

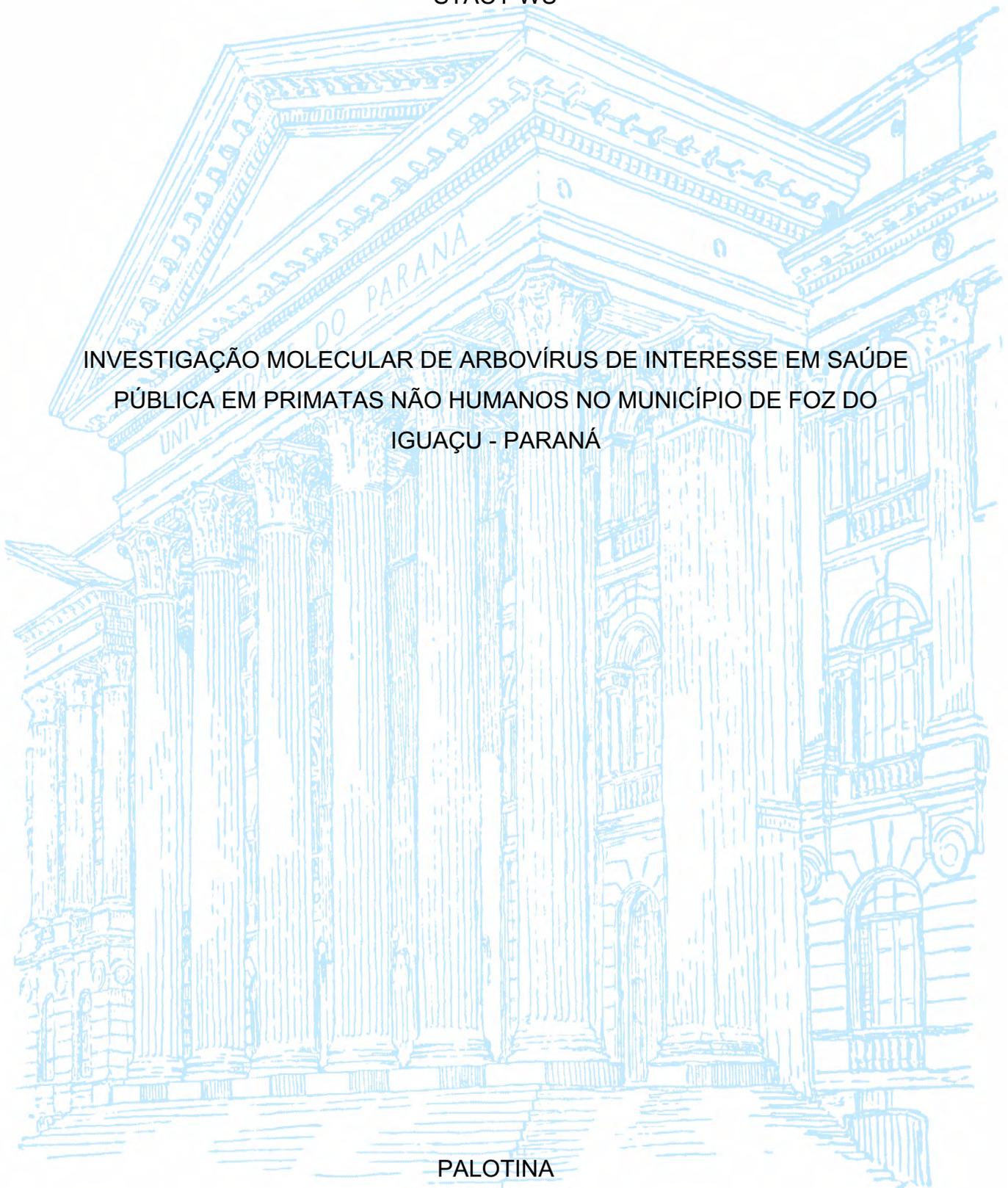
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STACY WU

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS DE INTERESSE EM SAÚDE
PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO
IGUAÇU - PARANÁ

PALOTINA

2021



STACY WU

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS DE INTERESSE EM SAÚDE
PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO
IGUAÇU - PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki

Coorientador: Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda

PALOTINA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

W959 Wu, Stacy
Investigação molecular de arbovírus de interesse em saúde pública em primatas não humanos no município de Foz do Iguaçu - Paraná / Stacy Wu – Palotina, 2021.
71f.

Orientadora: Silvia Cristina Osaki
Coorientador: Walfrido Kühn Svoboda
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Dengue. 2. Chikungunya. 3. Febre amarela. 4. Primata neotropical. 5. Saúde única. I. Osaki, Silvia Cristina. II. Svoboda, Walfrido Kühn. III. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636

Ficha catalográfica elaborada por Liliâne Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **STACY WU** intitulada: **INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU - PARANÁ**, sob orientação da Profa. Dra. SILVIA CRISTINA OSAKI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 19 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

19/08/2021 16:42:35.0

SILVIA CRISTINA OSAKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/08/2021 16:39:12.0

LEILA SABRINA ULLMANN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP)

Assinatura Eletrônica

19/08/2021 16:42:30.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 107794

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 107794

AGRADECIMENTOS

A Deus e Universo por esta existência e o percurso que a vida me levou até este presente momento.

À minha família pelo apoio, torcida, compreensão e empatia na minha caminhada acadêmica, boa parte fora de 'casa'.

Ao meu noivo, companheiro e parceiro de vida, Marcos Oliveira, que embarcou junto comigo nessa jornada acadêmica. Além do apoio moral, também forneceu apoio físico na execução do projeto. Esteve comigo em todas as etapas no projeto, literalmente.

À minha orientadora Prof. Dr^a. Silvia Cristina Osaki, pela confiança em aceitar esse desafio comigo, por ter me deixado andar com os próprios pés nesse projeto, mas sempre com sua supervisão.

Ao professor Msc. Anderson Luiz de Carvalho da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina por desde a residência veterinária ter me apoiado e auxiliado na escolha do projeto de pesquisa do mestrado e pelo empréstimo das armadilhas *Tomahawk*, que foi essencial para capturas dos animais.

Ao coorientador professor Dr. Walfrido Kühn Svoboda por colaborar com sua tamanha expertise neste projeto.

Aos médicos veterinários Zalmir Silvino Cubas e Pedro Henrique Teles do Refúgio Biológico Bela Vista da Usina Hidrelétrica Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional por aceitar este projeto que envolvia tanto os animais de cativeiro da instituição, como os animais de vida livre na Área de Proteção Permanente, por toda ajuda durante a execução do projeto.

À equipe formada pela zootecnista Evelyn Alfonzo, os tratadores de animais e auxiliares veterinários da terceirizada Trechos Ltda. dentro da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional pela ajuda na distribuição das armadilhas na Área de

Preservação Permanente, ceva, e contenção física dos primatas não-humanos de vida livre e de cativeiro.

À médica veterinária Patricia Hoerner Cubas e sua equipe de tratadores do Zoológico Municipal Bosque Guarani pelo manejo das mais variadas espécies de primatas não-humanos cativos.

Ao biólogo Dr. Robson Delai e à técnica de laboratório Andressa Rahyn do Laboratório de Medicina Tropical pela parceria no armazenamento e extração de RNA das amostras.

Ao professor médico Dr. Maurício Lacerda a pós-doutoranda Nathalia Zini do Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela parceria na realização da sorologia das amostras.

Ao professor Dr. João Pessoa de Araújo Jr. e à médica veterinária mestranda e companheira de projeto Amanda Haisi do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista pela realização da pesquisa de genomas virais das amostras.

“As nossas paixões são os principais instrumentos da nossa conservação.”

Jean-Jacques Rousseau

RESUMO

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes e são responsáveis por causar doenças emergentes e reemergentes de potencial zoonótico. As arboviroses destacadas neste estudo são a Febre Amarela, Dengue e Chikungunya, doenças que constituem grandes problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Ações da vigilância ativa como monitoramento, captura e avaliação de primatas não humanos assintomáticos auxiliam na detecção precoce de circulação viral e predição de risco, de forma a compreender o papel destes animais como reservatórios destas arboviroses. O objetivo deste trabalho foi investigar a infecção aguda por YFV, DENV 1-4 e CHIKV em sangue total de 67 PNH cativos e de vida livre, divididos em quatro espécies no município de Foz do Iguaçu-Paraná, Brasil, a saber: *Alouatta caraya* (n=7), *Callithrix penicillata* (n=5), *Leontopithecus chrysomelas* (n=3) e *Sapajus nigritus* (n=23) cativos do Zoológico Municipal Bosque Guarani e do Zoológico Roberto Ribas Lange e *Sapajus nigritus* (n=29) de vida livre na Área de Proteção Permanente da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional, no período de outubro de 2019 a março de 2020. O diagnóstico molecular foi determinado pela RT-qPCR. Todas as amostras foram negativas para a presença do fragmento alvo do RNA genômico viral de YFV, DENV1-4 e CHIKV. Os resultados negativos sugerem ausência de infecção aguda nos animais analisados e, portanto, não constituíram fonte de infecção para os vetores artrópodes no momento da amostragem.

Palavras-chave: Dengue, Chikungunya, Febre Amarela, Primata neotropical, Saúde Única

ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted by arthropods and are responsible for causing emerging and re-emerging diseases with zoonotic potential. The arboviruses highlighted in this study are Yellow Fever, Dengue and Chikungunya, diseases that constitute major public health problems in Brazil and worldwide. Active surveillance actions such as monitoring, capturing, and evaluating asymptomatic non-human primates help in the early detection of viral circulation and risk prediction, to understand the role of these animals as reservoirs of these arboviruses. The aim of this work was to investigate the acute infection by YFV, DENV 1-4 and CHIKV in whole blood from 67 free-living captive NHPs, divided into four species in the municipality of Foz do Iguaçu-Paraná, Brazil, namely: *Alouatta caraya* (n=7), *Callithrix penicillata* (n=5), *Leontopithecus chrysomelas* (n=3) and *Sapajus nigritus* (n=23) captives of the Municipal Bosque Guarani Zoo and the Roberto Ribas Lange Zoo and free living *Sapajus nigritus* (n=29) in the Permanent Protection Area of the Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant, from October 2019 to March 2020. Molecular diagnosis was determined by RT-qPCR. All samples were negative for the presence of the YFV viral genomic RNA target fragment, DENV1-4 and CHIKV. Negative results suggest the absence of acute infection in the analyzed animals and, therefore, did not constitute a source of infection for the arthropod vectors at the time of sampling.

