com 100 TCID<sub>50</sub> MAYV e incubadas por 3 dias. Após isso, o sobrenadante foi desprezado, e as células fixadas com 2% de formaldeído e incubadas por mais 30 minutos em temperatura ambiente para a fixação do antígeno na placa. A placa foi permeabilizada com PBS-Tween a 0,5% e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada por duas vezes com solução de lavagem PBS-T 0,05%; foi realizado, então, o bloqueio, utilizando leite desnatado a 10% (LD 10%), diluído em PBS e incubado por 2 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada por 4 vezes com solução de lavagem PBS-T 0,05%, e foram adicionados os controles e as amostras dos pacientes na diluição 1:1000 (PBS-T + LD10%). Após adição dos anticorpos primários, a microplaca foi incubada por 60 minutos a 37°C, homogeneizando a cada 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com PBS-T, e foram adicionados os anticorpos secundários na diluição de

1:10000 (PBS-T + LD10%) anti-IgG humano, específico para cadeia  $\gamma$ , conjugada com peroxidase (Thermo Fisher Scientific, EUA). Foi realizada a incubação por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, homogeneizando a cada 15 minutos e, ao fim, procedeu-se à lavagem 4 vezes com PBS-T. Foi, então, adicionado o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), e a reação foi bloqueada com a adição de ácido sulfúrico 3M em cada poço. As leituras das microplacas foram feitas a 450nm (CHAMELEON™ V).

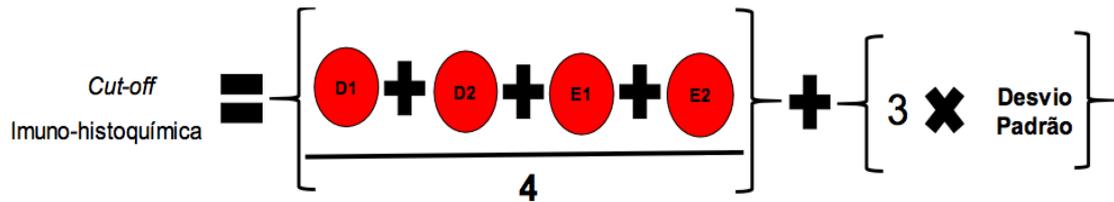
#### 8.1 Desenho do ensaio na placa e cálculo do *Cut-Off*

Após padronização do ensaio, o seguinte formato da placa (incluindo controles negativo e positivo) foi estabelecido para testar as amostras dos pacientes (Figura 12). Todas as amostras e os controles foram testados em duplicata. Utiliza-mos controles internos para determinar a validade do ensaio.

Figura 12. Desenho do ensaio da placa e cálculo do *Cut-Off*



	Antígeno ou BHK-21 células infectadas com o <i>Mayaro</i> vírus	Anticorpo primário ou amostra de paciente (1:1000)	Anticorpo secundário ou anti-humano conjugado com HRP (1:10000)
	-	-	-
	+	-	-
	+	-	+
	+	+ (Negativo)	+
	+	+ (Positivo ≤20 HI)	+
	+	+ (Positivo ≤160 HI)	+
	+	+ (Positivo ≥320 HI)	+
	+	+	+
		(amostra de paciente)	



Resultado Imuno-histoquímica

Amostra Positiva	> Cut-off
Amostra Negativa	< Cut-off

## 9 TESTE DE MICRONEUTRALIZAÇÃO

Este teste está fundamentado no princípio de que o vírus infeccioso, quando interage com os anticorpos específicos, é neutralizado e, por conseguinte, perde a capacidade de infectar células permissivas. O teste é realizado em duas etapas. Na primeira etapa, o vírus infeccioso e o anticorpo são misturados e incubados para que ocorra a interação vírus-anticorpo. Na segunda, alíquotas da mistura vírus-anticorpo são inoculadas em cultura de células. Após a incubação, a cultura é observada para visualizar se houve efeito citopático. Se os anticorpos se ligaram ao vírus na primeira etapa, este será neutralizado e não irá infectar a cultura de células. Consequentemente, não haverá efeito citopático. Se os anticorpos não se ligarem ao vírus na primeira etapa, o vírus permanecerá infeccioso e irá infectar a cultura de células, produzindo efeito citopático. Esse teste pode ser usado para identificação de vírus ou para avaliação do nível de anticorpos. O teste de neutralização detecta anticorpos totais (IgM e IgG), sem discriminar a classe de imunoglobulina.

Os testes de neutralização do MAYV e CHIKV foram feitos utilizando o método de Microneutralização em células BHK-21. Primeiramente, foi feita a diluição seriada do plasma ( $10^{-20}$ ,  $10^{-100}$ ,  $10^{-500}$  e  $10^{-2,500}$ ) e incubado com 100 TCID<sub>50</sub> do vírus MAYV ou CHIKV por uma hora, a 37°C. Em seguida, foi desprezado todo o meio de cultura que estava na placa de 96 poços com célula BHK-21, e foram adicionados 100µl da mistura de vírus e soro do paciente. Também foi incluído no ensaio o controle de células, o controle de vírus e o controle positivo para MAYV. A placa foi incubada na estufa a 37 °C com 5%

de CO<sub>2</sub> por 4 dias. Após o período de incubação, a placa passou pelo processo de fixação com formaldeído a 2% por 10 minutos e coloração com o corante azul de brilhante por 10 minutos e lavada em água corrente para tirar o excesso do corante. Após a revelação da placa o título dos anticorpos foi calculado.

## **10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados epidemiológicos gerados pelos questionários aplicados nas populações estudadas, com informações ligadas ao próprio indivíduo e/ou ao ambiente que o cerca, foram analisados pelos programas estatísticos R, Prism (GraphPad, versão 5), MedCalc (versão 16.8.4). Foi realizada uma avaliação geral da população do estudo, enquanto as informações inerentes a cada município, comparações entre sexo e entre as populações de Manaus e Coari foram analisadas separadamente. Para a análise das variáveis qualitativas, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Modelos de regressão logística univariada e multivariada foram elaborados para analisar a força de associação entre variáveis independentes e a variável-resposta, ambos para  $\alpha$  de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## **11 RESULTADOS**

### **11.1 Caracterização da população estudada**

A população total do estudo foi de 900 indivíduos, dos quais 52,8% (n=468) eram do sexo masculino. Com relação à faixa etária, a maioria pertencia à faixa etária de 20 a 29 anos (31,3%). A respeito da renda familiar mensal, 46,5% (n= 373) da população total possuíam até 1 salário-mínimo. Com relação ao nível de escolaridade dos indivíduos investigados, o nível superior incompleto foi mais frequente na população total, com 37,1%. E, quanto à ocupação, 17% (n=143) dos participantes do estudo estavam desempregados (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização da população estudada

Características sociais, demográficas e econômicas	Total		Manaus		Coari	
	%	n	%	n	%	n
<b>Gênero</b>						
Masculino	52,8%	468	74,9%	334	30,4%	134
Feminino	47,2%	419	25,1%	112	69,6%	307
<b>Faixa etária (em anos)</b>						
18-19	7,1%	62	5,3%	23	8,9%	39
20-29	31,3%	274	32,4%	141	30,2%	133
30-39	28,2%	247	35,9%	156	20,7%	91
40-49	17,5%	153	19,5%	85	15,5%	68
50-59	10,4%	91	6,4%	28	14,3%	63
60-69	3,9%	34	0,5%	2	7,3%	32
≥ 70	1,6%	14	-	-	3,2%	14
<b>Cor da pele / raça</b>						
Branca	11,1%	91	14,8%	63	7,1%	28
Negra	6,6%	54	8,0%	34	5,1%	20
Parda	75,2%	617	69,8%	298	81,2%	319
Amarela	2,4%	20	2,6%	11	2,3%	9
Indígena	2,2%	18	2,1%	9	2,3%	9
Negra x índia	1,1%	9	0,9%	4	1,3%	5
Branca x índia	0,5%	4	0,7%	3	0,3%	1
Branca x negra	0,9%	7	1,2%	5	0,5%	2
<b>Renda familiar mensal (em salários mínimos - SM)</b>						
Até 1 SM	46,5%	373	18,3%	77	77,5%	296
2 SM	24,2%	194	32,1%	135	15,4%	59
3 SM	10,6%	85	17,6%	74	2,9%	11
4 SM	7,7%	62	13,1%	55	1,8%	7
≥ 5 SM	11%	88	18,8%	79	2,4%	9
<b>Escolaridade</b>						
Analfabeto	6,4%	55	0,2%	1	12,5%	54
Alfabetizado	2,4%	21	0,5%	2	4,4%	19
Ensino fundamental incompleto	10,4%	90	1,6%	7	19,2%	83
Ensino médio incompleto	7,7%	67	3,2%	14	12,2%	53
Ensino fundamental completo	5,5%	48	3,7%	16	7,4%	32
Ensino médio completo	4%	35	3,9%	17	4,2%	18
Superior incompleto	37,1%	321	44,3%	192	29,8%	129
Superior completo	13%	113	23,6%	102	2,5%	11
Não sabe	0,3%	3	18,9%	82	0,7%	3
<b>Ocupação</b>						
Desempregado	17%	143	9,7%	41	24,5%	102
Altos funcionários de governo ou empresa	2,4%	20	3,3%	14	1,4%	6
Profissionais de nível superior	7,9%	66	12,1%	51	5%	21
Profissionais das artes	0,1%	1	0,2%	1	0%	0%
Profissionais ou técnicos de nível médio	8,8%	74	12,5%	53	5%	21
Serviços administrativos	7%	59	7,3%	31	6,7%	28
Prestação de serviços e comerciários	15,4%	129	15,8%	67	14,9%	62
Serviços domésticos	8,8%	74	2,4%	10	15,3%	64
Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesca	10%	84	0,7%	3	19,4%	81
Produção de bens e serviços industriais	5,2%	44	9,5%	40	1%	4
Trabalhadores manuais de construção civil	2,7%	23	3,5%	15	1,9%	8
Trabalhadores manuais de reparação e manutenção	1,7%	14	3,3%	14	1,9%	8
Membro das forças armadas, policiais e bombeiros	5,7%	48	10,9%	46	0,5%	2
Ocupações mal especificadas e trabalho informal	1,2%	10	1,4%	6	1%	4
Autônomo	5%	42	6,4%	27	3,6%	15

## 12 INQUÉRITO SOROLÓGICO

Foram analisadas 449 amostras do município de Manaus e 451 de Coari. No teste de imunoensaio enzimático, as 900 amostras foram testadas em duplicatas, resultando em 565 negativas e 335 positivas para anticorpos contra o MAYV. As amostras positivas foram confirmadas por meio do teste de microneutralização e testadas em quatro diluições ( $10^{20}$ ,  $10^{100}$ ,  $10^{500}$ ,  $10^{2.500}$ ). Ao todo, 324 amostras foram positivas, 564 negativas e 12 indeterminadas. Dentre as amostras positivas, 261 (80,6%) eram de Coari e 63 (19,4%) de Manaus (figura 13). A partir desses resultados, todas as análises foram feitas excluindo-se as 12 amostras cujo resultado foi indeterminado. As amostras que apresentaram o título de anticorpo específico para o MAYV quatro vezes maior comparado ao título de anticorpo específico para o *chikungunya* foram consideradas positivas para *Mayaro*, conforme os critérios de confirmação do Center for Disease Control and Prevention (CDC).