Keywords: Dengue, Chikungunya, neotropical monkey, One Health, Yellow Fever

LISTA DE TABELAS

MOLECULAR INVESTIGATIONS OF ARBOVIRUSES OF INTEREST IN PUBLIC HEALTH IN NON-HUMAN PRIMATES IN A MUNICIPALITY ON THE TRIPLE INTERNATIONAL BORDER (BRAZIL, PARAGUAY, ARGENTINA):

Table 1 - Species distribution, sex, capture location (free-living or captive) of NHP evaluated between October 2019 and March 2020 in the municipality of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. 42

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADE – Aumento da infectividade dependente de anticorpos (*Antibody Dependent Enhancement*)
- APP-IB – Área de Proteção Permanente da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional (Permanent Protection Area of the Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant)
- CA – Califórnia, EUA
- cDNA – DNA complementar
- CHIKV – Vírus da Chikungunya
- DENV – Vírus da Dengue
- DENV-1 – Vírus da Dengue Sorotipo 1
- DENV-2 – Vírus da Dengue Sorotipo 2
- DENV-3 – Vírus da Dengue Sorotipo 3
- DENV-4 – Vírus da Dengue Sorotipo 4
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato
- ECSA – Linhagem Leste/Central/Sul/África (*East/Central/South/Africa*)
- EUA – Estados Unidos da América
- FcR – Receptor Fc de imunoglobulinas
- FD – Febre da Dengue
- FHD – Febre hemorrágica da Dengue
- FP – *Foward primers*
- kb – kilobase
- MgCl₂ – Cloreto de magnésio
- mL – Mililitro
- mM – Milimolar
- ng – Nanograma
- NHP – *Non-human primate* (primata não humano)
- °C – Grau Celsius
- pmol – Picomol
- PNH – Primata não-humano
- PRNT – Teste de Neutralização por Redução de Placa de Lise
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNAsin – Inibidores de ribonuclease

RP – *Reverse primers*

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SCD – Síndrome do Choque da Dengue

SE – Semana Epidemiológica

SESA – Secretaria de Estado de Saúde do Paraná

WA – Linhagem Oeste da África (*West Africa*)

WHO – *World Health Organization*

WI – *Winconsin*, EUA

YFV – Vírus da Febre Amarela

MBGZ – Zoológico Municipal Bosque Guarani (Municipal Bosque Guarani Zoo)

RRLZ – Zoológico Roberto Ribas Lange (Roberto Ribas Lange Zoo)

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

™ – Trademark (marca registrada)

® – Registrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ARBOVIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA	18
2.1.1 Febre Amarela	19
2.1.2 Dengue.....	22
2.1.3 Chikungunya	25
2.2 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS SENTINELAS	26
2.3 REFERÊNCIAS	28
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MOLECULAR INVESTIGATIONS OF ARBOVIRUSES OF INTEREST IN PUBLIC HEALTH IN NON-HUMAN PRIMATES IN A MUNICIPALITY ON THE TRIPLE INTERNATIONAL BORDER (BRAZIL, PARAGUAY, ARGENTINA) 38	
Abstract.....	39
Impacts	39
1 Introduction	39
2 Materials and methods	41
2.1 Ethics statement.....	41
2.2 Study area.....	41
2.3 Animals and biological samples	41
2.4 RNA extraction	42
2.5 cDNA synthesis.....	42
2.6 Real-time polymerase chain reaction (qPCR).....	43
2.6.1 Detection of DENV and CHIKV by SYBR®.....	43
2.6.2 YFV detection by TaqMan®	43
3 Results.....	43
4 Discussion	43
Conclusion	45
Conflict of interest	45
References	45
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS	52
APENDICE A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO RNA 1	64
APENDICE B – PROTOCOLO EXTRAÇÃO RNA 2	65

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	66
ANEXO B – SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE	67
ANEXO C – INSTRUÇÃO AOS AUTORES	68

1 INTRODUÇÃO

Recentemente tem-se notado o surgimento de novas doenças, como também o aparecimento de doenças consideradas erradicadas. Essas ocorrências são denominadas de doenças emergentes e reemergentes, respectivamente. Morse (1995) define o termo 'doenças infecciosas emergentes' como infecções que surgiram recentemente em uma população e com aumento expressivo na sua frequência e/ou no alcance geográfico. Já as 'doenças infecciosas reemergentes' indicam a mudança no comportamento epidemiológico de doenças já conhecidas, que haviam sido controladas, mas que, por adaptação do agente infeccioso, voltaram a representar ameaça à saúde pública (BOULOS, 2001).

Alguns fatores são necessários para que a doença possa emergir ou reemergir, como a própria introdução do patógeno com capacidade de disseminação na população humana, seguida da sua capacidade de se manter e sobreviver na natureza. O comportamento ecológico e humano são dois fatores que desempenham papel importante nos surgimentos das doenças (MAY e GUPTA, 2001).

A maioria dos patógenos emergentes que afetam os humanos são agentes zoonóticos mantidos em ciclos enzoóticos, tendo os animais silvestres como reservatórios de patógenos que possam ser transmitidos aos humanos (LLOYD-SMITH et al., 2009; MORSE, 1995). As zoonoses são responsáveis por bilhões de casos de doenças em humanos e milhões de óbitos anualmente e constituem em um dos maiores problemas de saúde no mundo todo (INSTITUTE, 2012).

Das doenças zoonóticas, têm-se o grupo específico de doenças que são transmitidas aos seres humanos pela picada de insetos e aracnídeos hematófagos, cujo ciclo de replicação do agente deve acontecer tanto no hospedeiro definitivo como no vetor (invertebrado), a isto são designados de vírus transmitidos por artrópodes – arbovírus (*arthropod-borne vírus*) (HIGGS et al., 2005).

Os arbovírus circulam entre os animais silvestres e causam doenças quando adquirem a capacidade de saltar de uma espécie para outra (*spillover* / transbordamento zoonótico), que inclui a habilidade de infectar humanos ou animais domésticos que podem se tornar tanto hospedeiros acidentais ou definitivos. Sugere-se que a emergência das arboviroses venha da extensa urbanização na região dos trópicos, e da colonização desse *habitat* por mosquitos altamente antropofílicos, como o caso do *Aedes aegypti*. Como exemplos de arbovírus emergentes e reemergentes, temos os vírus da Dengue sorotipos 1-4 (DENV 1-4), vírus da Chikungunya (CHIKV) e o vírus da Febre Amarela (YFV), que perderam a necessidade de amplificação enzoótica e agora produzem epidemias extensas (WEAVER et al., 2009).

O estudo de populações de primatas não-humanos (PNH) de vida livre pode auxiliar no entendimento das origens e evolução de doenças infecciosas emergentes e reemergentes, pois os PNH atuam como reservatórios de patógenos humanos e acabam servindo como sentinelas para vigilância dessas doenças como também fornecem modelos para pesquisas sobre a dinâmica de transmissão natural. Além disso, este estudo beneficia os esforços de conservação uma vez que as doenças infecciosas emergentes e reemergentes também representam riscos às espécies de símios ameaçados de extinção (WOLFE et al., 1998).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi investigar molecularmente a presença de YFV, DENV1-4 e CHIKV em PNH de vida livre sem manifestações clínicas de doença, para entendimento da dinâmica de circulação viral, suscetibilidade do hospedeiro e importância à saúde pública, no município de Foz do Iguaçu - Paraná, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Capítulo dedicado à revisão de literatura sobre arboviroses (Febre Amarela, Dengue e Chikungunya) de interesse em saúde pública e vigilância epidemiológica de PNH sentinelas.

2.1 ARBOVIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, e são designados dessa forma devido à parte de seu ciclo replicativo ocorrer nestes animais invertebrados (ciclo extrínseco). A transmissão para humanos e outros animais ocorre pela picada de artrópodes hematófagos (RUST, 2012). Para fechar o ciclo de transmissão, o vírus precisa produzir alta viremia no hospedeiro vertebrado para que um artrópode suscetível se infecte durante a picada (KARABATSOS, 1985). No vetor podem ocorrer três tipos de transmissão, (i) vertical, transmissão do vírus da fêmea artrópode infectada com o vírus para os seus descendentes; (ii) horizontal de forma venérea, onde um macho contaminado infecta a fêmea, e (iii) oral, no repasto sanguíneo da fêmea no hospedeiro vertebrado (WEAVER, 1997).

Os arbovírus de importância em saúde pública estão divididos em três famílias, a saber, *Peribunyaviridae*, *Togaviridae* e *Flaviviridae* (RUST, 2012; HUGHES et al., 2020). O gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e o *Alphavirus* da família *Togaviridae* compreendem alguns dos arbovírus potencialmente patogênicos para os humanos no mundo inteiro, logo mais representativas para a saúde pública (HEINZ et al., 2012).

O genoma destes arbovírus é constituído por ácido ribonucleico (RNA) fita simples negativa não segmentado, que permite ampla propagação entre hospedeiros vertebrados e invertebrados pela sua imensa plasticidade genética e alta taxa de mutação dos vírus RNA (MORSE, 1995; WEAVER, 2006).

Todos os arbovírus circulam entre os animais silvestres e provocam enfermidades com manifestações clínicas de variados graus a óbito. Possui capacidade de transbordar entre diferentes espécies (*spillover*) incluindo humanos e animais de produção que acabam como hospedeiros acidentais ou definitivos (WEAVER et al., 2009; GUBLER et al., 2016). Estes vírus podem causar desde febre, encefalite, hemorragia e doença hepática em humanos e animais com altas taxas de morbidade e letalidade (MONATH et al., 1996; LINDENBACH et al., 2007; GUBLER et al., 2016).

O diagnóstico das arboviroses pode ser realizado por isolamento viral em cultivo celular, detecção do genoma viral por técnicas moleculares (RT-PCR, RT-qPCR) e sorologia [Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA); Teste de Inibição da Hemaglutinação (HI); Imunofluorescência (IF) e Teste de Neutralização por Redução de Placa de Lise (PRNT)]; a técnica a ser escolhida depende do tempo de evolução da doença (MORELI et al., 2013). Em países tropicais, a chance de reatividade cruzada na sorologia com outros vírus da mesma família é alta, assim

o PRNT, apesar de difícil realização, é a técnica padrão ouro para diagnóstico de flavivírus e alphavírus, reduzindo a reatividade cruzada e permitindo a diferenciação viral (ROEHRIG et al., 2008). A associação de diferentes técnicas laboratoriais auxilia no fornecimento de um diagnóstico mais fidedigno.