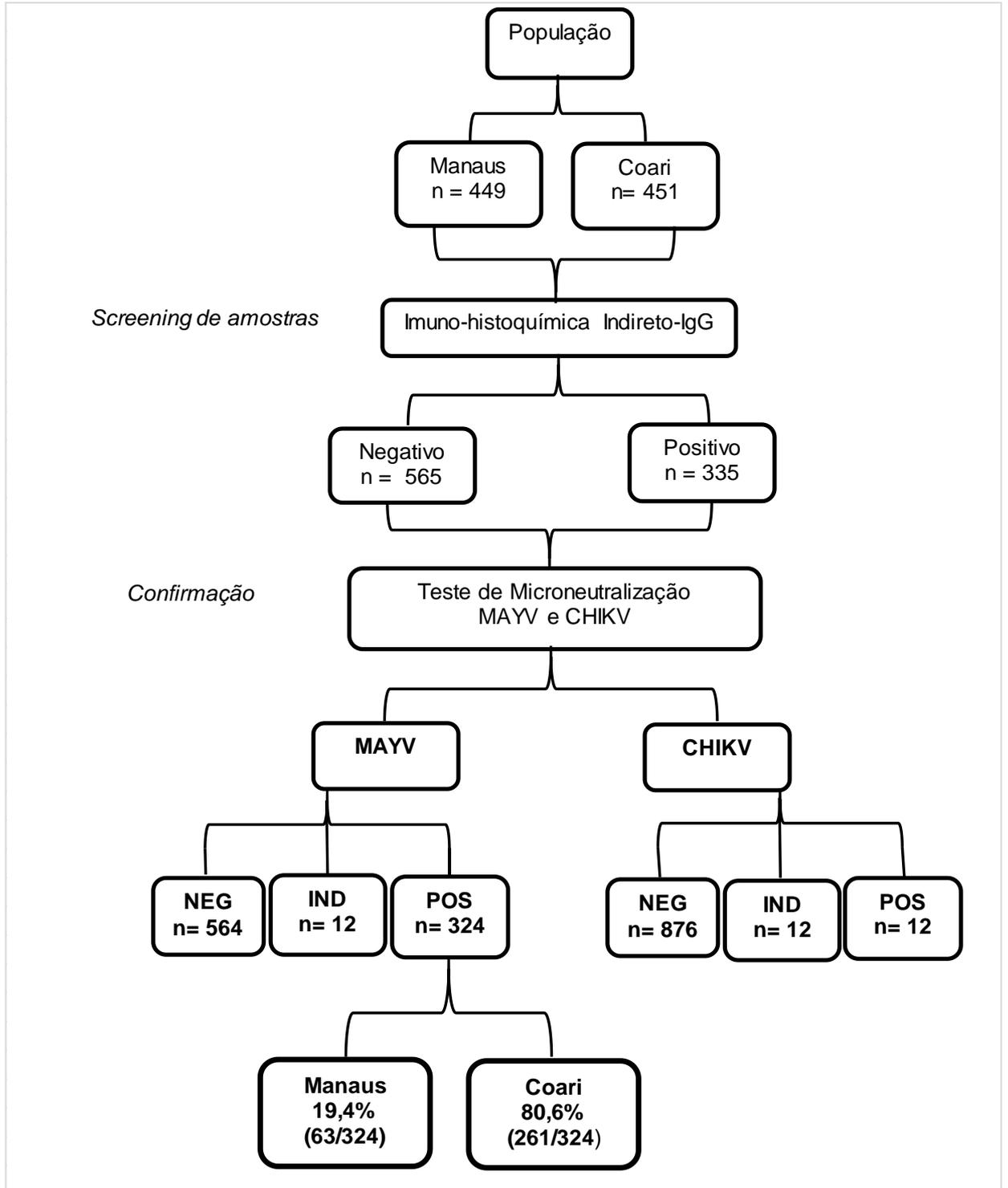
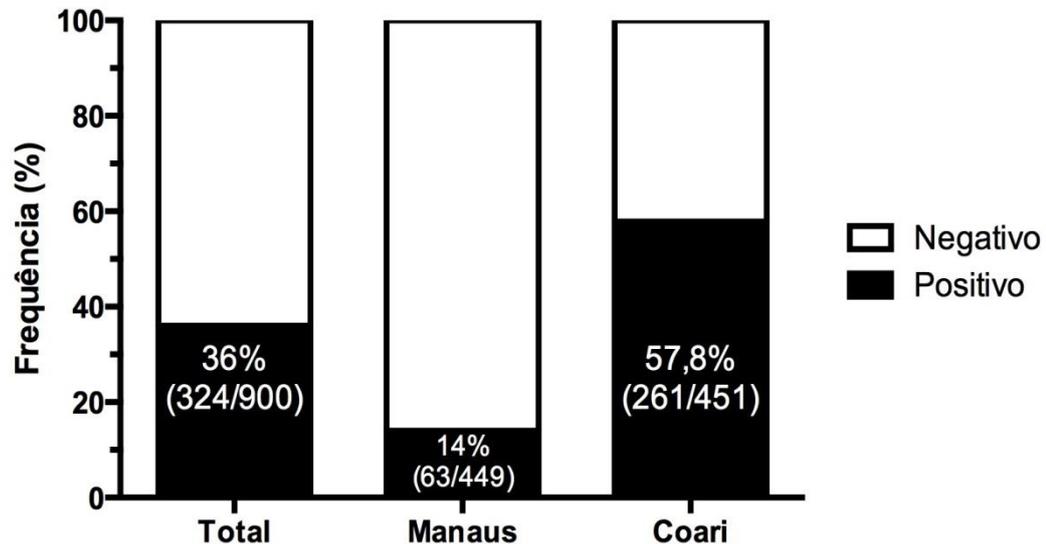


Figura 13. Fluxograma dos resultados realizados no imunoensaio. MAYV= vírus *Mayaro*, CHIKV= vírus *chikungunya*, NEG = Negativo, IND= Indeterminado e POS= Positivo.

A soroprevalência do vírus *Mayaro* na população geral foi de 36%. Na população de Coari a soroprevalência foi de 57,8% [ $p < 0,0001$ ; OR= 8,8 (IC<sub>95%</sub> 6,37 – 12,25)]; e em doadores de sangue de Manaus, 14% (Figura 14).

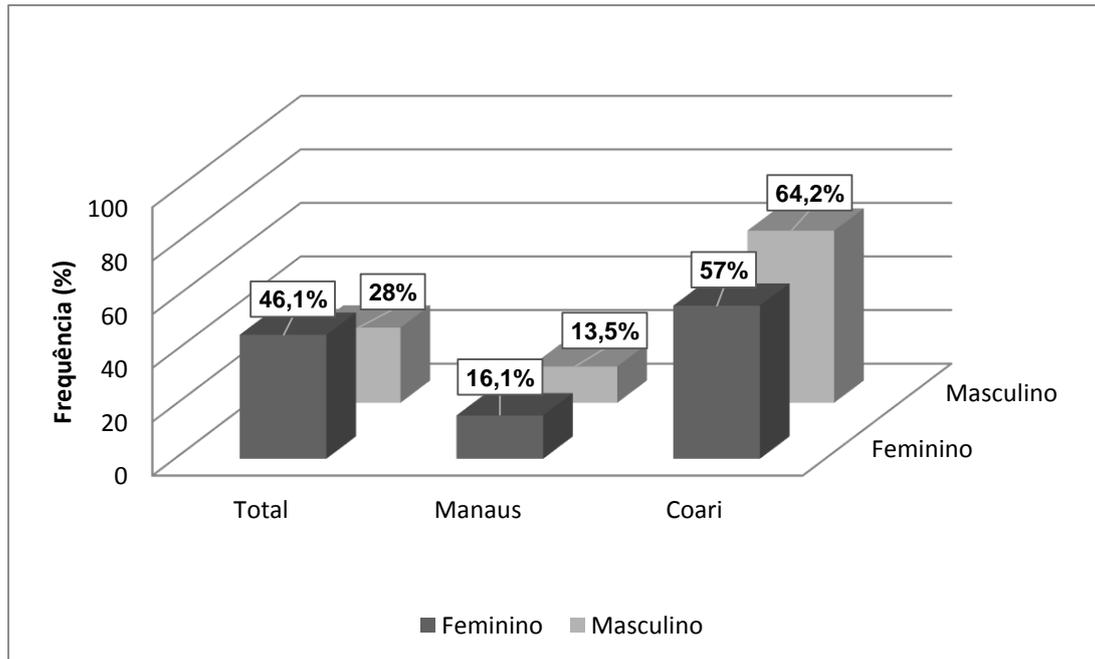


**Figura 14. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população de estudo.**

Dentre as 419 mulheres participantes do estudo, 193 (46,1%) delas apresentaram anticorpos IgG específicos para o MAYV. Entre os homens a soroprevalência foi de 28%. Em Coari, a maior prevalência foi no sexo masculino (64,2%); resultado oposto foi observado em Manaus (Tabela 5 e Figura 15).

**Tabela 5. Soroprevalência do vírus *Mayaro* de acordo com o sexo.**

<u>Sexo</u>	<u>Total</u> % (n / N)	<u>Manaus</u> % (n / N)	<u>Coari</u> % (n / N)
Masculino	28% (131/468)	13,5% (45/334)	64,2% (86/134)
Feminino	46,1% (193/419)	16,1% (18/112)	57% (175/307)
Total (n)	324	63	261
Valor de $p$	<b><math>p &lt; 0,0001</math></b>	$p = 0,4949$	$p = 0,159$

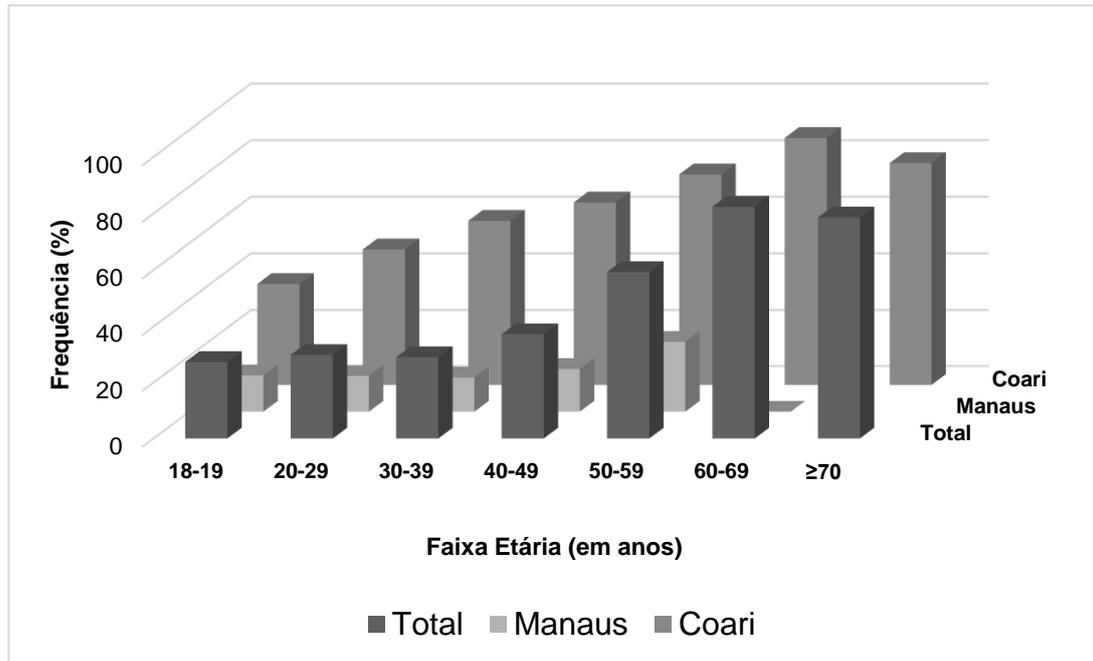


**Figura 15. Soroprevalência do vírus *Mayaro* de acordo com o sexo**

Na população geral e em Coari a prevalência da infecção por MAYV aumentou de acordo com a idade ( $p < 0,0001$ ), conforme indicado na Tabela 6 e na Figura 16.

**Tabela 6. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo a faixa etária**

Faixa etária (anos)	Total	Manaus	Coari
	% (n / N)	% (n / N)	% (n / N)
18 - 19	27,4% (17/62)	13% (3/23)	35,9% (14/39)
20 - 29	29,9% (28/274)	12,8% (18/141)	48,1% (64/133)
30 - 39	29,1% (72/247)	12,2% (19/156)	58,2% (53/91)
40 - 49	37,3% (57/153)	15,3% (13/85)	64,7% (44/68)
50 - 59	59,3% (54/91)	25% (7/28)	74,6% (47/63)
60 - 69	82,4% (28/34)	0% (0/2)	87,5% (28/32)
≥ 70	78,6% (11/14)	-	78,6% (11/14)
Total (n)	267	60	261
Valor de $p$	$p < 0,0001$	$p = 0,5616$	$p < 0,0001$

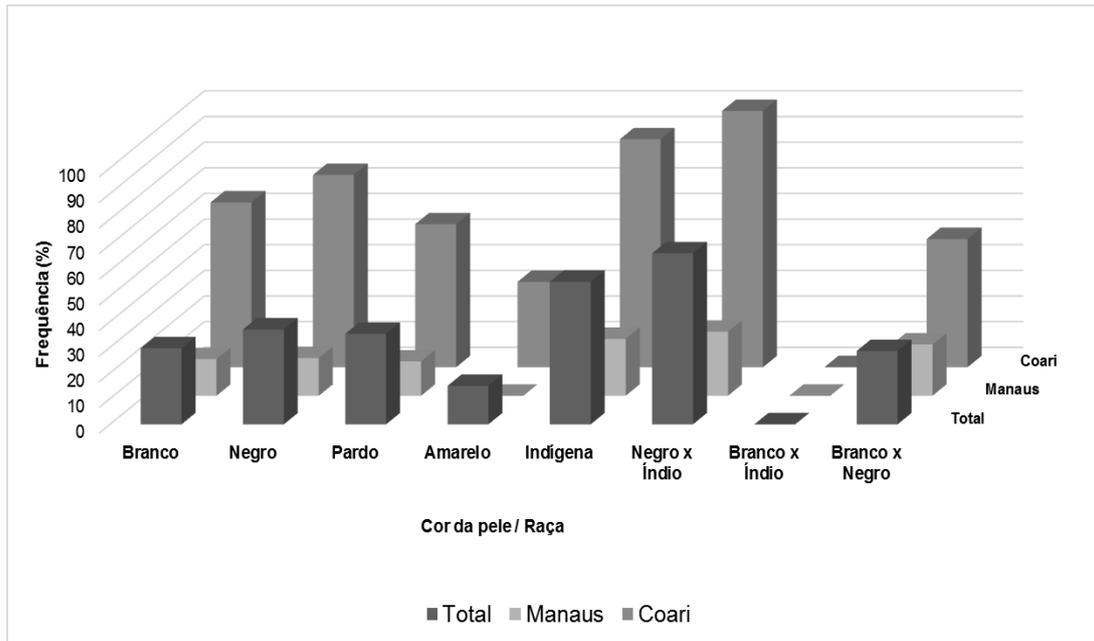


**Figura 16. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo faixa etária**

Em relação à cor da pele/raça, tanto na população geral quanto em Coari, a maior prevalência foi observada naqueles que se autodeclararam negro/índio ( $p=0,0447$ ) (Tabela 7 e Figura 17).