Nas últimas décadas, a prevalência de arboviroses aumentou consideravelmente devido à intensificação da urbanização, colonização desse *habitat* por mosquitos altamente antropofílicos, intercâmbio/comércio internacional e fatores ambientais como desmatamento e mudanças climáticas (aquecimento global). Portanto, os vírus zoonóticos que se adaptam aos ciclos urbanos, se tornam transmissíveis por mosquitos antropofílicos, tendem a ter sucesso como patógenos emergentes. Além do aumento de casos em regiões endêmicas, também há surgimento de casos novos em regiões consideradas indenes (WEAVER et al., 2009; WEAVER, 2013; GUBLER et al., 2016; PYBUS et al., 2009).

A Febre Amarela (FA), Dengue e Chikungunya são exemplos de arboviroses com potencial de doenças emergente e reemergente em áreas urbanas e periurbanas transmitidos pelo *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (FAUCI, 2005; WEAVER et al., 2009). A emergência e reemergência ocorre devido a novos padrões de ocorrência que também emergiram, efeito da interação entre seus agentes, do ambiente e da vulnerabilidade de humanos e outros animais suscetíveis (PAZ et al., 2009).

2.1.1 Febre Amarela

O YFV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, causa enfermidade que afeta tanto primatas humanos como não-humanos. A FA é uma doença infecciosa não contagiosa endêmica em algumas regiões do trópico como a África e América do Sul, incluindo o Brasil (BARRETT et al., 2003; LINDEBACH et al., 2013). Causa periodicamente surtos isolados ou epidemias de impacto em saúde pública e é transmitida ao homem pela picada de insetos da família *Culicidae* (MONATH, 2001).

O YFV possui genoma de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11 kilobases (kb) (LINDEBACH et al., 2013). Um sorotipo e sete genótipos do YFV na África e América do Sul (MONATH et al., 2015) já foram descritos. Uma das hipóteses sobre a origem do YFV nas Américas é que foi introduzido da África pelo mosquito *Aedes aegypti* nas embarcações durante o comércio de escravos (SOPER, 1977).

Os genótipos I e II da América do Sul são derivados no genótipo da África Ocidental. O genótipo América do Sul I é o que predomina no Brasil e possui cinco linhagens distintas, de 1A a 1E (BRYANT et al., 2007; MIR et al., 2017). A linhagem 1E foi responsável pelos surtos recentes de FA no Brasil entre os anos de 2016 a 2019 e acredita-se ter sido originado de áreas endêmicas da região norte do país (MIR et al., 2017; CUNHA et al., 2019).

A FA é uma doença zoonótica, mantida na natureza por PNH e mosquitos diurnos, que se reproduzem em buracos de árvores em dosséis de florestas (DIGOUTTE et al., 1995). Epidemiologicamente pode-se dividir a FA em duas formas, a rural/ silvestre e a urbana, que diferem entre si quanto aos vetores, hospedeiros vertebrados e o local de ocorrência (MONATH, 1988; MONATH et al., 2015). O ciclo de transmissão na forma urbana ocorre do tipo homem-mosquito pelo *Aedes aegypti* e a forma silvestre se mantém pelos PNH suscetíveis e mosquitos do gênero *Aedes* na África e *Haemagogus sp.* e *Sabethes sp.* nas Américas (STRODE, 1951; DIGOUTTE et al., 1995). Nas Américas, a forma urbana não ocorre desde 1954, enquanto na África ocorrem ambas as formas (MONATH, 1997). Desde 1942 não há registros da transmissão da FA pelo vetor *A. aegypti* no Brasil (BRASIL, 2017).

O ciclo silvestre é endêmico nas regiões tropicais da África e das Américas, como na região amazônica, onde se apresenta em formas de epidemias com intervalos conhecidos de tempo, que varia em média de cinco a sete anos, alternados por períodos com menor número de casos (VASCONCELOS, 2003; SOUZA, 2013). Estes intervalos de epizootias ocorrem devido à provável renovação de populações de PNH, com novos animais suscetíveis que permite a circulação ou amplificação do vírus (VASCONCELOS, 2010).

Os hospedeiros silvestres primários da FA são os PNH, e são considerados sentinelas pois o óbito após infecção natural com YFV é indicador de atividade do vírus e alerta órgãos oficiais de saúde pública para iniciar esforços para prevenir a propagação do vírus em áreas urbanas (BRASIL, 2014b).

Por via de regra, as espécies de PNH da América do Sul são suscetíveis ao YFV (SOUZA, 2013). PNH do gênero *Alouatta* apresentam alta suscetibilidade, apresentam forma aguda da doença, com evolução clínica grave e alta letalidade (STRODE, 1951; MORENO et al., 2013). Outros primatas acometidos gravemente são *Ateles sp.*, *Aotus sp.*, *Callithrix sp.* e *Callicebus sp.* (VASCONCELOS, 2003) enquanto os do gênero *Cebus* e *Sapajus* se mostram mais refratários ao vírus, desenvolvendo infecção subclínica ou quadro febril com viremia, e logo há produção de anticorpos protetores que neutralizam futuras reinfecções (TAYLOR, 1951; VASCONCELOS, 2000; BRASIL, 2014b).

Os símios apresentam viremia a partir de três a quatro dias após a picada do mosquito infectado, desenvolvem manifestações clínicas inespecíficas como febre e apatia. Em casos graves podem apresentar icterícia, êmese, hemorragia, insuficiência hepática e renal. Os animais podem se recuperar em até duas semanas ou evoluir para óbito (KINDLOVITS et al., 2009).

Após a picada de mosquitos silvestres infectados, o período de incubação médio varia entre três e seis dias, podendo ser de até 10 a 15 dias, e o período de transmissibilidade vai de 24 a 48 horas antes até três a cinco dias após o início dos sintomas. O mosquito infectado transmite o vírus por seis a oito semanas (BRASIL, 2017).

Em humanos, a FA constitui a febre hemorrágica viral original, primeira descrita no mundo. Clinicamente pode se apresentar desde a forma oligossintomáticas a formas fulminantes, pode provocar sepse com viremia, febre, prostração, hemorragia, lesão cardíaca, hepática e renal, seguida de choque e alta letalidade (VASCONCELOS, 2000; MONATH, 2001). A letalidade global varia de 5-10%, e casos graves que evoluem com síndromes íctero-hemorrágica e hepato-renal chega a 50% (VASCONCELOS, 2000).

Não há medicamento específico para o tratamento desta doença, apenas para o combate aos sintomas e sinais manifestos da doença como analgésicos e antitérmicos (VASCONCELOS, 2000). Dessa forma a prevenção pelo uso da vacinação antiamarilica com a amostra 17D se faz necessária em áreas endêmicas (ROBERTSON, 1993).

Os focos endêmicos até 1999 estavam situados nos estados do Norte, Centro-Oeste e na parte oeste de Minas Gerais (BRASIL, 2016). Em 2000 houve transmissão humana na Bahia e São Paulo, após um longo período sem ocorrência de casos autóctones. Essa condição suscitou em novas estratégias de vigilância, prevenção e controle no país (VASCONCELOS, 2003; SAAD et al., 2016). Até então, a vigilância da FA era baseada na ocorrência de casos humanos apenas. A partir daquele ano, com a observação de morte de PNH e a subsequente emergência da doença na população humana, os PNH tornaram a ser vistos como indicadores de risco (evento-sentinela) e alerta para epidemia de casos humanos (VASCONCELOS, 2003).

Nos anos 2000 a 2003 observou-se a expansão da circulação viral no sentido leste-sul do País, com detecção do vírus em áreas consideradas silenciosas por várias décadas. A nova área epizootica ou de transição foi formada por parte das regiões oeste de Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2005). Nos anos 2007 a 2009, foram registrados surtos de FA nos estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (ARAÚJO et al., 2011).

Mais uma vez, a reemergência da FA no Brasil foi identificada a partir da detecção do vírus em PNH no Tocantins (julho/2014), seguida nas regiões Centro-Oeste (GO, DF e MS) e Sudeste (MG) (março/2015). Em março de 2016 foi detectada na região oeste de SP e se estendeu para demais estados da região Sudeste (MG, SP, ES e RJ) (2017/2018) indicando dispersão para a região Sul entre 2018/2019. No período entre julho/2014 e junho/2018 foram confirmadas 2559 epizootias em PNH, 2169 casos humanos com 754 óbitos, letalidade de 34,7%. Destes, o maior número de epizootias confirmadas foi no estado do Paraná (BRASIL, 2019a, b).

No estado do Paraná o YFV foi detectado em janeiro/2019 a partir da dispersão do interior do estado de São Paulo (BRASIL, 2019a, b). Durante o período epidemiológico 01/07/2019 a 08/05/2020 não foram confirmados casos humanos, enquanto a vigilância de epizootias em PNH, no período de monitoramento 2019/2020 foram confirmadas 287 epizootias, em 87 municípios,

totalizando 43 municípios com positividade para circulação viral na região leste e sudeste do estado (PARANÁ, 2020a).

2.1.2 Dengue

A Dengue é uma infecção viral sistêmica e autolimitada com a mais rápida taxa de propagação no presente momento. É numericamente uma das arboviroses humanas mais importante, presente em mais de 125 países tropicais e subtropicais, com casos aproximados de 50 a 100 milhões anualmente, e dezenas de milhares de casos de febre hemorrágica da Dengue e síndrome do choque da Dengue, predominantemente na Ásia, seguido da América Latina e África (ENDY et al., 2010; BHATT et al., 2013).

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, a sua origem e evolução ainda é discutível, sugere-se que o DENV evoluiu de cepas silvestres transmitidas entre PNH no ciclo silvestre na África Ocidental e Malásia por outros mosquitos do gênero *Aedes* (WANG et al., 2000), em contrapartida Gaunt et al (2001) propuseram a origem na África pela hipótese de que os flavivírus transmitidos por mosquitos circulam exclusivamente na África e frequentemente infectam primatas. Desta forma, a transmissão para humanos ocorreu de forma independente para todos os quatro sorotipos de vírus e há apenas algumas centenas de anos (HOMES et al., 2003; WANG et al., 2000).