**Tabela 7. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo cor da pele/raça**

Cor da pele/Raça	Total		Manaus		Coari	
	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)
Branco	29,7%	27/91	14,3%	9/63	64,3%	18/28
Negro	37%	20/54	14,7%	5/34	75%	15/20
Pardo	35,3%	218/617	13,4%	40/298	55,8%	178/319
Amarelo	15%	3/20	0%	0/11	33,3%	3/9
Indígena	55,6%	10/18	22,2%	2/9	88,9%	8/9
Negro x Índio	66,7%	6/9	25%	1/4	100%	5/5
Branco x Índio	0%	0/4	0%	0/3	0%	0/1
Branco x Negro	28,6%	2/7	20%	1/5	50%	1/2
Total (n)		286		58		228
Valor de $p =$		$p= 0,0447$		$p= 0,8392$		$p= 0,0463$

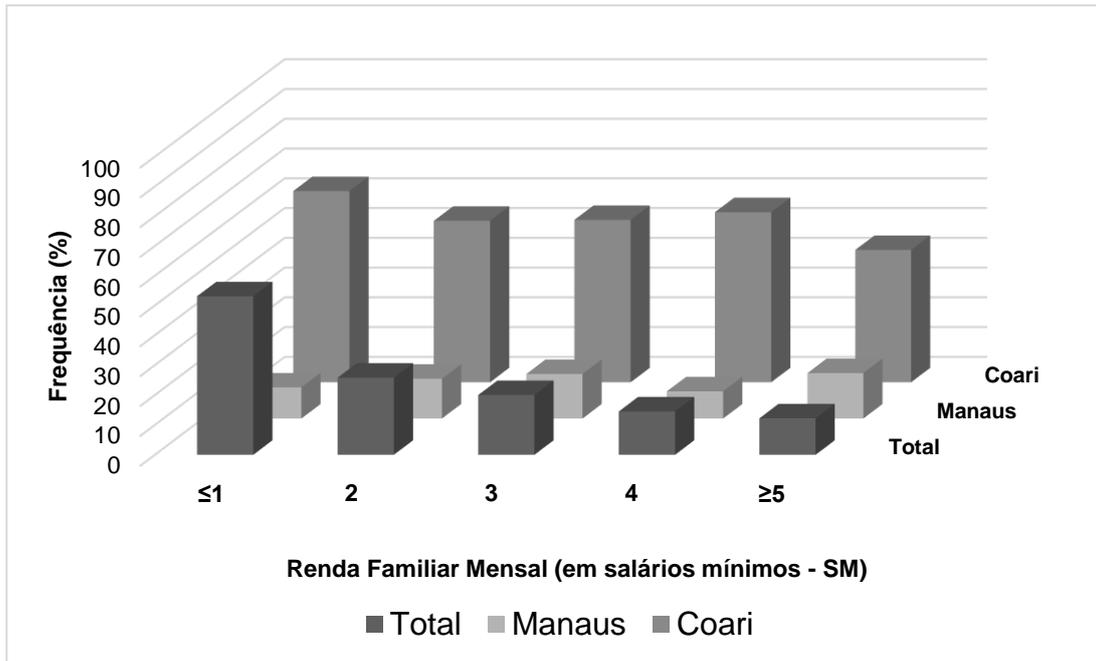


**Figura 17. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população total e entre municípios segundo cor da pele/raça**

Quando a população geral foi analisada quanto à renda familiar mensal, medida por salário-mínimo (R\$880,00), constatou-se maior prevalência do MAYV em indivíduos com renda familiar de até 1 salário-mínimo ( $p < 0,0001$ ). Em Coari o resultado foi semelhante, mas não houve diferença estatística significante. Entretanto, no município de Manaus, a maior soroprevalência foi no grupo com renda familiar  $\geq 5$  salários-mínimos, entretanto não houve diferença estatística significante (Tabela 8 e Figura 18).

**Tabela 8. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo renda familiar**

Renda Familiar	Total		Manaus		Coari	
	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)
<b>Até 1 SM</b>	53,1%	198/373	10,4%	8/77	64,2%	190/296
<b>2 SM</b>	25,8%	50/194	13,3%	18/135	54,2%	32/59
<b>3 SM</b>	20%	17/85	14,9%	11/74	54,5%	6/11
<b>4 SM</b>	14,5%	9/62	9,1%	5/55	57,1%	4/7
<b><math>\geq 5</math> SM</b>	18,2%	16/88	15,2%	12/79	44,4%	4/9
Total (n)		290		54		236
Valor de $p =$	$p < 0,0001$		$p = 0,7739$		$p = 0,4625$	

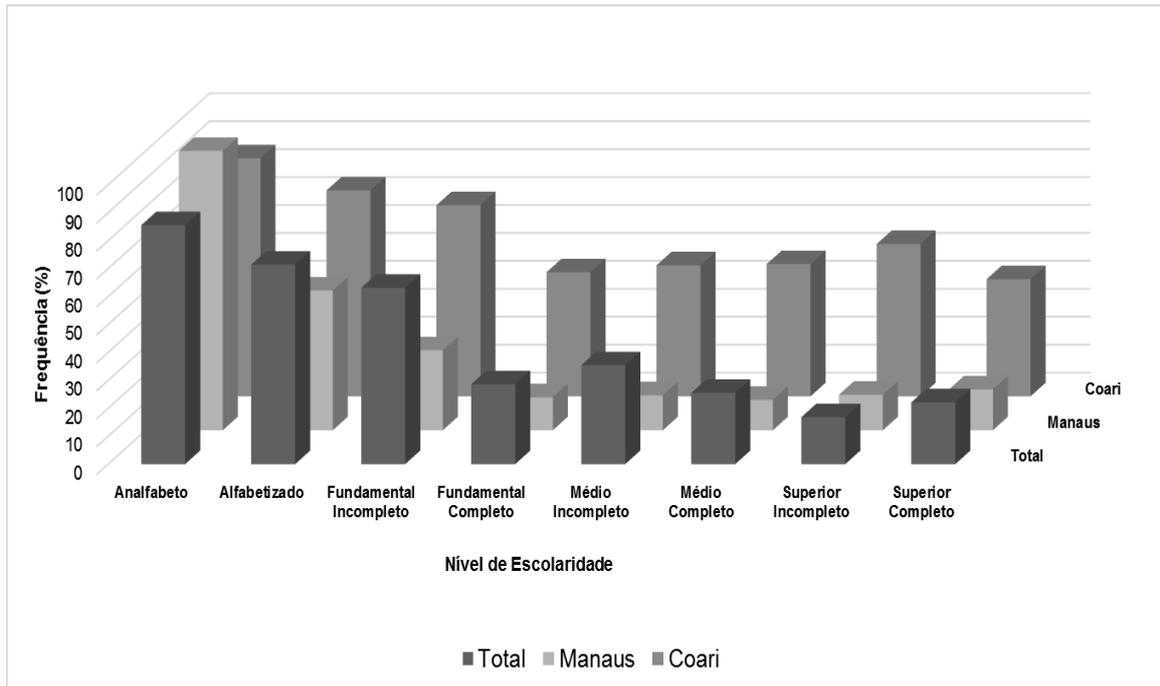


**Figura 18. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo a renda familiar**

Quanto ao nível de escolaridade, a população geral e a população de Coari apresentaram maior prevalência para MAYV nos indivíduos que se autodeclararam analfabetos ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 9 e Figura 19). Em Manaus o resultado foi semelhante, porém não houve diferença estatística significativa.

**Tabela 9. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo escolaridade**

Escolaridade	Total		Manaus		Coari	
	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)
<b>Analfabeto</b>	85,5%	47/55	100%	1/1	85,2%	46/54
<b>Alfabetizado</b>	71,4%	15/21	50%	1/2	73,7%	14/19
<b>Fundamental incompleto</b>	63,1%	99/157	28,6%	2/7	68,4%	93/136
<b>Fundamental completo</b>	28,6%	10/35	11,8%	2/17	44,4%	8/18
<b>Médio incompleto</b>	35,4%	17/48	12,5%	2/16	46,9%	15/32
<b>Médio completo</b>	25,5%	82/321	10,9%	21/192	47,3%	61/129
<b>Superior Incompleto</b>	16,8%	19/113	12,7%	13/102	54,5%	6/11
<b>Superior completo</b>	22,1%	25/113	14,6%	12/82	41,9%	13/31
Total (n)		314		54		256
Valor de $p =$		$p < 0,0001$		$p = 0,0782$		$p < 0,0001$



**Figura 19. Soroprevalência do vírus *Mayaro* segundo a escolaridade**

Foi investigada a associação da ocupação com a soroprevalência para MAYV. Na população geral, a maior prevalência de MAYV (82,1%) foi observada no grupo dos trabalhadores agropecuários, florestais de caça e de pesca ( $p < 0,0001$ ). Na população de Coari resultado semelhante foi observado ( $p < 0,0002$ ) (Tabela 10). Aplicou-se regressão logística univariada, pelo método *stepwise*, para avaliar a influência das ocupações na prevalência da população de Coari, e o resultado indicou que há associação do trabalho agropecuário e florestal como maiores fatores de risco para adquirir infecção pelo MAYV ( $p < 0,0001$ ; OR= 4,69 (IC<sub>95%</sub> 2,50 – 8,82)).

**Tabela 10. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população total e entre municípios segundo ocupação**

Ocupação	Total		Manaus		Coari	
	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)	% (Pos)	(n/N)
Desempregado	37,8%	54/143	17,1%	7/41	46,1%	47/102
Altos funcionários de governo ou empresa	25%	5/20	21,4%	3/14	33,3%	2/6
Profissionais de nível superior	24,2%	16/66	11,8%	6/51	66,7%	10/15
Profissionais das artes	0%	0/1	0%	0/1	-	
Profissionais ou técnicos de nível médio	24,3%	18/74	15,1%	8/53	47,6%	10/21
Serviços administrativos	35,6%	21/59	16,1%	5/31	57,1%	16/28
Prestação de serviços e comerciários	33,3%	43/129	14,9%	10/67	53,2%	33/62
Serviços domésticos	50%	37/74	10%	1/10	56,2%	36/64
Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesc	82,1%	69/84	33,3%	1/3	84%	68/81
Produção de bens e serviços industriais	9,1%	4/44	2,5%	1/40	75%	3/4
Trabalhadores manuais de construção civil	34,8%	8/23	20%	3/15	62,5%	5/8
Trabalhadores manuais de reparação e manutenção	7,1%	1/14	7,1%	1/14	-	
Membro das forças armadas, policiais e bombeiros	12,5%	6/48	10,9%	5/46	50%	1/2
Ocupações mal especificadas e trabalho informal	70%	7/10	50%	3/6	100%	4/4
Autônomo	31%	13/42	14,8%	4/27	60%	9/15
<b>Valor de p</b>	<b>p &lt; 0,0001</b>		<b>p= 0,3988</b>		<b>p= 0,0002</b>	

Tabela 10. Soroprevalência e número de amostras positivas da população total e entre municípios, testadas por Imuno-histoquímica Indireta-IgG e confirmadas por teste de microneutralização para vírus *Mayaro* segundo ocupação. Valor de  $p$  = teste do Qui-Quadrado( $\chi^2$ ). (n= número de amostras positivas, N= número total de amostras analisadas).

Figura 20. Soroprevalência na população positiva de Manaus e Coari segundo histórico clínico

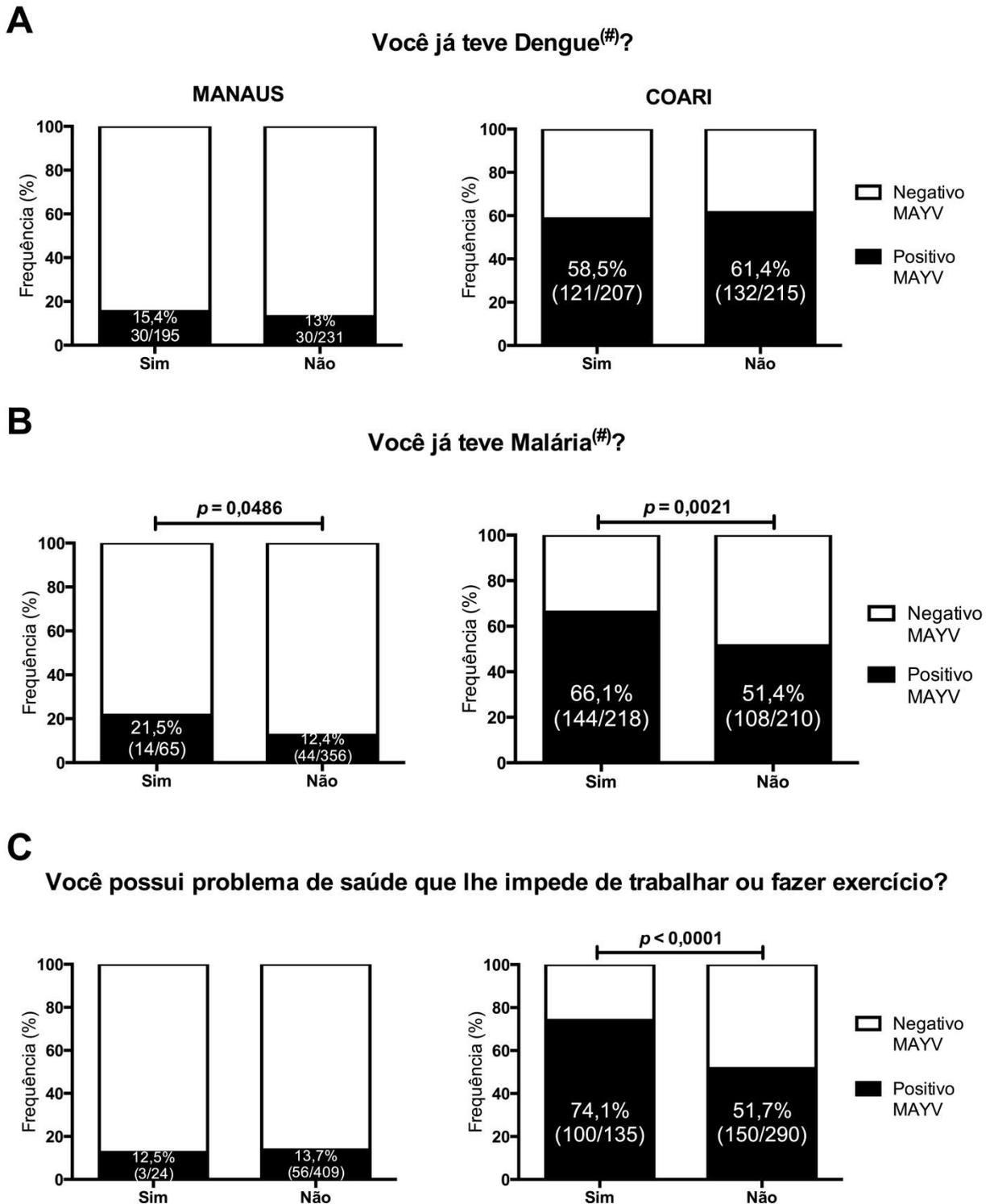


Figura 20. Soroprevalência na população positiva de Manaus e Coari testada por Imuno-histoquímica indireta-IgG e confirmada por teste de microneutralização para o vírus *Mayaro*

segundo relato clínico. Prevalência da população dos municípios em relação a histórico de (A) dengue, (B) malária e (C) problema de saúde. Valor de  $p$  = teste do Quiquadrado ( $\chi^2$ ). (#) = resposta autodeclarada do indivíduo participante no estudo.

Ao analisar a associação de histórico clínico de dengue e a infecção por MAYV, por meio da resposta autodeclarada dos participantes do estudo, não foi observada diferença estatística significativa na população geral e nos municípios estudados (Tabela 11 e a Figura 20). No entanto houve associação entre o histórico de malária e a infecção por MAYV, tanto na população geral ( **$p < 0,0001$** ) quanto na população de Coari ( **$p = 0,0021$** ) (Tabela 11).

Em relação aos indivíduos da população total que afirmaram ter problemas de saúde que os impediam de trabalhar ou fazer exercícios, 64,8% apresentaram anticorpos IgG anti-MAYV ( **$p < 0,0001$** ). Na população de Coari, esse percentual foi de 74,1% [ **$p < 0,0001$** ; **OR = 2,66 (IC<sub>95%</sub> 1,70 – 4,17)**]. Essa associação não foi observada na população de Manaus (Tabela 11).

Não houve associação entre o histórico de vacinação contra a febre amarela e a infecção por MAYV na população estudada (Tabela 11). Histórico clínico de outras enfermidades também foi analisado e se encontra no apêndice A, Figura 21.

Tabela 11. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população total e entre municípios segundo histórico clínico

Histórico Clínico	Total		Manaus		Coari	
	% (Pos)	n	% (Pos)	n	% (Pos)	n
<b>Dengue</b>						
Não	36,3%	162/446	13,0%	30/231	61,4%	132/215
Sim	37,6%	151/402	15,4%	30/195	58,5%	121/207
		$p = 0,7090$		$p = 0,4790$		$p = 0,5381$
<b>Malária</b>						
Não	26,9%	152/566	12,4%	44/356	51,4%	108/210
Sim	55,8%	158/283	21,5%	14/65	66,1%	144/218
		$p < 0,0001$		$p = 0,0486$		$p = 0,0021$
<b>Vacina da Febre Amarela</b>						
Não	38,3%	31/81	14,3%	5/35	56,5%	26/46
Sim	36,4%	252/693	12,9%	45/349	60,2%	207/344
Não sabe	41,5%	27/65	23,3%	7/30	57,1%	20/35
		$p = 0,6871$		$p = 0,2802$		$p = 0,8543$
<b>Problema de Saúde que impede de trabalhar/fazer exercício</b>						
Não	29,5%	206/699	13,7%	56/409	51,7%	150/290
Sim	64,8%	103/159	12,5%	3/24	74,1%	100/135
		$p < 0,0001$		$p = 0,8688$		$p < 0,0001$

Tabela 11. Soroprevalência e números de amostras positivas da população total e entre municípios, testadas por imunohistoquímica indireta-IgG e confirmadas por teste de microneutralização para o Vírus *Mayaro* segundo histórico clínico. Valor de  $p$  = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

Na população de Coari, foi observado que fazer passeios e acampamentos em áreas florestadas, residir perto de floresta ou fragmento de floresta, morar ou trabalhar perto de área de criação de animais, participar de desmatamento, trabalhar com agricultura, não possuir água encanada ou tratada em casa, não possuir rede esgoto em casa e não realizar medidas preventivas de combate a mosquito são fatores de risco para a aquisição da infecção por MAYV (Tabela 12, Apêndice B. Figura 22 e Apêndice C. Figura 23).

Tabela 12. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população de Coari segundo possíveis fatores de risco

Fatores de risco	Coari		Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)
	% (Pos)	(n/N)		
<b>Relacionado a proximidade a área de florestamento</b>				
Contato com floresta	62,1%	149/240	0,163	1,31 (0,89 - 1,94)
Visitar fazenda ou chácara	63%	114/181	0,1607	1,32 (0,89 - 1,96)
Tomar banho em locais abertos ou rios	63%	144/229	0,1175	1,36 (0,92 - 2,01)
<b>Fazer passeios ou acampamentos em áreas florestadas</b>	<b>70,8%</b>	<b>92/130</b>	<b>0,0019</b>	<b>2,00 (1,29 - 3,13)</b>
Gramado em volta da casa	56,4%	92/163	0,3173	0,81 (0,54 - 1,22)
Ter hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa	64%	146/228	0,0638	1,44 (0,98 - 2,14)
<b>Morar perto de floresta ou fragmento de floresta</b>	<b>67,4%</b>	<b>130/193</b>	<b>0,0023</b>	<b>1,85 (1,24 - 2,76)</b>
<b>Morar ou trabalhar perto de área de criação de animais</b>	<b>68,6%</b>	<b>72/105</b>	<b>0,0374</b>	<b>1,64 (1,03 - 2,62)</b>
<b>Participar de desmatamento</b>	<b>70,6%</b>	<b>72/102</b>	<b>0,008</b>	<b>1,90 (1,18 - 3,07)</b>
<b>Trabalhar com agricultura</b>	<b>70,2%</b>	<b>191/272</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,59 (2,36 - 5,49)</b>
Manter alimentos da colheita	63,6%	84/132	0,2739	1,27 (0,82 - 1,96)
Possuir depósito para armazenamento de grãos	66,7%	52/78	0,2448	1,36 (0,81 - 2,28)
<b>Relacionado a saneamento básico</b>				
<b>Não possuir água encanada ou tratada em casa</b>	<b>68,7%</b>	<b>66/96</b>	<b>0,0278</b>	<b>1,71 (1,06 - 2,78)</b>
Não possuir rede de esgoto em casa	65,6%	105/160	0,0574	1,48 (0,98 - 2,22)
<b>Relacionado a mosquitos</b>				
Observar a presença de mosquito/carapanã/muriçoca na residência	60,2%	201/334	0,3832	1,22 (0,77 - 1,93)
<b>Realizar medidas preventivas contra o mosquito</b>	<b>69,9%</b>	<b>58/83</b>	<b>0,0227</b>	<b>1,81 (1,08 3,03)</b>

Tabela 12. Soroprevalência e números de amostras positivas da população de Coari por Imuno-histoquímica indireta-IgG e confirmadas por teste de microneutralização para o vírus *Mayaro* segundo possíveis fatores de risco. Valor de *p* = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Medidas em negritos estão estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). (n= número de amostras positivas, N= Número total de amostras analisadas).

Com o propósito de investigar mais detalhadamente os principais fatores associados à prevalência do MAYV na população de Coari, realizou-se regressão logística multivariada com  $\alpha$  de 5%, para avaliar as variáveis preditoras de maior influência entre as variáveis que apresentaram significância estatística no teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) das figuras e das tabelas mencionadas acima. O resultado da regressão logística, mostrado na tabela abaixo, indica que idade [ $p=0,022$ ; OR=1,03 (IC<sub>95%</sub> 1-1,07)] e realização de passeios ou acampamentos em áreas de floresta [ $p=0,01$ ; OR=3,15 (IC<sub>95%</sub> 1,28-7,75)] são os fatores de maior relevância associados à prevalência do MAYV na população do município de Coari.

**Tabela 13. Regressão logística multivariada para avaliar as variáveis com maior influência na prevalência para MAYV no município de Coari**

Variáveis preditoras	Odds Ratio cru (IC 95%)	Odds Ratio ajustado (IC 95%)	$P^1$ (teste de Wald)	$P^2$ (teste Likelihood Ratio)
Zona	1,21 (1-1,45)	1,12 (0,9-1,41)	0,309	0,307
<b>Idade</b>	<b>1,03 (1,01-1,06)</b>	<b>1,03 (1-1,07)</b>	<b>0,029</b>	<b>0,022</b>
Raça ou cor da pele	1,31 (0,87-1,96)	1,24 (0,77-2)	0,367	0,36
Nível de escolaridade	0,89 (0,77-1,02)	0,97 (0,8-1,18)	0,744	0,744
Ocupação	1,04 (0,95-1,13)	1,00 (0,91-1,10)	0,996	0,996
Problema de saúde	1,51 (0,71-3,19)	0,82 (0,32-2,07)	0,672	0,671
Histórico de malária	1,71 (0,89-3,29)	0 (0-Inf)	0,988	0,449
<b>Passeios ou acampamentos em áreas de floresta</b>	<b>3 (1,41-6,37)</b>	<b>3,15 (1,28-7,75)</b>	<b>0,012</b>	<b>0,01</b>
Mora perto da floresta ou fragmentos de floresta	1,68 (0,88-3,23)	0,97 (0,43-2,22)	0,952	0,952
Mora ou trabalha perto de áreas de criação de animais	1,45 (0,67-3,13)	1,1 (0,42-2,83)	0,85	0,85
Casa possui água encanada e tratada	0,61 (0,27-1,36)	1,12 (0,4-3,11)	0,825	0,825
Realiza as medidas preventivas contra o mosquito da dengue	0,84 (0,18-3,9)	0,92 (0,14-6,11)	0,931	0,931
Creme e repelentes	0,6 (0,29-1,24)	0,92 (0,4-2,12)	0,854	0,854
Mosquiteiro (cama)	1,41 (0,71-2,78)	0,99 (0,44-2,27)	0,994	0,994
Prevenção de água parada	0,75 (0,39-1,43)	0,94 (0,45-1,95)	0,858	0,858

Tabela 13. Regressão logística multivariada para avaliar as variáveis com maior influência na prevalência para MAYV no município de Coari.  $p^1$  = Teste de Wald;  $p^2$  = Teste de Log Likelihood – máxima verossimilhança/probabilidade (significância da associação da variável preditora com a variável dependente). Regressão logística com  $\alpha$  de 5%. Medidas em negritos estão estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## 13 DISCUSSÃO

As rápidas mudanças climáticas e do ecossistema mundial representam uma ameaça crescente por contribuírem com a disseminação de vetores transmissores de patógenos emergentes (FAUCI; MORENS, 2012; FRENK; MOON, 2013). O vírus *Mayaro* já foi responsável por diversos surtos na América do Sul e Central, no entanto sua epidemiologia, assim como seus fatores de risco, são pouco compreendidos (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Em nosso estudo, observamos uma soroprevalência de MAYV quatro vezes maior em Coari (um município do interior do Amazonas) em comparação a Manaus, a capital do Estado. Observamos ainda que o trabalho na agricultura, a interação do indivíduo com a floresta e a falta de saneamento básico estavam associados à soropositividade para MAYV. Nosso estudo mostrou a importância desse vírus como patógeno emergente, no entanto questões importantes sobre as manifestações clínicas e alterações patológicas continuam a ser mal compreendidas.