O primeiro sorotipo da Dengue (DENV-1) foi descrito pela primeira vez em 1943 na Polinésia Francesa e no Japão. O DENV-2 foi relatado em 1944 na Papua Nova Guiné e Indonésia. Enquanto os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram descritos em 1953 na Tailândia e Filipinas, respectivamente (MESSINA et al., 2014). Em outubro de 2013 foi isolado o quinto sorotipo, DENV-5 em um fazendeiro no estado de Sarawak, Malásia num surto de Dengue que ocorreu em 2007. Inicialmente este paciente foi triado como caso grave de DENV-4, mas depois foi sequenciado o genoma e descobriu que o vírus ocupava um novo ramo na árvore filogenética da Dengue. A DENV-5 tem manutenção no ciclo silvestre apenas, diferentemente dos quatro sorotipos que estão bem difundidos no ciclo urbano (NORMILE, 2013; MUSTAFA et al., 2014).

O DENV é um arbovírus membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e se apresenta em quatro sorotipos, DENV1-4, antigenicamente similares, mas imunologicamente distintos que circulam em todos os continentes. Possui genoma RNA fita simples de polaridade positiva com 11Kb (WHO, 2009; PUERTA-GARDO et al., 2010; ROTHMAN, 2011). Os quatro sorotipos da Dengue causam as mesmas manifestações clínicas e apresentam padrões semelhantes de disseminação sistêmica com tropismo por células da linhagem mieloide como monócitos, macrófagos e células dendríticas (ROTHMAN, 2011).

A transmissão do DENV para humanos e PNH ocorre pela picada da fêmea de *Aedes aegypti* infectada (GUBLER, 1998) O vírus permanece incubado no indivíduo humano por um período de três a 14 dias, após este intervalo ocorre a viremia que pode levar de dois a 10 dias e acompanhada de sintomas como

febre, calafrios e mal-estar. Nesta fase o vírus circula pelo sangue periférico do hospedeiro humano, período em que a fêmea de mosquito se infecta ao realizar o repasto sanguíneo. Após o período de incubação extrínseco no mosquito de oito a 12 dias, é possível infectar outros indivíduos, caracterizando o ciclo *A. aegypti* – humano – *A. aegypti* (GUBLER, 1998; ROTHMAN, 2011; WHO, 2009).

A Dengue possui ampla variedade de apresentações clínicas, desde assintomáticas, oligossintomáticas a casos graves de internamento e óbito. A maioria das infecções cursam para casos leves, e um pequeno percentual apresenta a doença com maior gravidade, caracterizada por extravasamento de plasma, acompanhado ou não de hemorragia (WHO, 2009). A apresentação clínica da Dengue, febre da Dengue cursa com febre, mal-estar, cefaleia retro-orbitária intensa, mialgias e petéquias com duração aproximada de quatro a sete dias. Alterações hematológicas como leucopenia, trombocitopenia e níveis elevados de transaminases hepáticas são características do quadro de Dengue clássica. As manifestações clínicas desaparecem sem complicações na maioria absoluta dos casos (ROTHMAN, 2011).

Em alguns casos, numa pequena porcentagem de pacientes, a febre da Dengue pode evoluir para casos graves, como a febre hemorrágica da Dengue e a síndrome do choque da Dengue que ocorrem em uma segunda fase da doença conhecida como fase crítica. A febre hemorrágica da Dengue tem como característica sangramentos espontâneos e extravasamento de plasma contribuindo para um desfecho clínico grave com prognóstico reservado. O aumento da permeabilidade vascular na febre hemorrágica da Dengue resulta em diminuição do volume plasmático circulante, hemoconcentração e derrames pleurais e peritoneais, podendo ocorrer choque grave e óbito (ROTHMAN, 2011).

A infecção por um determinado sorotipo confere imunidade total para o mesmo sorotipo específico (imunidade homotípica) e parcial de curta duração para sorotipos diferentes. A infecção por um sorotipo (infecção primária pelo DENV), predispõe o indivíduo a desenvolver a febre hemorrágica da Dengue quando infectado por outro sorotipo (infecção secundária pelo DENV). Este fenômeno ainda não está tão bem esclarecido. A hipótese do “aumento da infectividade dependente de anticorpos” ou ADE (*Antibody Dependent Enhancement*), presume que os anticorpos não neutralizantes para o primeiro sorotipo da Dengue formam um imunocomplexo com o novo sorotipo, aumentando a capacidade de infectar as células, por meio de receptores FC de imunoglobulinas (FcR) localizados na superfície celular de monócitos e macrófagos (PUERTA-GARDO et al., 2010).

Desta forma, o risco de desenvolver a forma da doença grave numa segunda infecção é alto, pois na ADE os anticorpos heterotípicos gerados na primeira infecção falham ao neutralizar o sorotipo da infecção atual. Os anticorpos não-neutralizantes da infecção primária se unem ao vírus de outro sorotipo na infecção secundária e auxilia a entrada deste nos monócitos através das células com receptores específicos para a porção Fc dos anticorpos, resultando em intensa replicação viral, gerando uma carga viral muito alta e uma

reação do sistema imune desequilibrada, desenvolvendo as formas graves da Dengue como a febre hemorrágica da Dengue e síndrome do choque da Dengue (ROTHMAN, 2011; WAHALA et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) recomenda o uso da primeira vacina Dengvaxia (CYD-TDV) tetravalente com vírus vivo recombinante da Dengue apenas em pessoas que já tiveram contato com o DENV, sendo utilizada como reforço em localidades geográficas onde os dados epidemiológicos indicam alta prevalência. A vacina Dengvaxia pode aumentar o risco de desenvolver Dengue grave em pessoas que nunca tiveram contato com o DENV, por desenvolver o fenômeno da ADE e desequilibrar o sistema imune (WHO, 2016).

A introdução da vacina contra os quatro sorotipos da Dengue deve fazer parte de uma estratégia abrangente de controle da Dengue, incluindo controle de vetores bem executado, desenvolvimento e implantação de campanhas de conscientização com objetivo de reduzir a disponibilidade de criadouros domésticos de *A. aegypti*, melhores práticas baseadas em evidências para o manejo clínico de pacientes com Dengue e uma rede de vigilância ativa e monitoramento de ovos, larvas e mosquitos adultos transmissores da Dengue (WHO, 2016; REGIS et al., 2013).

Anualmente 50 milhões de pessoas são infectadas pelo DENV. A OMS estima que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. A Dengue é endêmica no sudeste asiático, América Central e do Sul, África, Pacífico ocidental e regiões mediterrâneas orientais (HARRINGTON et al., 2013).

A Dengue está presente no Brasil desde 1845, quando foi registrada a primeira epidemia no estado do Rio de Janeiro. Em 1976 foi estabelecido o programa de erradicação de mosquitos para prevenção da FA urbana. Somente que em 1981 novos casos de Dengue reemergiram pela reinfestação do *A. aegypti* em áreas urbanas no Brasil, a epidemia ocorreu em Roraima pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (SCHNEIDER et al., 2001). O DENV-2 e o DENV-3 foram primeiramente relatados no estado do Rio de Janeiro nos anos de 1990 e 2000, respectivamente, causando novas epidemias e se alastrando pelo país (SIQUEIRA et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2001).

Em 2020, entre a semana epidemiológica (SE) 1 a SE 47 foram reportados 2.163.354 casos de Dengue na Região das Américas (com incidência de 221,6 casos por 100.000 habitantes), incluindo 879 mortes. A taxa de letalidade foi de 0,04%, a menor taxa registrada nos últimos 10 anos. Embora a incidência tenha sido menor que no ano de 2019, ela foi mais alta que nos anos de 2016 a 2018 (WHO, 2020).

No Brasil, no mesmo ano, entre a SE 1 a 38 foram notificados 931.903 casos prováveis (incidência de 443,5 casos por 100.000 habitantes) de Dengue. Nesse período foram confirmados 763 casos de Dengue grave e 8727 casos de Dengue com sinais de alarme e 492 óbitos confirmados (BRASIL, 2020).

No estado do Paraná, entre a SE 31/2019 (primeira semana de agosto) e SE 28/2020 foram confirmados 227.724 casos de Dengue em humanos. Destes, o município de Foz do Iguaçu foi o segundo município com maior número de casos suspeitos confirmados (25.875) e é a localidade com maior número de casos com autoctonia definida (19.240). Nesse período foram detectados três sorotipos circulantes no estado: DENV-1, DENV-2 e DENV-4, sendo Foz do Iguaçu, um dos três municípios com circulação concomitante destes três sorotipos (PARANÁ, 2020b).

2.1.3 Chikungunya

O vírus da Chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* do gênero *Alphavirus* e historicamente era restrito apenas ao Velho Mundo (Europa, África e Ásia). O vírus tem 70 nM de diâmetro, possui capsídeo isosaédrico envelopado com RNA de fita simples de polaridade positiva (ROBINSONM, 1955; ARIAS-GOETA et al., 2014).

Foi isolado pela primeira vez em um PNH africano em 1952 (ROBINSONM, 1955) e na Tanzânia em 1953 durante surto de febre acompanhado de artralgia e erupção cutânea em humanos. Desde então o CHIKV já causou numerosas epidemias na África, Índia e sudeste da Ásia. Em grande parte da África o vírus mantém ciclos enzoóticos (ROBINSONM, 1955; JUPP et al, 1988). É transmitido para os humanos pelos vetores *Aedes aegypti* e *A. albopictus* no ciclo urbano (ROBINSONM, 1955; JUPP et al., 1988; FIGUEIREDO et al., 2014).

Assim como a Febre Amarela, são descritos dois padrões distintos de transmissão: ciclo silvestre e periurbano na África (*Aedes* sp.) e ciclo urbano na Ásia (*A. aegypti*). Também foram relatados quatro genótipos diferentes circulando em partes do mundo: genótipos Oeste Africano (WA), Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL) (WEAVER, 2014).

O CHIKV após inoculação pela picada do *Aedes* sp. atinge o tecido subcutâneo sendo fagocitado pelas células dendríticas que migram para os linfonodos para apresentar os antígenos do vírus ao sistema imunológico (SCHILTE et al., 2010).

Nos humanos os sintomas do CHIKV aparecem entre o segundo ao sétimo dia após a infecção, que são caracterizados por um início abrupto de febre (pico de 39 a 40°C), artralgia, mialgia, dor de cabeça e abdominal, fotofobia, náusea e erupção cutânea (BORGHERINI et al., 2007). A viremia atinge o pico no segundo dia após o início das manifestações clínicas, diminui drasticamente durante o terceiro e quarto dia e sendo indetectável no quinto dia (CAREY et al., 1969).