Para estimar a soroprevalência de MAYV, nós usamos o imunoensaio enzimático utilizando cultura de células infectadas como antígeno (EIA-ICC), e, em seguida, as amostras positivas foram confirmadas por meio do teste de microneutralização (MN). Estudos prévios já empregaram EIA-ICC para detecção de anticorpos IgM e IgG, usando linhagem de células de mosquito C6/36 (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012; MOURÃO *et al.*, 2012). Nós utilizamos células BHK-21. Uma das principais vantagens de usar uma linhagem celular de vertebrados comparado à linhagem celular de artrópodes é a redução de reações inespecíficas. Além disso, nossos resultados de EIA-ICC tiveram correlação significativa com o ensaio de MN. Nosso EIA-ICC foi capaz de detectar amostras positivas para MAYV, porém demonstraram reação cruzada com as amostras positivas para CHIKV. Dessa forma, o EIA-ICC enquadrou-se melhor como um ensaio de rastreio em vez de um ensaio confirmatório para detecção de infecção por alfavírus. Portanto, para confirmar nossas amostras, usamos um teste de microneutralização (MN) para detecção de amostras positivas para MAYV e CHIKV.

A maioria dos estudos anteriores utilizou o teste de inibição de hemaglutinação (HAI) para estimar a soroprevalência de MAYV (NUNES *et al.*, 2009b; SOUTO; SOUTO, 2012b; TAVARES-NETO *et al.*, 1986a, 2004). Contudo o teste HAI é bastante criticado por sua baixa sensibilidade, subestimando assim a soroprevalência de um determinado vírus em

uma população específica (LAURIE *et al.*, 2015; TRUELOVE *et al.*, 2016). O ensaio MN é o método mais adequado para a avaliação da resposta imunológica induzida por patógenos ou por vacinas. O maior uso da HAI em detrimento do ensaio MN se deve à maior complexidade e ao maior custo dessa técnica. Além disso, requer vírus vivo e é de difícil padronização (TRUELOVE *et al.*, 2016). Todas essas questões limitam o uso do ensaio MN na avaliação de imunidade protetora contra patógenos em geral, incluindo o MAYV. Devido à introdução do CHIKV em 2014 no Brasil, tornou-se essencial um teste confirmatório padrão-ouro, como teste de neutralização, para distinguir os falsos positivos por reação cruzada (BURT *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015).

No presente estudo, a soroprevalência do MAYV na população geral foi de 36%, de forma que em Coari a soroprevalência foi 4 vezes maior que em Manaus. ABAD-FRANCH *et al.*, (2012), utilizando o teste de EIA-ICC (com células C6/36), encontraram uma soroprevalência de 44,1% no Rio Pardo, uma comunidade localizada a 150 km ao norte de Manaus. No entanto eles não realizaram teste de neutralização, portanto esse resultado poderia representar a prevalência geral de alfavírus, e não a de MAYV especificamente. Os autores observaram alta prevalência de MAYV em zona rural em comparação com nossos dados de Manaus. Em nosso estudo, a prevalência de MAYV foi ainda maior em Coari (57,8%), em comparação ao Rio Pardo (44,1%). Do mesmo modo, a prevalência por nós encontrada foi muito maior no Estado do Amazonas, em comparação com outros estados do norte do Brasil, como Pará, Roraima, Acre e Rondônia (NUNES *et al.*, 2009b; SOUTO; SOUTO, 2012b; TAVARES-NETO *et al.*, 1986b, 2004). Estudos prévios na África mostraram alta prevalência de alfavírus nas áreas rurais onde o O'nyong'nyong vírus (ONNV) e o CHIKV estavam circulando (LABEAUD *et al.*, 2015; WELLER *et al.*, 2014). Isso sugere uma interação íntima de fatores vetoriais e ecológicos em áreas rurais onde a prevalência da infecção viral é alta em comparação às áreas urbanas (KUNIHOLM *et al.*, 2006).

Poucos estudos analisaram a prevalência de anticorpos IgG contra MAYV no Brasil; a maioria dos estudos relatou surtos ou infecções agudas em várias partes dos estados da Amazônia brasileira (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Também há uma falta substancial de informações sobre os fatores epidemiológicos associados aos vetores de transmissão e à doença clínica. Observamos que a prevalência de MAYV é um pouco maior em homens do

que em mulheres, no município de Coari. Em Manaus, a soroprevalência foi semelhante entre homens e mulheres. Abad-Franch *et al.* (2012) descreveram uma soroprevalência semelhante entre homens e mulheres do Rio Pardo (ABAD-FRANCH *et al.*, 2012). Observamos, ainda, que a soroprevalência de MAYV aumentou com a idade, o que poderia ser explicado pela exposição prolongada do indivíduo ao patógeno. Contudo não sabemos se a infecção primária protege contra a infecção subsequente por MAYV.

Em Coari, o aumento da prevalência também se associou de forma significativa ao baixo nível socioeconômico, à falta de saneamento básico e à não utilização de medidas para controle de mosquitos. A pobreza e todos os aspectos associados a ela têm demonstrado serem fatores críticos e fortes influenciadores do desfecho da doença, o que ainda precisa ser estudado com mais profundidade (FRENK; MOON, 2013).

Os alfavírus são conhecidos por causar síndromes inflamatórias articulares, o que gera impacto na vida do indivíduo (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Em nosso estudo, observamos uma associação significativa entre a infecção por MAYV e uma diminuição na habilidade para realizar exercícios físicos e atividades do cotidiano. Santiago WF *et al.* demonstraram recentemente que a infecção com MAYV pode ocasionar uma artralgia inflamatória por longo período, o que, em parte, é devido a uma resposta pró-inflamatória deflagrada pelo patógeno (SANTIAGO *et al.*, 2015). Estudos anteriores mostraram que os alfavírus podem ser responsáveis por bilhões de dólares em custos diretos e indiretos com cuidados de saúde em todo o mundo, expressos como *Disability-adjusted life years (DALYs)*. No entanto, devido à falta de dados epidemiológicos confiáveis e de ensaios diagnósticos, é difícil estimar o custo total à saúde associado à infecção por MAYV no Brasil.

Uma prevalência relativamente alta foi observada na população dependente do trabalho agrícola, florestal e pescaria como meio de subsistência. Os trabalhos agrícola e florestal já foram associados, anteriormente, ao contato com mosquitos, o que aumenta o risco de várias doenças infecciosas, incluindo MAYV (IZURIETA *et al.*, 2011). A maior soroprevalência em Coari sugere uma interação especial entre a infecção pelo vírus, a floresta e os vetores, os quais estão ausentes nas áreas urbanas. O contato com a floresta para recreação ou trabalho e a destruição ou desmatamento da floresta foram responsáveis por um aumento significativo da infecção por MAYV. O conhecimento dessas

características é de suma importância para que se possa intervir em seus *habitats* ecológicos.

Anteriormente, vários estudos demonstraram que os alfavírus têm vetores como *Anopheles* ou *Aedes*, os quais têm comportamentos de picada completamente diferentes (AITKEN *et al.*, 1960; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Atualmente, os tipos de mosquitos responsáveis pela transmissão do MAYV na Região Amazônica ainda não são totalmente definidos. O vetor do gênero *Hemagogus* é mais comum nas áreas rurais em comparação com as áreas urbanas. No entanto infecções em laboratório mostraram que *Ae. Albopictus* e *Ae. Aegypti* podem ser vetores efetivos para transmissão do MAYV. Serra *et al.* encontraram *Ae. Aegypti* e *Culex quinquefasciatus* infectados por MAYV em seus *habitats*, no município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil (SERRA *et al.*, 2016). Todas essas evidências sobre a possibilidade de infecção por MAYV nos mosquitos do gênero *Aedes* spp. são de extrema importância, pois podem influenciar o ciclo de transmissão desse vírus, mudando-o de silvestre para urbano, e estabelecendo novos surtos no Brasil, uma vez que a maioria da população brasileira é suscetível à infecção por MAYV (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Os vetores silvestres do MAYV são diurnos. Todavia o MAYV também pode estar circulando em ciclos noturnos, domésticos e peridomésticos nas áreas rurais. Isso sugere que uma mudança de vetor (mosquitos *Synanthropic* transmitindo MAYV) ou uma mudança de *habitat* / hábitos (vetores clássicos MAYV adaptando-se a regiões menos densas e a mordidas noturnas) no comportamento do vetor ou do vírus poderia aumentar a probabilidade da emergência da febre *Mayaro* na Amazônia e no Brasil (MAVIAN *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, observamos uma associação entre a infecção prévia por malária e a soropositividade para MAYV, mas não encontramos nenhuma associação com a infecção pelo vírus da dengue. Um estudo recente na Tanzânia também observou um aumento da prevalência de alfavírus nas áreas rurais, mas não achou nenhuma relação com a malária. Demonstrou-se que, nas áreas endêmicas de malária, o uso do mosquiteiro não favoreceu nem protegeu contra a infecção por alfavírus (WELLER *et al.*, 2014). Isso pode apontar para um vetor diurno, como o *Aedes* spp., contra o qual os mosquiteiros não protegem. Também, no Quênia, não foi encontrada uma diferença significativa entre a soroprevalência de alfavírus nos indivíduos que dormiam usando mosquiteiro e aqueles

que não o empregavam, apesar de o referido estudo ter identificado que a maioria das infecções por alfavírus foi causada pelo ONMV, que, ao contrário do CHIKV, é transmitida por *Anopheles* spp, cujo repasto é noturno. Embora a ONNV seja transmitida pelo vetor da malária, *Anopheles gambiae*, os autores não encontraram associação entre a soropositividade da ONNV e a infecção por malária (LABEAUD *et al.*, 2015).

Uma das limitações do nosso estudo foi a utilização de doadores de sangue de Manaus como grupo de comparação. Outro problema foi o viés de amostragem, pois tivemos uma porcentagem maior de homens em Manaus em relação à população de Coari, onde predominaram as mulheres. Ainda precisamos realizar ensaios para investigar a presença de anticorpos IgM neste estudo. Apesar de termos estimado a soroprevalência na população adulta, não incluímos a população entre dois e 17 anos, o que não permite que tenhamos uma imagem mais completa da epidemiologia MAYV na zona rural. A alta soroprevalência para MAYV que encontramos em Coari foi inesperada, pois não há histórico de surto nessa região. Além disso, a doença aguda devido ao MAYV ou outros vírus negligenciados é raramente diagnosticada no Brasil e no Amazonas, já que a maioria das doenças febris é classificada como malária ou dengue. Nossos dados sugerem que pelo menos 50% da população na zona rural estão expostos a MAYV, e é provável que uma proporção substancial de doenças febris por alfavírus esteja sendo perdida nesse cenário clínico. Na Tanzânia, os pacientes portadores de arboviroses foram mais propensos a receber terapia antibacteriana ou antimalária (HERTZ *et al.*, 2012). Isso tem implicações importantes no manejo e na prevenção de doenças, assim como no surgimento de resistência a antimicrobianos ou a antimaláricos.

Em resumo, nosso estudo demonstrou alta prevalência de MAYV na zona rural do Amazonas, de forma que as atividades florestais e de agricultura são fatores de risco para a aquisição da infecção por MAYV. Uma melhor compreensão da transmissão da doença, de sua epidemiologia e de sua patologia clínica contribuirão para que os centros de saúde pública estejam mais bem preparados para vigilância, prevenção e controle desse patógeno emergente.

## 14 CONCLUSÃO

O vírus MAYV é altamente prevalente na Amazônia. A agricultura e os trabalhadores florestais estão em maior risco de infecção pelo MAYV. Além disso, o contato direto com a floresta em termos de emprego, desmatamento ou recreação, juntamente com a falta de saneamento básico, estão associados ao risco de adquirir a infecção viral. Em muitas regiões do Brasil, com baixo nível socioeconômico e piores condições dos serviços de saúde, o diagnóstico depende exclusivamente da manifestação clínica. Vários arbovírus cocirculam na Região Amazônica e apresentam sintomas clínicos semelhantes durante a fase inicial da doença, o que dificulta o diagnóstico e leva a uma subnotificação. O MAYV circula silenciosamente há anos na Região Amazônica, e sua adaptação eficiente a um vetor urbano como o *Aedes aegypti*, por exemplo, tem um potencial relevante para estabelecer um cenário epidêmico no Brasil e na América Central e do Sul, como o que ocorreu com os vírus Zika e Chikungunya.

Além disso, devido à sua similaridade antigênica com o vírus Chikungunya, há uma urgência para o desenvolvimento de métodos diagnósticos específicos e precisos para uma melhor detecção das infecções por MAYV. Atualmente, não há vacinas ou medicamentos aprovados para a maioria dos arbovírus, e o controle da doença depende exclusivamente do controle vetorial. Além disso, testes diagnósticos precisos são essenciais para compreender não apenas a imagem completa das manifestações clínicas da febre *Mayaro*, mas também para distinguir as infecções causadas por MAYV de outras arboviroses e para definir o real impacto do MAYV para a saúde pública brasileira. Dessa forma, faz-se necessária uma maior sensibilização sobre esses arbovírus entre os médicos, os demais profissionais de saúde, as autoridades interessadas, além de uma população bem informada, para enfrentar, de forma mais efetiva, as insuficiências e os desafios do sistema de saúde do nosso País.

## 15 PERSPECTIVAS

Apesar de ser considerada uma doença infecciosa emergente, o avanço em relação ao conhecimento sobre o MAYV tem ocorrido lentamente, e muitas lacunas ainda persistem sobre a real abrangência do seu espectro clínico, vias mais raras de transmissão, rotas de infecção e excreção viral.

A presente pesquisa deu um passo significativo em direção à compreensão epidemiológica da infecção pelo MAYV no Estado do Amazonas. A partir do conhecimento da soroprevalência utilizando a identificação de IgG específica para o patógeno, pôde-se ter uma ideia melhor da abrangência geopopulacional do vírus. A partir dessa informação, pretende-se pesquisar a soroprevalência de IgM para uma noção mais aproximada da incidência da infecção aguda, caracterização melhor do seu espectro clínico e, conseqüentemente, do real impacto da doença nos indivíduos e na sociedade.

Uma avaliação mais profunda do efeito de uma infecção em uma determinada população passa ainda pelo conhecimento do efeito modulador desta, sobre o sistema imune no organismo comprometido. As doenças autoimunes, que são poligênicas em sua maioria, sofrem uma influência significativa do ambiente no seu desenvolvimento e curso clínico, como demonstrado em várias doenças por meio de estudos de concordância entre gêmeos monozigóticos (GENERALI *et al.*, 2017). Vários vírus já foram associados ao risco de doença autoimune (GETTS *et al.*, 2013). O MAYV está entre os alfavírus artritogênicos, com potencial de evolução crônica. A alteração imunológica e o estado inflamatório persistente, determinado pela infecção viral, poderiam contribuir para o direcionamento da resposta imune contra o próprio vírus, favorecendo o início de doenças autoimunes ou influenciando seu perfil e a gravidade clínica. HOGEBOM (2015) demonstrou que peptídeos de proteínas do capsídio viral de alguns alfavírus, incluindo MAYV, demonstraram afinidade pela ligação ao HLA-DR4, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de artrite reumatoide.

O certo é que muitas perguntas ainda precisam ser respondidas sobre a epidemiologia do MAYV, seu real impacto clínico e suas vias biomoleculares. A ampliação desse conhecimento poderá prover medidas mais efetivas de saúde pública, assim como oferecer novos alvos para vacinas e intervenções terapêuticas.



## 17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F. *et al.* *Mayaro* virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.
- AITKEN, T. H. *et al.* *Mayaro* virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 131, p. 986, 1 abr. 1960.
- ALENCAR, J. *et al.* Multivariate discrimination between two cryptic *Haemagogus* species associated with the transmission of yellow fever virus in the Americas. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 18-24, mar. 2009.
- ANDERSON, CHARLES R. *et al.* *Mayaro* virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. - PubMed - NCBI. v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957.
- AUGUSTE, A. J. *et al.* Evolutionary and Ecological Characterization of *Mayaro* Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, out. 2015.
- AZEVEDO, R. S. S. *et al.* *Mayaro* Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830–1832, nov. 2009.
- BUCKLEY, S. M. *et al.* Arbovirus neutralization tests with Peruvian sera in Vero cell cultures. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 4, p. 451–455, 1972.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, abr. 2017.
- CALISHER, C. H. *et al.* Isolation of *Mayaro* virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243–248, 1974.
- CARRERA, J.-P. *et al.* Eastern Equine Encephalitis in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 8, p. 732–744, Agosto 2013.
- CASALS, JORDI; WHITMAN ANDLORING. *Mayaro* virus: a new human disease agent. I. Relationship to other arbor viruses. - PubMed - NCBI. v. 6, n. 6, p. 1004–1011, 1957.
- CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. *Mayaro* virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of *Mayaro* virus as causative agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1017–1023, nov. 1957.
- CAUSEY, O. R.; THEILER, M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon Valley in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 1, p. 36–41, jan. 1958.
- CRUZ, A. C. R. *et al.* Serological survey for arboviruses in Juruti, Pará State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 11, p. 2517–2523, nov. 2009.

- DE THOISY, B. *et al.* *Mayaro* Virus in Wild Mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, out. 2003.
- ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will *Mayaro* virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, 6 jul. 2017.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 5, p. 454–461, 2 fev. 2012.
- FENNER, FRANK *et al.* Family and generic names for viruses approved by the international committee on taxonomy of viruses, June 1974, n. 3, p. 193–198, 1974.
- FIGUEIREDO, L. T. *et al.* Study of two different enzyme immunoassays for the detection of *Mayaro* virus antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 3, p. 303–307, set. 1989.
- FIRTH, A. E. *et al.* Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v. 5, p. 108, 2008.
- FORSHEY, B. M. *et al.* Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.
- FRENK, J.; MOON, S. Governance Challenges in Global Health. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 10, p. 936–942, 7 mar. 2013.
- FRIEDRICH-JÄNICKE, B. *et al.* Genome analysis of *Mayaro* virus imported to Germany from French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1255–1257, jul. 2014.
- GENERALI, E. *et al.* Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 51–61, set. 2017.
- GETTS, D. R. *et al.* Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 255, n. 1, p. 197–209, set. 2013.
- GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, ago. 2002.
- HALSEY, E. S. *et al.* *Mayaro* virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839–1842, nov. 2013.
- HERTZ, J. T. *et al.* Chikungunya and Dengue Fever among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 171–177, 1 jan. 2012.
- HOCH, A. L. *et al.* An outbreak of *Mayaro* virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 689–698, maio 1981.

- HOGEBROOM, C. Peptide motif analysis predicts alphaviruses as triggers for rheumatoid arthritis. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2 Pt B, p. 465–475, dez. 2015.
- IZURIETA, R. O. *et al.* Hunting in the Rainforest and *Mayaro* Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 317–323, out. 2011.
- KIELIAN, M. *et al.* Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 34, p. 409–455, 2000.
- KUNIHOLM, M. H. *et al.* Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, p. 1078–83, 2006.
- LABEAUD, A. D. *et al.* High rates of o'nyong nyong and Chikungunya virus transmission in coastal Kenya. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003436, fev. 2015.
- LAMBERT, A. J.; MARTIN, D. A.; LANCIOTTI, R. S. Detection of North American Eastern and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 379–385, 1 jan. 2003.
- LAROQUE, P. O. *et al.* Epidemiologic survey for arbovirus in galician capuchin monkeys (*Cebus flavius*) free living in Paraíba and captive capuchin monkey (*Cebus libidinosus*) from northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 462–468, maio 2014.
- LAURIE, K. L. *et al.* International Laboratory Comparison of Influenza Microneutralization Assays for A(H1N1)pdm09, A(H3N2), and A(H5N1) Influenza Viruses by CONSISE. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 22, n. 8, p. 957–964, ago. 2015.
- LEDNICKY, J. *et al.* *Mayaro* Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2000–2002, nov. 2016.
- LONG, K. C. *et al.* Experimental Transmission of *Mayaro* Virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011.
- MAVIAN, C. *et al.* Emergence of recombinant *Mayaro* virus strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8718, 18 ago. 2017.
- MENESES, CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO. **Identificação de arbovírus Dengue, *Mayaro* e Oropouche em amostras com Dengue negativo pela técnica NS1 no Estado de Roraima, no ano de 2012.** Dissertação – Boa Vista – Roraima: Universidade Federal de Roraima, 2013.
- MEZENCIO, J. M. *et al.* Ultrastructural study of *Mayaro* virus replication in BHK-21 cells. **Archives of Virology**, v. 114, n. 3–4, p. 229–235, 1990.
- MEZENCIO, J. M.; REBELLO, M. A. *Mayaro* virus proteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 299–304, jun. 1993.

- MOTA, M. T. DE O. *et al.* *Mayaro* virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, Setembro 2015.
- MOURÃO, M. P. G. *et al.* *Mayaro* Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–46, jan. 2012.
- MS. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. 2.<sup>a</sup> ed. Brasília/distrito Federal: [s.n.].
- MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. *Virus Mayaro*: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, n. 2, p. 288–302, 30 jun. 2012.
- NAPOLEÃO-PEGO, P. *et al.* *Mayaro* Virus Disease. **J Hum Virol Retrovirol**, v. 1, n. 3, p. 00018, 2014.
- NAVARRETE-ESPINOSA, JOEL; GÓMEZ-DANTÉS, HÉCTOR. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social - im064i.pdf. v. 44, n. 4, p. 347–353, 2006.
- NUNES, M. R. T. *et al.* 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, dez. 2009a.
- NUNES, M. R. T. *et al.* 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, dez. 2009b.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, p. 102, 30 abr. 2015.
- PAJOT, F.-X.; GEOFFROY, B.; CHIPPAUX, J.-P. Ecologie d'*Haemagogus janthinomys* Dyar (Diptera, Culicidae) en Guyane française : premières données. **Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie**, v. 23, n. 3, p. 209–216, 1985.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Neutralising antibodies for *Mayaro* virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125–133, fev. 2015.
- PIALOUX, G. *et al.* Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319–327, Maio, 2007.
- PINHEIRO, FRANCISCO P., (PRIMEIRO) *et al.* An outbreak of *Mayaro* virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings - PubMed - NCBI. v. 30, n. 3, p. 674–681, 1981.
- RICO-HESSE, R. *et al.* Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5278–5281, 6 jun. 1995.

SANTIAGO, F. W. *et al.* Long-Term Arthralgia after *Mayaro* Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004104, 2015.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, jul. 2010.

SEGURA, M. DE N. DE O.; CASTRO, F. C. **Atlas de Culicídeos na Amazônia brasileira: características específicas de insetos hematófagos da família *Culicidae***. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-533689>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

SERRA, O. P. *et al.* *Mayaro* virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–29, jan. 2016.

SOUTO, R. P.; SOUTO, R. C. C. Sorologia para arbovírus em população humana da região da reserva extrativista do Cajari, Amapá, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 2, n. 2, p. 8–14, 27 dez. 2012a.

SOUTO, R. P.; SOUTO, R. C. C. SOROLOGIA PARA ARBOVÍRUS EM POPULAÇÃO HUMANA DA REGIÃO DA RESERVA EXTRATIVISTA DO CAJARI, AMAPÁ, BRASIL. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 2, n. 2, p. 8–14, 27 dez. 2012b.

SRIHONGSE, S.; STACY, H. G.; GAULD, J. R. A survey to assess potential human disease hazards along proposed sea level canal routes in Panamá and Colombia. IV. Arbovirus surveillance in man. **Military Medicine**, v. 138, n. 7, p. 422–6, 1973.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses - an overview. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 8 maio 2012.

SW, B.; OW, P.; AL, DE LA H. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 63, n. 9, p. 313–315, 1983 1983.

TALARMIN, A. *et al.* *Mayaro* virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 452–456, set. 1998.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Pesquisa de anticorpos para arbovírus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 351–358, dez. 1986a.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Research of antibodies to arbovirus in the serum of residentes of the village of Corte de Pedra, Valença, Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 351–358, dez. 1986b.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Serologic survey for yellow fever and other arboviruses among inhabitants of Rio Branco, Brazil, before and three months after receiving the yellow fever

17D vaccine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 1–6, fev. 2004.

TAYLOR, S. F.; PATEL, P. R.; HEROLD, T. J. S. Recurrent arthralgias in a patient with previous *Mayaro* fever infection. **Southern Medical Journal**, v. 98, n. 4, p. 484–485, abr. 2005.

TESH, R. B. *et al.* *Mayaro* virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999.

TRUELOVE, S. *et al.* A comparison of hemagglutination inhibition and neutralization assays for characterizing immunity to seasonal influenza A. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 6, p. 518–524, nov. 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Arboviruses pathogenic for man in 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 neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72–99.

VIEIRA, C. J. DA S. P. *et al.* Detection of *Mayaro* virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 12–16, jul. 2015.

WELLER, N. *et al.* Seroprevalence of Alphavirus Antibodies in a Cross-Sectional Study in Southwestern Tanzania Suggests Endemic Circulation of Chikungunya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 31 jul. 2014.

ZHANG, R. *et al.* 4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. **The EMBO journal**, v. 30, n. 18, p. 3854–3863, 14 set. 2011.

ZUCHI, N. *et al.* Molecular detection of *Mayaro* virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. v. 109, n. 6, p. 820–823, 2014.

**Apêndice A – Figura 21.** Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo histórico clínico de vários tipos de doenças.