As lesões articulares, muitas vezes debilitantes, geralmente se resolvem dentro de alguns dias a algumas semanas, e em alguns casos, pode durar de meses a anos. Possui importância não apenas para a saúde pública, como também danos econômicos devido à perda de produtividade humana

(BRIGHTON et al., 1983; CAGLIOTI et al., 2013). Complicações neurológicas também foram reportadas (MAZAUD et al., 1971).

Epidemias de CHIKV ECSA já causaram milhões de casos no Oceano Índico e na Índia desde 2005 (WHO, 2007). Em 2006 na América do Sul, a Guiana Francesa reportou 30 casos de febre da Chikungunya importados da Índia (CDC, 2007). O CHIKV genótipo Asiático foi introduzido nas Américas pelo Caribe, com casos autóctones descritos na América Central em 2013 (FISCHER et al., 2014). Em 2014 a epidemia alcançou a América do Sul, com 200 casos notificados na Venezuela e mais de 1000 casos notificados na Colômbia (PAHO, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde reportou casos importados de febre da Chikungunya em 2010 (BRASIL, 2019). Em setembro de 2014, os primeiros casos autóctones foram identificados em Oiapoque, no estado do Amapá pela linhagem Asiático e em Feira de Santana no estado da Bahia pela linhagem ECSA (NUNES et al., 2015; MADARIAGA et al., 2016). Nos anos de 2014-2015 foram notificados mais de 45.000 casos de Chikungunya no Brasil. A partir de 2016 observou-se aumento expressivo de casos confirmados (63.810) em relação aos anos anteriores (14.033), e em todos os estados da federação, incluindo a ilha de Fernando de Noronha (DA SILVA et al., 2018).

Em 2020, entre a SE 1 e 47 foram reportados 95.339 casos de Chikungunya e confirmados 36.990 casos na Região das Américas (com incidência de 9,77 casos por 100.000 habitantes), sendo o Brasil, o país com maior número de casos reportados (92.718) com incidência de 44,47 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2020).

No estado do Paraná, entre as SE 31/2019 (primeira semana de agosto) e 28/2020 foram confirmados 10 casos de Chikungunya em humanos e no município de Foz do Iguaçu foi confirmado um caso importado, dos 166 casos notificados suspeitos (PARANÁ, 2020b).

O CHIKV silvestre já foi isolado em várias espécies de símios do velho mundo na África, onde circula enzooticamente em PNH e é transmitido por mosquitos silvestres arbóreos. Este achado serve como base para afirmação de que os PNH servem como principais reservatórios e amplificadores da doença (DASZAK et al., 2000; TSETSARKIN et al., 2016; VOLK et al., 2010). Porém não foram observadas manifestações clínicas importantes da doença nos PNH, quando comparados com a Febre Amarela (INOUE et al., 2003). Ademais, o CHIKV já foi isolado de morcegos e esquilos, o que sugere que também há manutenção do ciclo em pequenos mamíferos e em mosquitos não-primatófilicos (CHEVILLON et al., 2008).

2.2 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS SENTINELAS

As populações de PNH de vida livre, são em sua maioria, espécies arbóreas diurnas que apresentam comportamento social diverso e vivem em

uma variedade de ambientes ecológicos, o que facilita a transmissão natural de patógenos (THOISY et al., 2003; WOLFE et al., 1998).

Interações devido à aproximação entre PNH e humanos como desmatamento e ecoturismo aumentam o risco de transmissão viral, pois os PNH atuam como hospedeiros e amplificadores importantes no ciclo de diversas zoonoses e agem como sentinelas naturais na vigilância de vírus emergentes e reemergentes de importância em saúde pública (WOLFE et al., 1998; SVOBODA, 2007), como já mencionados anteriormente.

O papel dos PNH na epidemiologia de cada arbovírus pode variar. Eles podem ser hospedeiros suscetíveis no qual a infecção resulta em altas taxas de mortalidade (por exemplo o YFV), como também podem desempenhar papel importante na manutenção viral como reservatórios ou amplificadores de agentes zoonóticos que têm os seres humanos como hospedeiros definitivos, como por exemplo a manutenção do DENV silvestre no Sudeste Asiático e na África Ocidental (VASILAKIS et al., 2007).

Ações de vigilância ativa, como captura de PNH de vida livre compõe um dos pilares da vigilância de epizootias de Febre Amarela (BRASIL, 2017), e devem ser executadas em conjunto com as ações de vigilância passiva de PNH, já preconizadas pelo Ministério da Saúde (HALLIDAY et al., 2007; SVOBODA, 2007). Ademais, a vigilância ativa se mostra superior à passiva, pois a captura de símios de vida livre não só auxilia na detecção precoce da circulação do YFV, como também de importantes arbovírus como o DENV e CHIKV que causam impactos na saúde pública e econômicos.

O monitoramento de PNH de vida livre deve ser rotineira e eficiente, de forma não somente a alertar precocemente para o risco de emergência desses vírus em locais com populações suscetíveis e prever o risco de epidemia antes que este seja instalado, como também de mitigar o número de pessoas acometidas por essas enfermidades (LUNA, 2002), além de avaliar o efeito da circulação viral nas populações símias no âmbito da medicina da conservação.

Os animais silvestres de vida livre tendem a apresentar o comportamento de ocultar sinais de doença, como estratégia de sobrevivência utilizada para diminuir os riscos de predação, até que o processo de doença esteja muito avançado (MILLER, 1996). Desta forma, a vigilância ativa de PNH para estudos epidemiológicos de patógenos auxilia no controle e prevenção de doenças nas populações de vida livre e beneficia os esforços de conservação (JORGE et al., 2010).

Por fim, é preciso fortalecer as atividades de vigilância em Saúde Única ou *One Health* (homem, animal e meio ambiente) pois a emergência e reemergência destes patógenos são resultados da interação do homem com o meio ambiente (BARATA, 1997; LUNA, 2002), pois o homem impõe maior pressão sobre os animais e seu *habitat*.

2.3 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. A. A.; RAMOS, D. G.; SANTOS, A. L.; PASSOS, P. H. O.; ELKHOURY, A. N. S. M.; COSTA, Z. G. A.; LEAL, S. G.; ROMANO, A. P. M. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da Febre Amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 527-536, 2011.

BARATA, R. C. B. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1997.

BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of Yellow Fever virus. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 291–315, 2003.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of Dengue. **Nature**, v. 496, p. 504–507, 2013.

BORGHERINI, G.; POUBEAU, P.; STAIKOWSKY, F. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1401–1407. 2007.

BOULOS, M. Doenças emergentes e reemergentes no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 29, n.170, p. 58-60, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 16 anos SVS. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019 – Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Brasília, 2019a. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico nº 41. Volume 51. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (Dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020. Brasília, 2020. Disponível em: < https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/outubro/23/boletim_epidemiologico_svs_41.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da Febre Amarela. 2 ed. Brasília, 2014. Disponível em: <https://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 169, de 2019 – CGARB/DEIDT/ SVS/ MS. Brasília, 2019b. Disponível em: < <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/28/Nota-Informativa->

CGARB-169-2019-Plano-de-acao-regiao-sul.pdf >. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Febre Amarela: guia para profissionais de saúde. Brasília, 2017. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_saude.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento das Doenças Transmissíveis. Informe nº 18 – 2019 – Monitoramento de Febre Amarela Brasil – 2019. Brasília, 2019b. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde – volume único, 1ª ed. Brasília, 2016. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2005. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRIGHTON, S. W.; PROZESKY, O. W.; DE LA HARPE, A. L. Chikungunya virus infection: a retrospective study of 107 cases. **South African Medical Journal**, v. 63, p. 313–315, 1983

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of Yellow Fever virus into the Americas. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

CAGLIOTI, C.; LALLE, E.; CASTILLETI, C.; CARLETTI, F.; CAPOBIANCHI, M. R.; BORDI, L. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**, v. 36, p. 211–227, 2013.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: Monath, T. P. ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, vol. I. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 19–57, 1998.

CAREY, D. E.; MYERS, R. M.; DERANITZ, C. M.; JADHAV, M.; REUBEN, R. The 1964 Chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent Dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 434–445, 1969.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. First Reports of Chikungunya in Western hemisphere. Press Release. Georgia, 2007. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2013/p1218-Chikungunyas.html>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

CHEVILLON, C.; BRIANT, L.; RENAUD, F.; DEVAUX, C. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends Microbiology**, v.16, p. 80–88, 2008.

CUNHA, M. S.; DA COSTA, A. C.; DE AZEVEDO FERNANDES, N. C. C.; GUERRA, J. M.; DOS SANTOS, F. C. P.; NOGUEIRA, J.S.; et al. Epizootics due to Yellow Fever virus in São Paulo state, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–13, 2019.

DA SILVA, N. M.; TEIXEIRA, R. A. G.; CARDOSO, C. G.; SIQUEIRA JUNIOR, J. B.; COELHO, G. E.; DE OLIVEIRA, E. S. F. Vigilância da Chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. *Epidemiologia e Serviços da Saúde*, v. 27. n. 3, p., 2018.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443–449, 2000.

DIGOUTTE, J. P.; CORNET, M.; DEUBEL, V.; DOWNS, W. G. Yellow fever. In: PORTERFIELD, J. S. (ed). **Exotic viral infections (Kass handbook of infectious diseases)**. London: Chapman & Hall Medical, p. 67–102, 1995.

ENDY, T. P.; WEAVER, S. C.; HANLEY, K. A. Dengue virus - past, present and future. In: HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. (ed). **Frontiers in Dengue Virus Research**. Norwich, U.K.: Horizon Press, p. 3–9, 2010.

FAUCI, A. S. Emerging and Reemerging Infectious Diseases: The Perpetual Challenge. **Academic Medicine**, v. 80, n. 12, p 1079-1085, 2005.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014

FISCHER, M.; STAPLES, J.E. Notes from the field: Chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, p. 500-501, 2014.

GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; DE LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K. I.; DZHIVANIAN, T. I.; GOULD, E. A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1867–1876, 2001.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N. The Arboviruses: Quo Vadis?. In: VASILAKIS, N.; GUBLER, D.J. **Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control**. UK: Caister Academic Press, p.1-6, 2016.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, p. 289-295, 2012.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. *In*: Marquardt, M. C. **Biology of Disease Vectors**. Elsevier Academic Press: New York, NY, USA, p. 167-185, 2005.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of Dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2003.

INOUE, S.; MORITA, K.; MATIAS, R. R.; TUPLANO, J. V.; RESUELLO, R. R.; CANDELARIO, J. R.; CRUZ, D. J.; MAPUA, C. A.; HASEBE, F.; IGARASHI, A.; NATIVIDAD, F. F. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, n. 2, p. 89-94, 2003.

INSTITUTE, I. L. R. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. Zoonoses Project 4. Report to Department for International Development, UK. Nairobi, Kenya. International Livestock Research Institute, 2012.

JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; MAY-JUNIOR, A. J.; MORATO R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 686-710, 2010.

JUPP, P. G.; MCINTOSH, B. M. Chikungunya virus disease. *In*: MONATH, T. P. **The Arbovirus: Epidemiology and Ecology**, vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 137–157, 1988.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. Santo Antonio, TX: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, p.1147, 1985.

KINDLOVITS, L. M.; KINDLOVITS, A. **Febre amarela: clínica e terapêutica em primatas tropicais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, p. 190-191, 2009.

LINDENBACH, B. D.; MURRAY, C. L.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae. *In*: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M., editors. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2013.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. *In*: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1101-1152.

LLOYD-SMITH, J. O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R. C.; DOBSON, A. P.; HUDSON, P. J.; GRENFELL. Epidemic dynamics at the human-animal interface. **Science**, v. 326, n. 5958, p. 1362-1367, 2009.

- LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 229-243, 2002.
- MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 01, p. 91-8, 2016.
- MAY, R. M.; GUPTA, S. Infectious disease dynamics: What characterizes a successful invader?" **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences**, v. 356, n. 1410, p. 901-10, 2001.
- MAZAUD, R.; SALAUN, J. J.; MONTABONE, H.; GOUBE, P.; BAZILLIO, R. Acute neurologic and sensorial disorders in Dengue and Chikungunya fever. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales**, v. 64, p. 22–30, 1971.
- MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. M.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; SIMOONS, C. P.; HAY, S. I. Global spread of Dengue virus types: mapping the 70-year history. **Cell Reviews**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.
- MILLER, R. E. Quarantine protocols and preventive medicine procedures for reptiles, birds and mammals in zoos. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 15, n. 1, p. 183-189, 1996.
- MIR, D.; DELATORRE, E.; BONALDO, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VICENTE, A. C.; BELLO, G. Phylodynamics of Yellow Fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–9, 2017.
- MONATH, T. P. Epidemiology of Yellow Fever: current status and speculations on future trends. In: SALUZZO, J. F.; DODET, B (ed). **Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases**. Paris: Elsevier, p. 143-156, 1997.
- MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 11-20, 2001.
- MONATH, T. P. Yellow fever. In: MONATH, T. P. (ed). **Arboviruses: ecology and epidemiology, Volume V**. Boca Raton: CRC Press, p.139- 241, 1988.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–73, 2015.
- MONATH, T.P.; HEINZ, F.X. **Flaviviruses**. Lippincott & Raven CRC Press, 1996.
- MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, p. 1-7, 2013.

MORENO, E.S.; SPINOLA, R.; TENGAN, C. H.; BRASIL, R. A.; SICILIANO, M. M.; COIMBRA, T. L.; SILVEIRA, V. R.; ROCCO, I. M.; BISORDI, I.; SOUZA, R. P.; PETRELLA, S.; PEREIRA, L. E.; MAEDA, A. Y.; SILVA, F.G.; SUZUKI, A. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 45-50, 2013.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 1, n. 1, p. 7-15, 1995.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of Dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in Dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, p. 67-70, 2014.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925–926, 2001.

NORMILE, D. Surprising new Dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, p. 415, 2013.

NUNES, M. R.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M. GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; OLIVEIRA, L. F. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 102, p.1-10, 2015.

PAHO. Pan American Health Organization. Chikungunya outbreaks. Washington, 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PARANÁ. Boletim epidemiológico Febre Amarela nº 13 13/05/2020. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Superintendência de Vigilância em Saúde. Curitiba, 2020a. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-06/boletim_fa_13052020.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PARANÁ. Situação da Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Paraná 2019/2020. Informe Técnico 43 – Semana Epidemiológica 31/2019 a 28/2020 (28/07/2019 a 11/07/2020). Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Superintendência de Vigilância em Saúde. Curitiba, 2020b. Disponível em: <http://www.Dengue.pr.gov.br/sites/Dengue/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/boletimDengue43_2020.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PAZ, F. A. Z.; BERCINI, M. A. Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública. **Boletim Saúde**, v 23, n 1, p 9-13. 2009.

PUERTA-GUARDO, H.; MOSSO, C.; MEDINA, F.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.; DEL-ANGEL, R. Antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection in

U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. **Journal General Virology**, v. 91, p. 394-403, 2010.

PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 540-550, 2009.

REGIS, L. N.; ACIOLI, R. V.; SILVEIRA JR., J. C.; et al. Sustained reduction of the Dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, e67682, 2013.

ROBERTSON, S. E. The immunological basis for immunization series: Yellow fever. World Health Organization (Document WHO/EPI/ GEN/93.18), Geneva, 1993.

ROBINSONM, C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-1953. I. Clinical features. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 49, p. 28-32, 1955.

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

ROTHMAN, A. L. Immunity to Dengue virus: a tale of original antigenic sin and cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p.130-151, 2012.

SAAD, L. C.; BARATA, R. B. Surtos de Febre Amarela no estado de São Paulo, 2000-1020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 3, p. 531-540, 2016.

SCHILTE, C.; COUDERC, T.; CHRETIEN, F. et al. Type I IFN controls Chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 429-442, 2010.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. A timeline for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. Pan American Health Organization, Division of Disease Prevention and Control, 2001.

SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. M. T.; COELHO, G. E.; DA ROCHA SIMPLICIO, A. C.; HATCH, D. L. Dengue and Dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.

SOPER, F. L. Ventures in world health. Report number 355. Pan American Health Organization PAHO scientific publication. Washington (D.C.): Pan American Health Organization, 1977.

SOUZA, R. P. **Filogeografia da Febre Amarela na América do Sul**. 2013. 136f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

STRODE, G.K. Yellow fever. New York: McGraw-Hill, 1951.

SVOBODA, W. K. **Vigilância de epizootia em primatas não humanos como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de Interesse em Saúde Pública**. 2007. 135f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

TAYLOR, R. M. Epidemiology. In: STRODE, G. K. (ed). **Yellow fever**. New York: McGraw Hill, p. 427-459, 1951.

THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro vírus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 9, p. 1326-1329, 2003.

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and Chikungunya virus emergence. **Current Opinion Virology**, v. 16, p. 143–150, 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. **Febre amarela**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2000.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v 44, n 6, p 1144-1149, 2010.

VASILAKIS, N.; HOLMES, E. C.; FOKAM, E. B. et al. Evolutionary processes among sylvatic Dengue type 2 viruses. **Journal of Virology**, v. 81, p. 9591–9595, 2007.

VOLK, S. M.; CHEN, R.; TSETSARKIN, K. A. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, p. 6497–6504, 2010.

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to Dengue virus infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, 2011.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARETT, A. D. T.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 7, p. 3227–3234, 2000.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, e2921, 2014.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 285-314, 2006.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2009.

WEAVER, S.C. Vector biology in viral pathogenesis. In: NATHANSON, N. **Viral Pathogenesis**. New York: Lippincott-Raven, p. 329–352, 1997.

WHO. World Health Organization. Pan American Health Organization. Epidemiological Update Dengue in the context of COVID-19. 3 December 2020, Washington, D.C. Washington, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53174/EpiUpdate3December2020_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. n. 30. v. 91. p. 349-364. Washington, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization. WHO report of outbreaks of Chikungunya 2005, 2006, 2007. Washington, 2007. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Chikungunya>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 147. Washington, 2009. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KILBOURN, A.; SPIELMAN, A.; LAL, A. A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 4, p. 149-158, 1998.

HUGHES, H. R.; ADKINS, S.; ALKHOVSKIY, S.; BEER, M.; BLAIR, C.; CALISHER, C. H.; DREBOT, M.; LAMBERT, A. J.; SOUZA, W. M.; MARKLEWITZ, M.; NUNES, M. R. T.; SHÍ, X.; ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Peribunyaviridae. **Journal of General Virology**, v. 101, n. 1, p. 1-2, 2020.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a circulação de arbovírus de importância em Saúde Pública em PNH cativos e de vida livre no município de Foz do Iguaçu, Paraná.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a captura, avaliação física e coleta de material biológico em diferentes espécimes de PNH do Zoológico Municipal Bosque Guarani e do Zoológico Roberto Ribas Lange, como parte do Programa de Medicina Veterinária Preventiva destas instituições.
- Realizar a captura, avaliação física, coleta de material biológico e marcação (*microchips*) em macacos-prego (*Sapajus nigritus*) de vida livre na Área de Proteção Permanente da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional.
- Investigar a infecção aguda de DENV (sorotipos 1 a 4), YFV e CHIKV nos primatas neotropicais de cativeiro e de vida livre por RT-qPCR.

4 MOLECULAR INVESTIGATIONS OF ARBOVIRUSES OF INTEREST IN PUBLIC HEALTH IN NON-HUMAN PRIMATES IN A MUNICIPALITY ON THE TRIPLE INTERNATIONAL BORDER (BRAZIL, PARAGUAY, ARGENTINA)

Capítulo dedicado ao artigo “Molecular investigations of arboviruses of interest in public health in non-human primates in a municipality on the triple international border (Brazil, Paraguay, Argentina)”. O artigo segue as normas da revista *Zoonoses and Public Health*.

Molecular investigations of arboviruses of interest in public health in non-human primates in a municipality on the triple international border (Brazil, Paraguay, Argentina)

Stacy Wu, Walfrido Kühn Svoboda, Robson Michael Delai, Pedro Henrique Ferreira Teles, Zalmir Silvino Cubas, Patricia Hoerner Cubas, Amanda Haisi, João Pessoa Araújo Júnior, Silvia Cristina Osaki

Abstract

Arboviruses are viruses with zoonotic potential that cause emerging and reemerging diseases such as the Yellow Fever virus and the Dengue virus of the Flaviviridae family and the Chikungunya virus, which belongs to the Togaviridae family, arboviruses that represent a serious public health problem in the world. The role of non-human primates (NHP) as reservoirs of arboviruses is still poorly understood, so capturing and monitoring of asymptomatic non-human primates helps in the early detection of viral circulation and risk prediction, which is an action of active surveillance. This study aimed at the molecular detection of Yellow Fever, Dengue 1-4, and Chikungunya viruses by RT-qPCR in whole blood samples from 38 NHP captives from the Municipal Bosque Guarani Zoo and Roberto Ribas Lange Zoo and 29 free-living *Sapajus nigritus* in the Permanent Protection Area of the Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant in the municipality of Foz do Iguaçu, State of Paraná, Brazil from October 2019 to March 2020. All samples were negative for the presence of viral genomic RNA target fragments by RT- qPCR of the viruses that cause the arboviruses studied. Negative results indicate that the analyzed NHPs did not show acute infection by these arboviruses, thus not presenting a risk of viral transmission to vectors during the period in which the samples were collected.