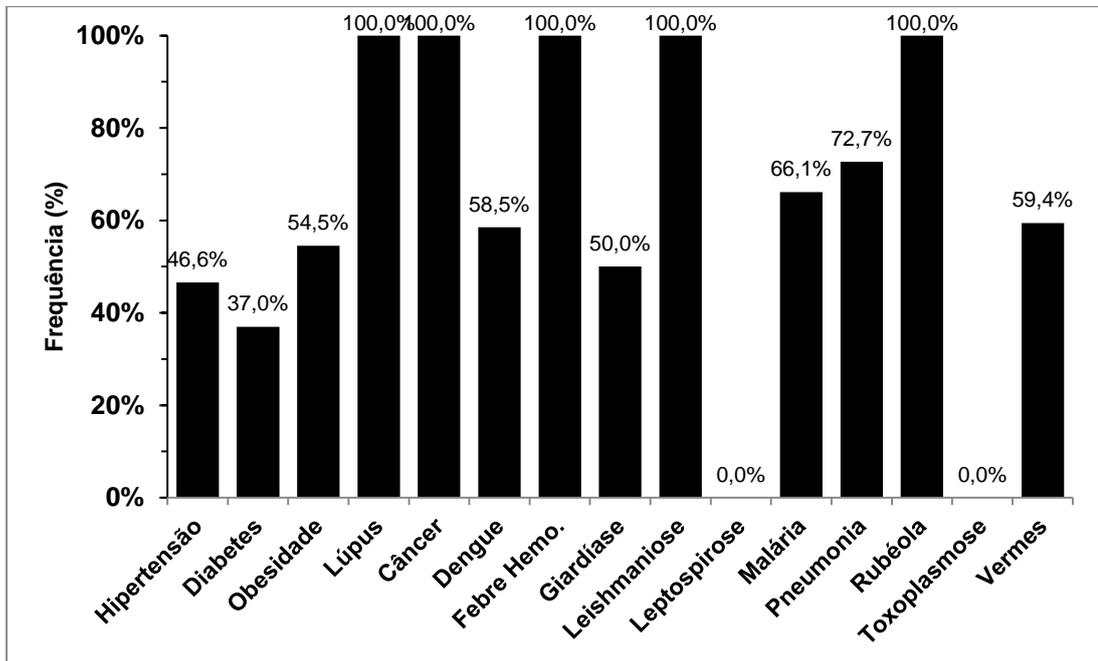


Figura 21. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo histórico clínico de vários tipos de doenças, testadas por Imunoensaio enzimático indireto-IgG e confirmadas por teste de Microneutralização para o Vírus *Mayaro*, conforme histórico clínico de vários tipos de doenças. Valor de  $p$ = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

**Apêndice B – Figura 22.** Soroprevalência em amostras positivas na população total de Coari segundo o contato com florestamento.

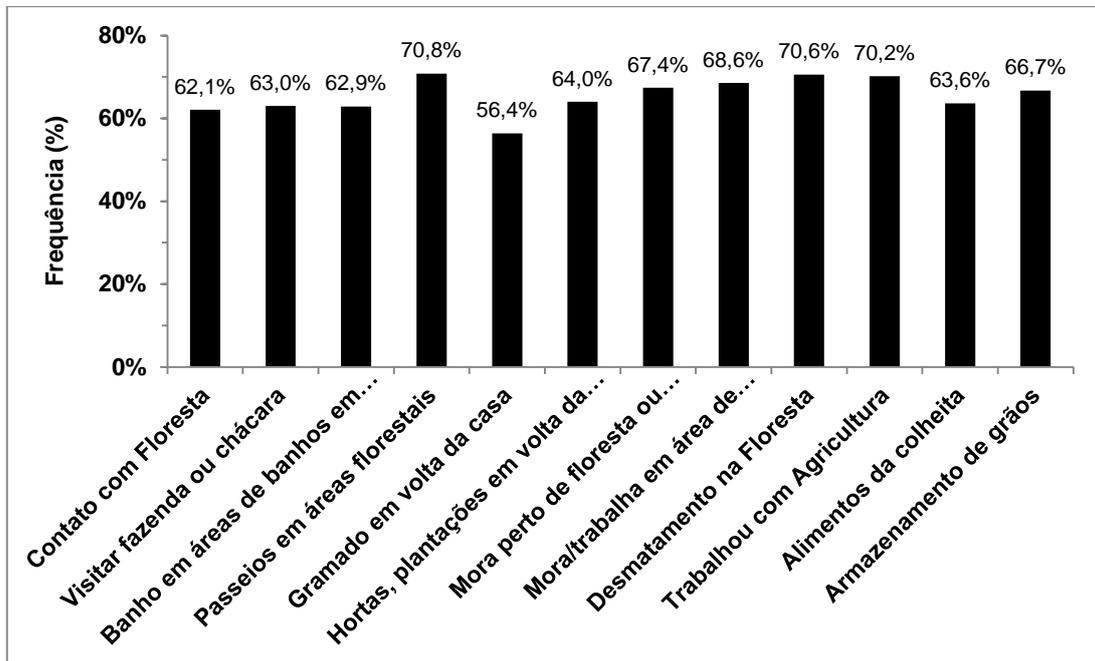


Figura 22. Soroprevalência em amostras positivas na população total de Coari segundo o contato com florestamento, testadas por Imunoensaio indireto-IgG e confirmadas por teste de Microneutralização para o vírus *Mayaro*, conforme o contato com florestamento (fazer passeios em áreas florestais  $p = 0,0019$ , morar perto de floresta ou fragmento  $p = 0,0023$ , morar ou trabalhar perto de área de criação de animais  $p = 0,0374$ , participar de desmatamento  $p = 0,008$ , trabalhar com agricultura  $p < 0,0001$ ). Valor de  $p =$  Teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

**Apêndice C – Figura 23.** Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo medidas não preventivas.

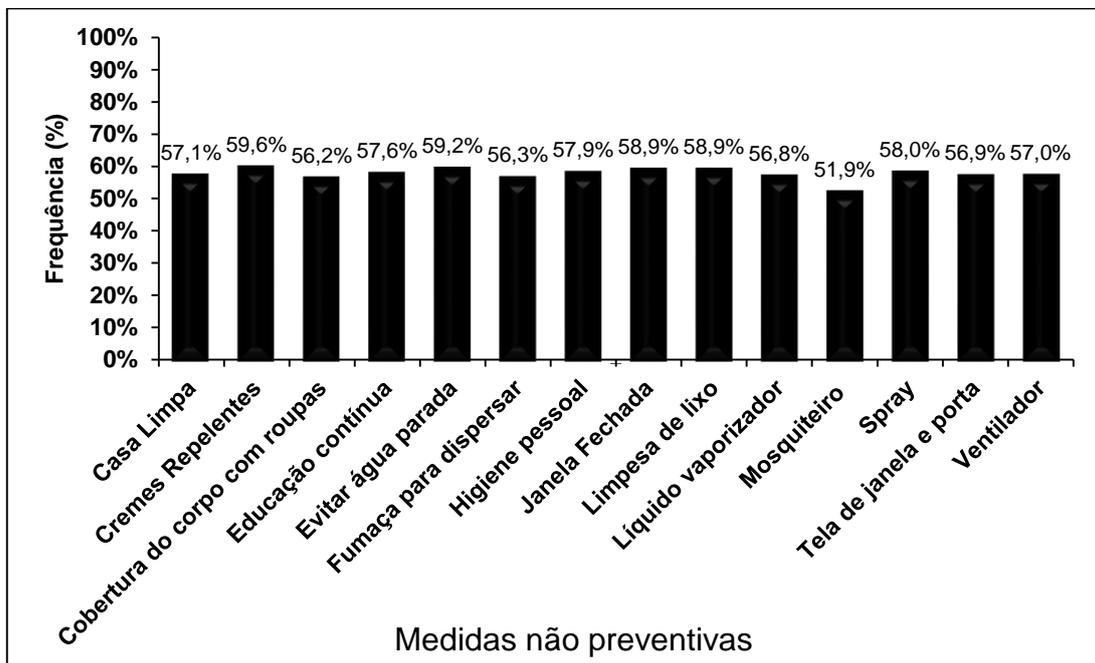


Figura 23. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo medidas não preventivas testadas por Imunoensaio indireto-IgG e confirmadas por teste de Microneutralização para o Vírus *Mayaro*, conforme medidas não preventivas.

**Apêndice D – Figura 24.** Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo informações das características do mosquito (criadouro mais comum).

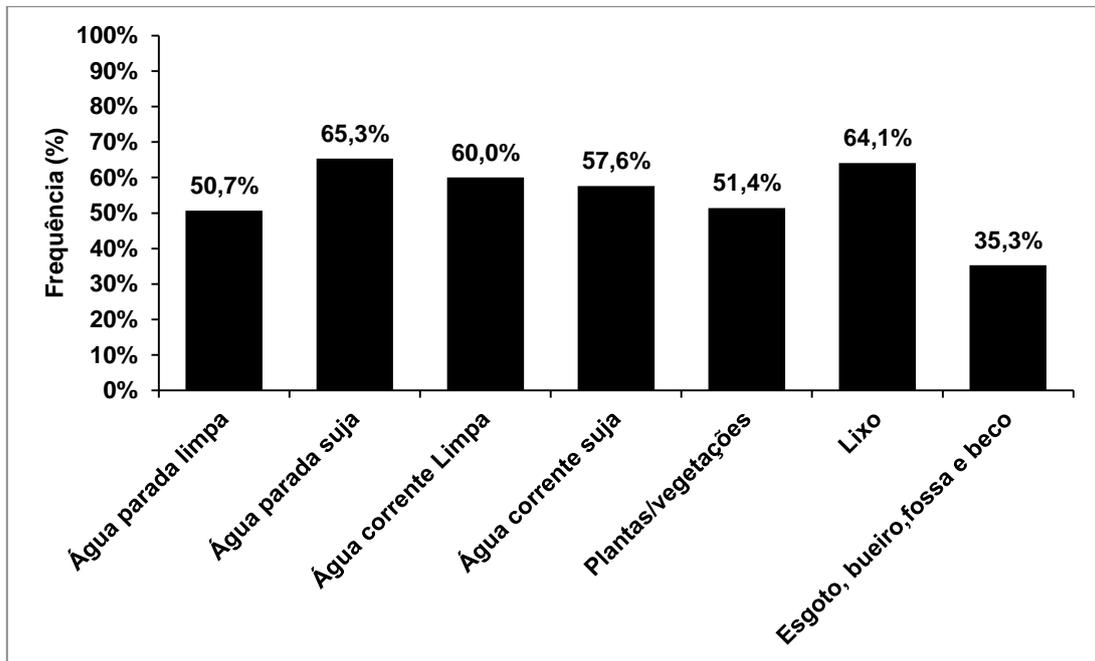


Figura 24. Soroprevalência em amostras positivas da população total de Coari segundo informações das características do mosquito (criadouro mais comum), testadas por Imunoensaio indireto-IgG e confirmadas por teste de Microneutralização para o Vírus *Mayaro*, conforme criadouro mais comum de mosquitos. (água parada limpa  $p = 0,1138$ , água parada suja  $p = 0,1336$ , água corrente limpa  $p = 0,8815$ , água corrente suja  $p = 0,8896$ , plantas/vegetações  $p = 0,1605$ , lixo  $p = 0,4706$  e esgoto, bueiro, fossa e beco  $p = 0,0450$ ). Valor de  $p =$  teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

**Apêndice E – Figura 25.** Soroprevalência de amostras positivas do município de Coari segundo o tempo de picada mais frequente de mosquitos.

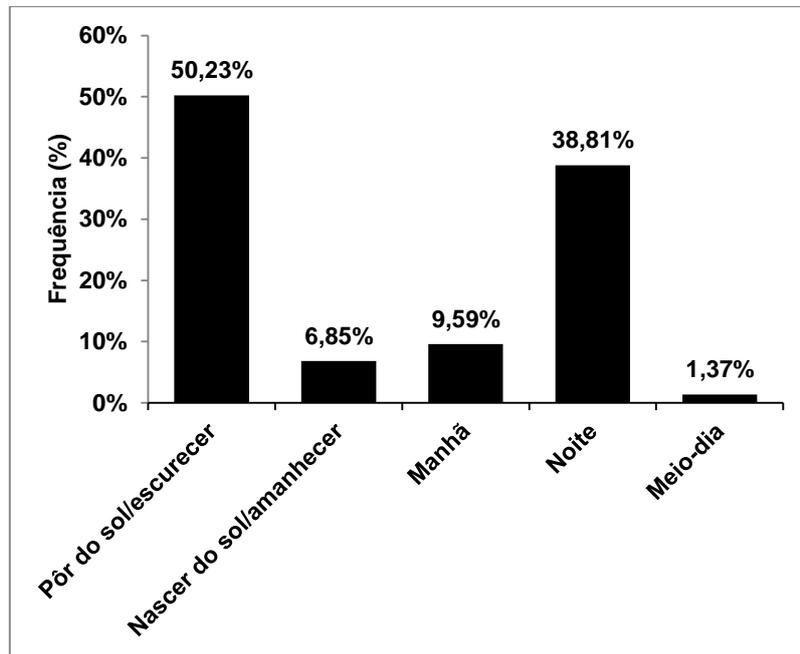


Figura 25. Soroprevalência do vírus *Mayaro* na população de Coari segundo informações das características do mosquito (tempo de picada mais frequente) testadas por Imunoensaio indireto-IgG e confirmadas por teste de Microneutralização para o Vírus *Mayaro*, conforme o tempo de picada mais frequente do mosquito. (Pôr do sol  $p = 0,0488$ , nascer do sol  $p = 0,3608$ , manhã  $p = 0,1232$ , noite  $p = 0,0507$  e meio-dia  $p = 0,6566$ ). Valor de  $p =$  teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

**Apêndice F – Tabela 14.** Lista de tampões utilizados durante o processo de Imunoensaio.

---

**LISTA DE REAGENTES PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA INDIRETA-IgG**

---

**1) PBS 1X**

2,32 g NaHPO<sub>4</sub> 10mM

0,2 g KCl 2,7 mM

0,2 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM

8,0 g NaCl 137 mM

q.s.p. 1L água MilliQ

pH 7,4

Obs.: preparação prévia de PBS 10X com pH 7,4, em seguida diluir a partir desse para PBS 1X

---

**2) SOLUÇÃO DE LAVAGEM (PBS-T 0,05%)**

---

PBS (1X) + (0,05%) de Tween 20 (PBS-T)

---

**3) SOLUÇÃO DE BLOQUEIO (LD10%)**

---

10% leite desnatado (LD 10%) em PBS (1X) pH 7,4

Obs.1: sempre preparar no dia do procedimento

Obs.2: durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite.