Keywords: Chikungunya, Dengue, One Health, neotropical primates, Yellow Fever.

Impacts

- All samples were negative for the presence of YFV viral genomic RNA target fragments, DENV 1-4 and CHIKV by RT-qPCR, indicating no active infection in the evaluated NHP.
- The absence of active infection suggests the inexistence of the wild cycle in the NHP in the municipality of Foz do Iguaçu, Paraná – Brazil, during the period of the collected samples.

1 Introduction

The emergence and re-emergence of infectious diseases is a natural phenomenon and is related to the evolution, adaptation, and survival of microorganisms such as arboviruses (DeFilippis et al., 2001). The ability of these viruses to cause disease in humans depends on factors ranging from epidemiological to viral genetics (Luna, 2002; Weaver et al., 2009). In recent decades, the prevalence of arboviruses has increased considerably due to the

intensification of international trade and travel. It can be observed over time that the number of cases in endemic regions increased, as well as the emergence in regions that never existed before (Weaver, 2013).

Arboviruses are viruses with zoonotic potential of public health importance, transmitted by hematophagous arthropods, such as mosquitoes and sandflies, and this designation is related to the replicative cycle of the virus, which can also occur in these invertebrate animals. They often cause hemorrhage, liver disease, febrile syndrome, and arthritis in vertebrate animals, including humans. (Rust, 2012). The arboviruses of the *Flaviviridae* and *Togaviridae* family comprise some viruses potentially pathogenic to humans, with an importance for public health (Heinz et al., 2012). Among them, the Yellow Fever virus (YFV) occurring in peri urban areas and Dengue virus serotypes 1-4 (DENV 1-4), both belonging to the genus *Flavivirus*, occurring in urban areas, together with the Chikungunya virus (CHIKV), a recent emerging disease in Brazil, of the *Alphavirus* genus.

These arboviruses are present in nature through two distinct cycles, the urban and the wild, which are maintained in complex biological cycles (Mayer et al., 2017). Dengue, Yellow Fever and Chikungunya originated from non-human primates (PNH) in enzootic cycles that act as natural reservoirs, favoring the resurgence of these diseases after human epidemics pass and collective immunity declines (Jones et al., 2008; Tongthainan et al., 2020).

These arboviruses adapted to the urban cycle have the capacity to spread throughout the tropical region of the world, causing large epidemics with high morbidity and fatal cases. YFV causes severe hepatitis and hemorrhagic fever in 10% of cases (Vasconcelos, 2003). The four DENV serotypes have the potential to cause acute febrile illness, and, in some cases, it can worsen the disease due to plasma leakage in the microcirculation that leads to shock and death (WHO, 2009), CHIKV, in addition to causing the disease acute febrile, patients end up developing arthropathy that becomes chronic over time and impacts the quality of life (Nunes et al., 2015).

The municipality of Foz do Iguaçu-PR is in the extreme west of the state of Paraná, being the second largest border city (Brazil-Paraguay-Argentina) and the third most popular in Brazil as a tourist destination, with approximately 700,000 inhabitants when added to the border population of Paraguayans from Ciudad del Este and Argentines from Puerto Iguazú. It has a humid climate with hot summers and an average annual rainfall of 900 mm (Portal Brasil, 2014; Costa et al., 2015). It is one of the municipalities with a high incidence of dengue and the second highest number of suspected cases reported in the period 2019/2020 (Paraná, 2020). Its strategic geographic location, combined with its epidemiological condition, the unique commercial and tourism scenario that stimulates the intense daily flow of people, makes Foz do Iguaçu an international threat to public health (Leandro et al., 2019).

Active surveillance, which is the capture of free-living neotropical primates, helps in the early detection of arboviruses with a great impact on public health and economy, to anticipate the risk of emergence and re-emergence of these

viruses in susceptible populations and thus mitigate the number of affected people (BRASIL, 2014b). Therefore, this study aimed to investigate the presence of arboviruses of public health interest, specifically YFV, DENV1-4 and CHIKV in asymptomatic captive and free-living NHPs in the municipality of Foz do Iguaçu, using the technique RT-qPCR.

2 Materials and methods

2.1 Ethics statement

This work was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of the Federal University of Paraná – Sector Palotina with protocol CEUA/Palotina 16/2019 and by the Authorization and Information System in Biodiversity – SISBIO under registration number 69136/1.

2.2 Study area

The present work was carried out in three locations in the municipality of Foz do Iguaçu, Paraná. The animals used in the experiment were captives, from the Municipal Bosque Guarani Zoo (MBGZ) (25°31'59.73" S 54°35'23.22" W) (n=24) and from the Roberto Ribas Lange Zoo (RRLZ) – Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant (25°27'00.45" S 54°32' 59.40" O) (n=14). The capture of free-living NHP was carried out at two points, attached to the captive capuchin monkey enclosure (25°26'58.95" S 54°32'55.09" W) and in the corridor of the captive deer enclosures (25°26'49.67" S 54°33'5.87" W) of the RRLZ inserted in the Permanent Protection Area of the Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant (PPA-IB) (n=29).

2.3 Animals and biological samples

The collections of the NHP took place from October 2019 to March 2020. The capture, evaluation and blood collection of captive animals coincided with the preventive medicine program of the fauna enterprises, where the animals are annually sedated for clinical and dental evaluation and collection of biological samples as a way of preventing illnesses, correcting management, and feeding, to enhance the quality of life, according to the zoo's animal welfare guidelines. The restraint of the animals was carried out by chemical restraint, using the association of ketamine hydrochloride 10mg/kg, xylazine 0.5mg/kg and midazolam maleate 0.3mg/kg, administered by syringe intramuscularly.

For the captures of free-living PNH were established two places that the animals regularly visit within the PPA-IB, where the RRLZ is inserted. Five galvanized live traps of the "Tomahawk" type (measurements 115cm(l) x 55cm(w) x 60(h)) were used with automatic activation on the floor after habituation to the bait with seasonal fruits, boiled egg, chicken neck and peanut butter. The animals captured in the trap followed the same protocol mentioned above, of chemical restraint. After sedation, the animals were submitted to physical evaluation, biometrics, blood collection by venipuncture in the femoral vein and feces collection when present in the trap. The captured animals were individually identified with electronic marking (microchip) in the interscapular region with subcutaneous application. The NHP were kept under observation in

transport boxes until complete return of the anesthetic plan and followed by their return to the natural environment, preferably at the same collection point.

Altogether, samples of 67 animals were collected, divided into four genera, namely, *Alouatta* (n=7), *Callithrix* (n=5), *Leontopithecus* (n=3) and *Sapajus* (n=52). In the MBGZ, 24 animals were evaluated, in the RRLZ 14 animals, and 29 asymptomatic free-living capuchin monkeys (*S. nigritus*) were sampled in the PPA-IB (Table 1).

Aliquots of whole blood were stored at -70° until processing.

Table 1 - Species distribution, sex, capture location (free-living or captive) of NHP evaluated between October 2019 and March 2020 in the municipality of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

Primate species	Captivity		Free living	Sex		Total
	MBGZ	RRLZ	PPA-IB ³	Females	Males	
<i>Alouatta caraya</i>	1	6	-	4	3	7
<i>Callithrix penicillata</i>	5	-	-	1	4	5
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	3	-	-	1	2	3
<i>Sapajus nigritus</i>	15	8	29	19	33	52

¹ MBGZ – Municipal Bosque Guarani Zoo

² RRLZ – Roberto Ribas Lange Zoo

³ PPA-IB – Permanent Protection Area of the Itaipu Binacional Hydroelectric Power Plant

2.4 RNA extraction

Viral RNA from whole blood samples was extracted using the MagaZorb® Total RNA Mini-Prep Kit (Promega, USA) and MagMax™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. A volume of 200 µL and 400 µL of the sample was used, respectively, with a final elution of 100 µL.

2.5 cDNA synthesis

All samples were treated with the RQ1 Rnase-Free DNase Kit (Promega, USA) prior to cDNA synthesis with the ImProm-II kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturers' recommendations. Initially, 4 µL of RNA treated with RQ1 (Promega) were incubated with 1 µL of random primers (250 ng / µL) at 70°C for 5 min and then cooled to 4°C for 1 min. For the reverse transcription reaction, 4 µL of ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 2.4 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL of dNTP (20 mM), 200 U of ImProm-II™ Reverse Transcriptase were used, 20U of recombinant RNAsin® ribonuclease inhibitor and water to make up to a volume of 20 µL. The mix was incubated with 5 µL of RNA containing random primers at 25°C for 5 min, 48°C for 60 min and 70°C for 15 min.

2.6 Real-time polymerase chain reaction (qPCR)

All reactions were performed in a 96-well plate and subjected to amplification in the AriaMX real-time PCR system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). For all assays, positive controls from culture samples (DENV-1, 2, 3, 4, CHIKV or YFV) and negative control (nuclease-free water) were included.

2.6.1 Detection of DENV and CHIKV by SYBR®

For DENV detection, the PCR mix contained 10 µL of 2x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0.4 µL (10 pmol) of each DENV-PCR-FP and DENV-PCR-RP primer (Wahed et al., 2015). For the detection of CHIKV, the PCR mix included 10 µL of 2x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and 0.6 µL (10 pmol / µL) of each CHIKV FP1 and CHIKV RP1 primer (Patel et al, 2016). In both reactions, 2 µL of cDNA and nuclease-free water were used to bring the final volume of the reaction to 20 µL. The cycles performed were initial denaturation of 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, followed by the dissociation curve.

2.6.2 YFV detection by TaqMan®

Detection of YFV was performed using 2 µL cDNA, 10 µL 2X GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega), 0.4 µL (10pmol) of each primer (YFallF, YFallR), 0.2 µL (10pmol) of YFallP probe (Domingo et al, 2012) and nuclease-free water to make the final reaction volume up to 20 µL. The reaction was subjected to initial denaturation at 95°C for 15 minutes, 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 45 seconds.