---

**4) SOLUÇÃO DE DILUIÇÃO DE ANTICORPO (PBS-T + LD 10%)**

---

PBS 1X pH 7,4

+ 0,05% de Tween 20 (PBS-T)

+ leite desnatado 10% (LD 10%)

Obs.1: sempre preparar no dia do procedimento

Obs.2: durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite

---

Tabela 15. Soluções e tampões utilizados durante processo Imunoensaio indireto-IgG

## ANEXO 1 – Documento de aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Soroprevalência para Hantavírus em humanos e animais do Estado do Amazonas

**Pesquisador:** Pritesh Jaychand Lalwani

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 19328313.7.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmaceuticas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 569.240

**Data da Relatoria:** 26/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de Recurso ao Parecer do CEP 522021 de 05/02/2014 17:30:46. O projeto pertence à Grande Área do Conhecimento (CNPq) Grande Área 4. Ciências da Saúde. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, pesquisador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O projeto é um estudo observacional de corte transversal sobre a soroprevalência de hantavírus em humanos e animais e que espera desenvolver um teste diagnóstico para

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Hantavirose constitui um problema de saúde pública emergente no Estado do Amazonas. Contudo, ainda não é conhecida a prevalência e os fatores de risco para hantavirose no Amazonas. O objetivo desse estudo é conhecer o perfil epidemiológico da hantavirose na população do Amazonas e desenvolver um teste diagnóstico para hantavírus a ser empregado nos centros de saúde pública.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

## ANEXO 2 - Questionário epidemiológico e socioeconômico para população investigada



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### QUESTIONÁRIO

Nome: \_\_\_\_\_

1. Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

2. Bairro/ Comunidade: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

3. Há quanto tempo você mora nesta área? \_\_\_\_\_

4. Idade: \_\_\_\_\_ Gênero/Sexo:  Masculino  Feminino

5. Qual seu Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_ RH:  Positivo  Negativo

6. Como você classifica a cor de sua pele/raça?

Branco  Negro  Pardo  Amarelo  Indígena

Negro x índio  Branco x índio  Branco x negro

7. Qual o seu nível de escolaridade?

Analfabeto  Ensino fundamental completo

Alfabetizado  Ensino médio completo

1ª a 4ª série do ensino fundamental  Superior incompleto

5ª a 8ª série do ensino fundamental  Superior completo

8. Renda Familiar:  até 1 salário  2 salários  3 salários  4 salários  5 ou mais

9. Você trabalha?  Sim  Não

10. Nos últimos 12 meses, qual foi sua principal ocupação? [Entrevistador: com a ajuda do entrevistado, classifique a ocupação no grupo ocupacional mais adequado]

Não tinha. Estavas desempregado (a)

Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa

Profissionais de nível superior

Profissionais das artes

Profissionais ou técnicos de nível médio

Trabalhadores de serviços administrativos

Trabalhadores da prestação de serviços e comerciantes

Trabalhadores de serviços domésticos

Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca

Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)

Trabalhadores manuais da construção civil

Trabalhadores manuais de reparação e manutenção

Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares

Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)

Autônomo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

11. Você tem algum problema de saúde que lhe impede de trabalhar ou fazer exercícios?

Sim  Não

12. Quantas crianças tem na sua casa?  0  1  2  3  4ou+

13. Faz uso de bebida alcoólica?  Sim  Não Se SIM, que frequência? \_\_\_\_\_/semana

14. Você fuma?  Sim  Não Se SIM, que frequência? \_\_\_\_\_/semana

15. Já esteve internado?  Sim  Não

Qual especialidade?  Cardiologia  Oftalmologia  Neurologia  
 Outras: \_\_\_\_\_  Infectologia  Pneumologia  Cirurgia  
 Angiologia  Nefrologia  Clínica da Dor

16. Você é usuário do SUS?  Sim  Não

17. Possui algumas dessas patologias abaixo?  Sim  Não

Quais?  Hipertensão  Diabetes  Obesidade  
 Lúpus  Câncer  Outras: \_\_\_\_\_

18. Você já teve alguma das doenças a abaixo?

Dengue  Febre hemorrágica  Giardíase  Leishmaniose  Leptospirose  
 Malária  Pneumonia  Rubéola  Toxoplasmose  Vermes

19. Já ouviu falar sobre Hantavírus?  Sim  Não

Se SIM, qual (is) fonte(s) de informação:

TV  Rádio  Amigos/família  Serviço de saúde  Palestra  Outros:

E como se pega Hantavírus?

Doenças transmitidas por roedores  Doença transmitida pelo cão  
 Doença transmitida por mosquito  Doença transmitida por água  
 Não sabe  Outros: \_\_\_\_\_

20. Informação sobre animais domésticos e contato/caça com roedores

a) Você tem animais em casa?  Sim  Não

-Quais? (quantidade/idade)?  Cão \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  Gato \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  Ave \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Peixe \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  Outro \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

b) Leva seu animal ao veterinário?  Sim  Não

c) Seu animal tem muita infestação de carrapatos?  Sim  Não

d) Seu animal tem muita infestação de pulgas?  Sim  Não

e) Seu(s) animal (is) costuma(m) capturar e/ou comer ratos?  Sim  Não

f) Costuma caçar animais?  Sim  Não

g) Mata ou captura roedores?  Sim  Não

h) Já observou a presença de sinais visíveis de roedores na sua residência ou seu no trabalho?  Sim  Não

- Se SIM, quais?  Fezes  Materiais roídos  Pegadas  
 Odor característico  Presença própria do animal  Tocas

i) Já foi mordido por algum roedor ou outro animal?  Sim  Não Se for outro animal, qual(is)? \_\_\_\_\_

j) Usa ratos como isca para a pesca?  Sim  Não

k) Já comeu carne de roedores?  Sim  Não

l) Você cria cobras?  Sim  Não

m) Costuma alimentá-las com animais vivos?  Sim  Não

**21. Informação sobre contato com área de florestamento**

- a) Você visitou ou teve contato com floresta?  Sim  Não  
 - Quando?  Últimos 6 meses  Há 1 ano  Há 2 anos  Há 5 anos
- b) Costuma visitar fazenda ou xácara?  Sim  Não
- c) Costuma tomar banho em locais abertos ou tem o hábito de ir a áreas de banhos em rios?  Sim  Não
- d) Costuma fazer passeios ou acampamentos em áreas de floresta?  Sim  Não
- e) Tem gramado em volta de sua casa?  Sim  Não
- f) Há hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa?  Sim  Não  
 - se SIM, qual a distância?  menos de 500 metros  mais de 500 metros
- g) Mora perto da floresta ou fragmentos de floresta?  Sim  Não  
 - se SIM, qual a distância?  menos de 500 metros  mais de 500 metros
- h) Mora ou trabalha perto de áreas de criação de animais (aviários, suínos, bovinos, caprinos, etc)?  Sim  Não
- i) Já participou de algum desmatamento na floresta?  Sim  Não  
 - se SIM, quando?  últimos 12 meses  mais de 12 meses
- j) Já trabalhou com agricultura?  Sim  Não  
 - se SIM, quando?  últimos 12 meses  mais de 12 meses
- k) Mantém em casa muitos alimentos da colheita?  Sim  Não
- l) Possui depósito ou galpão para armazenamento de grãos ou produtos da colheita em casa?  Sim  Não

**22. Informação sobre limpeza**

	Diariamente	Dias alternados	1/semana	2/semana	3/semana	Cada 15dias	Outro	Ignorado
Limpeza da casa								
Limpeza da área externa								
Descarte do lixo								

- Usa luvas para limpeza da casa e quintal?  Sim  Não
- Costuma limpar a mesa após as refeições?  Sim  Não
- Acumula entulho/lixo ao redor ou fora da casa?  Sim  Não
- Lixo aberto ou mal acondicionado?  Sim  Não
- Usa sabão para lavar as mãos?  Sim  Não
- Caso tenha, limpa a churrasqueira após o uso?  Sim  Não

**23. A sua casa possui água encanada e tratada?**  Sim  Não

**24. A sua casa possui esgoto?**  Sim  Não

**25. Qual a estrutura da sua casa?**

- Tipo de parede:**  Blocos de cimento  Argila ou blocos de barro  Tijolo de fogo  
 Pedra e cimento  Pedra e lama  Madeira e lama  \_\_\_\_\_  
**Tipo de telhado:**  Palha  Telha  Zinco  Lona/toldo  \_\_\_\_\_

**26. Tem muito mosquito/carapanã/muriçoca onde você mora?**  Sim  Não

**27. Informações das características do mosquito**

**Qual o criadouro mais comum?**

- Água parada limpa  Água corrente limpa  Plantas/vegetações  Não sabe  
 Água parada suja  Água corrente suja  Lixo  Outros: \_\_\_\_\_

**Qual o tempo de picada mais frequente?**

- Pôr do sol/escurecer  Manhã  Meio-dia  Não sabe  
 Nascer do sol/amanhecer  Noite  Outros: \_\_\_\_\_

**28. Você realiza as medidas preventivas contra o mosquito da dengue conforme as Campanhas em Saúde divulgam?**  Sim  Não

**29. Se sim, algumas informações das medidas preventivas contra o mosquito.**

**- Qual tipo de prevenção utilizada contra a picada do mosquito?**

- Casa limpa  Cremes e repelentes  Cobertura do corpo com roupas  
 Educação contínua  Evitar água parada  Fumaça para dispersar  
 Higiene pessoal  Janela fechada  Limpeza de lixo  
 Líquido vaporizador  Mosquiteiro (cama)  Spray  
 Tela de janela e porta  Ventilador  
 Outros: \_\_\_\_\_  Não sabe

**- Erradicação/extinção do criadouro do mosquito?**

- Água em tanques de armazenamento  Cobertura dos recipientes   
 Outros: \_\_\_\_\_  
 Prevenção de água parada  Corte de árvores/vegetais  Não sabe

**30. Você já teve Malária?**  Sim  Não

**31. Você já teve Dengue?**  Sim  Não

**32. Você já tomou vacina contra Febre Amarela?**  Sim  Não  Não sabe

**Mais informações:**

---

**OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO!**

## ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa chamada: “**Soroprevalência para Hantavírus em humanos e animais do Estado do Amazonas**”, realizada por pesquisadores da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A hantavirose é a doença causada pelo hantavírus e geralmente transmitida por ratos silvestres. Dessa maneira, os moradores de áreas rurais, agricultores, caçadores, pescadores, pessoas que fazem trilhas, acampam ou frequentam matas são as que têm mais chance de se contaminar com o hantavírus. Existem apenas cinco casos de hantavirose identificados no Amazonas até o momento. Por esse motivo, estamos realizando um estudo para conhecer a verdadeira importância dessa doença para o seu município, procurando anticorpos para o hantavírus no sangue de pessoas adultas (mais de 18 anos) e animais.

A sua participação nesta pesquisa consiste em permitir a coleta de 5 mL de sangue da veia, com o uso de agulha e seringa descartáveis, além de responder a um questionário com dados epidemiológicos. O seu sangue será estudado nos laboratórios da UFAM e poderá ser guardado para futuras pesquisas, se você permitir. Os exames realizados no seu sangue servem para diagnosticar apenas a hantavirose.

Caso você possua animais em sua casa (cães ou gatos), se você permitir, também serão coletados 5 mL do animal para pesquisar hantavirose, também nos animais.

Os riscos relacionados com sua participação são a dor causada pela picada da agulha e um pequeno sangramento que pode acontecer após a coleta de sangue. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado e experiente na coleta de sangue e com a adoção rigorosa dos procedimentos padrão de biossegurança para a coleta de sangue. O único benefício relacionado com a sua participação é o de nos ajudar a conhecer essa doença no seu município e as situações de risco para sua transmissão e assim evitar que novos casos aconteçam.

A sua participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer custo para você. A qualquer momento você pode desistir de participar e isso não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a UFAM. Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento.

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos e se o Sr(a) autorizar abaixo poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores.

Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Rubricas/ Polegar

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde e doenças infecciosas.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo. Logo abaixo, você tem o nome, telefone e o endereço do pesquisador principal que poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação quando você desejar.

**Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.**

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

**Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Amazonas  
Rua Alexandre Amorin, 330 - Aparecida  
Manaus-AM-Brasil CEP 69010-300  
Fone: +55 92 3305 5000  
E-mail: pritesh@ufam.edu.br



Assinatura alternativa  
(Impressão do dedo polegar)