3 Results

All animals were clinically healthy on physical evaluation. The presence of viral genomic RNA target fragments was not detected by RT-qPCR for the arboviruses investigated. These results demonstrate the absence of active infection by YFV, DENV1-4 and CHIKV viruses in the captive and free-living PNH population analyzed between October 2019 and March 2020.

4 Discussion

YFV, DENV 1-4 and CHIKV are enveloped RNA viruses and are the cause of the most significant arboviruses worldwide (Kuno et al., 1998; Weaver, 2014). YFV and CHIKV were initially found in African NHP, and DENV1-4 were found in Southeast Asian NHP, transmitted by treetop mosquitoes (Hanley et al., 2013). In South America, DENV1-4 and CHIKV are capable of infecting wild animals and transferring from the urban to the wild cycle, as has already happened with the YFV (Figueiredo, 2019).

Despite the wide circulation of flaviviruses throughout the region of Foz do Iguaçu-PR (Góis, 2017), the present study demonstrated that there was no risk of YFV, DENV1-4 and CHIKV transmission in captive and free-living non-human primates in the period in which the samples were collected. The absence of acute infection observed in these neotropical monkeys may be related to the difficulty of collecting samples from these animals at the peak of viremia, which has a short period, from one to seven days and, depending on the species, they do not

present clinical manifestations of the disease (Chen et al., 2010; Engelmann et al., 2014; Althouse et al., 2014).

Since the re-emergence of the YFV in the Midwest region of Brazil in 2014, the virus has advanced in areas with low vaccination coverage throughout the Brazilian territory. In monitoring in 2018/2019, the virus entered the states of Paraná and Santa Catarina through the coastal region, causing outbreaks of lesser magnitude compared to previous years (Brasil, 2020). These confirmed events indicated that the virus would be dispersing westwards in the state of Paraná, with an expected arrival in the far west in October and November 2019 (Brasil, 2019). These confirmed events indicated that the virus would be dispersing towards the west of the state of Paraná, with an expected arrival in the far west in October and November 2019 at the height of the captures, however none of the animals in the study presented an acute infection by YFV. Neotropical primates are more susceptible to Yellow Fever and especially HNP of the genus *Alouatta* that die because of the disease, representing a great concern in relation to the conservation of the species (Moreno et al., 2013). In the same period of the recent big outbreak of Yellow Fever (2016-2018), more than 2500 epizootics were confirmed and in the following years (2019-2020) the number dropped significantly to 38 epizooties (Brasil 2018; Brasil 2020). The capture and assessment of captive and free-living NHP is part of the YFV's active surveillance strategy advocated by the Ministry of Health, which reinforces actions for early detection of viral circulation and risk prediction, based on the dispersion pattern and ecological corridors traced because the illness of the animals can be seen during the execution of the activity, before the alert of passive surveillance (Brasil, 2014).

CHIKV, like YFV, emerged from the enzootic cycle between HNP and wild African mosquitoes and managed to establish a rural/urban cycle where *Aedes aegypti* ensured inter-human transmission (Diallo et al., 1999). In laboratory tests, *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes terreus*, wild mosquitoes widely found in the forests of the American continent, also have a great capacity to transmit CHIKV (Lourenço-de-Oliveira et al., 2017). The absence of acute CHIKV infection in the NHP corroborates the results of Moreira-Soto et al (2018), where they analyzed 207 samples of free-living and captive NHP from the Northeast and Midwest of Brazil. It is not yet known whether the South American primates can act as a reservoir for Chikungunya, as occurred with Yellow Fever. The establishment of the wild cycle of Chikungunya in the Americas would have immediate consequences for public health, as there are still no efficient methods for controlling arboviruses. (Lourenço-de-Oliveira et al., 2017). Thus, surveillance actions are needed, such as collecting samples of wild monkeys and mosquitoes to assess the occurrence of natural infection.

Dengue is still a cause of Brazilian calamity, with more than 10 million cases reported in recent years (Figueiredo, 2019). Just as the YFV wild cycle originated in Africa and was introduced in the New World, the DENV wild cycle originated in Asia, which spread throughout Africa, having as its main wild animal reservoir, the HNP (Hanley et al., 2013). Epidemiological studies in wild mammals

suggest that the circulation of Dengue follows an epidemiological pattern, without clinical manifestations in hosts (de Silva et al., 1999). Reports of dengue epizootics in humans in Africa (Carey et al., 1971) and Asia (Cardosa et al., 2009) have also been described. In a study carried out in the Atlantic Forest of the state of Bahia, antibodies to DENV-1 and 2 were found in two PNH species (Catenacci et al., 2018). Although it is not completely clear, there are possibilities that wild Dengue cycles are occurring in South America, in contrast to Hayes et al. (1996), although more studies are needed to prove this hypothesis. The absence of viral genomes for DENV1-4 in NHP does not prove the non-viral circulation, given the high circulation of the virus in vectors (Góis, 2017) and reports of confirmed cases in humans in this region by DENV-1, 2 and 4 (Paraná, 2020) in the investigation period.

As with the YFV, the establishment of maintenance of the wild cycle of DENV and CHIKV is possible and may promote re-emergence causing outbreaks in humans and making their control difficult (Figueiredo, 2019). The high morbidity and fatal cases that these arboviruses cause in large epidemics (Paz et al., 2019; Figueiredo, 2019) justifies monitoring the circulation of the virus in vectors and reservoirs and the impact on humans in terms of public health and the conservation of wild species.

Conclusion

The absence of molecular evidence of infection by YFV, DENV1-4 and CHIKV in the NHP study demonstrates the absence of acute infection (viremia) in the sampled animals, indicating a low risk of transmission to arthropod vectors, suggesting the non-circulation of these viruses during the sampling period. Despite the negative results, the importance of these studies contributes to the epidemiological data in the municipality of Foz do Iguaçu-PR due to its geographic, tourist, economic and social characteristics. Thus, the need for epidemiological studies in neotropical primates is fundamental to the historical context of emergence and re-emergence of zoonotic diseases such as arboviruses.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Althouse, B. M., Durbin, A. P., Hanley, K. A., Halstead, S. B., Weaver, S. C., & Cummings, D. A. (2014). Viral kinetics of primary Dengue virus infection in non-human primates: a systematic review and individual pooled analysis. *Virology*, 452–453, 237–246. doi: 10.1016/j.virol.2014.01.015.

- Brasil. (2014). Guia de vigilância em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da Febre Amarela/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Retrieved from https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf.
- Brasil. (2018). Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018, informe nº 27. Brasília: Ministério da Saúde. Retrieved from <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>
- Brasil. (2019). Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 169, de 2019 – CGARB/ DEIDT/ SVS/ MS. Brasília: Ministério da Saúde. Retrieved from <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/28/Nota-Informativa-CGARB>
- Brasil. (2020). Boletim epidemiológico 01 – Situação epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020. Brasília: Ministério da Saúde. Retrieved from <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/15/Boletim-epidemiologico-SVS-01.pdf>
- Cardosa, J., Ooi, M. H., Tio, P. H., Perera, D., Holmes, E. C., Bibi, K., & Abdul M. Z. (2009). Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with Dengue hemorrhagic fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3(4), e423. doi: 10.1371/journal.pntd.0000423.
- Carey, D. E., Causey, O. R., Reddy, S., & Cooke, A. R. (1971). Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964–68. *Lancet*, 1(7690), 105–106. doi: 10.1016/s0140-6736(71)90840-3.
- Catenacci, L. S., Ferreira, M., Martins, L. C., De Vleeschouwer, K. M., Cassano, C. R., Oliveira, L. C., Canale, G., Deem, S. L., Tello, J. S., Parker, P., Vasconcelos, P. F. C., & Travassos da Rosa, E. S. (2018). Surveillance of arboviruses in primates and sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *Ecohealth* 15(4), 777–791. doi: 10.1007/s10393-018-1361-2.
- Chen, C.-I., Clark, D. C., Pesavento, P., Lerche, N. W., Luciw, P. A., Reisen, W. K., & Brault, A. C. (2010). Comparative Pathogenesis of Epidemic and Enzootic Chikungunya Viruses in a Pregnant Rhesus Macaque Model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(6), 1249-1258. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0290.
- Costa, R. S., & Scheer, M. A. P. S. (2015). Tríplice fronteira (AR/BR/PY): estudo da variabilidade climática, período de 1990 a 2013. XV Encontro de Geógrafos da América Latina – Havana-Cuba. Retrieved from <http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal15/Procesosambientales/Climatologia/03.pdf>.

- de Silva, A. M., Dittus, W. P., Amerasinghe, P. H., & Amerasinghe, F. P. (1999). Serologic evidence for an epizootic Dengue virus infecting toque macaque (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 300–306. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.300.
- DeFilippis, V.R., & Villareal, L.P. (2001). Virus evolution. In: Knipe, D.M., & Howley, P.M. (eds) *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 353-370.
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M., & Fontenille, D. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 281–286. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.281.
- Domingo, C., Patel, P., Yillah, J., Weidmann, M., Méndez, J. A., Nakouné, E. R., & Niedrig, M. (2012). Advanced Yellow Fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4054-4060. doi: 10.1128/JCM.01799-12.
- Engelmann, F., Josset, L., Girke, T., Park, B., Barron, A., Dewane, J., Hammarlund, E., Lewis, A., Axthelm, M. K., Slifka, M. K., & Messaoudi, I. (2014). Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic Yellow Fever in a rhesus macaque model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3295. doi: 10.1371/journal.pntd.0003295.
- Figueiredo, L. T. M. (2019). Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatic maintenance cycles in South America. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9:259. doi: 10.3389/fcimb.2019.00259.
- Góis, F. R. (2017). Investigação de arbovírus (gênero Flavivírus) de interesse à saúde pública em mosquitos (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) em Foz do Iguaçu, Paraná. [Master's thesis (dissertation) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde]. Universidade Federal do Paraná. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1884/47395>
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., & Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of Dengue virus and Yellow Fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 292–311. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.008.
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., & Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of Dengue virus and Yellow Fever virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 292-311. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.008.

- Hayes, C. G., Phillips, I. A., Callahan, J. D., Griebenow, W. F., Hyams, K. C., Wu, S. J., Watts, D. M. (1996). The epidemiology of Dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(4), 459–463. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.459.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451 (7181), 990–993. doi: 10.1038/nature06536.
- Kuno, G., Gwong-Jen, J., Tsuchiya, C. K. R., Karabatsos, N., & Cropp, B. (1998). Phylogeny of the genus flavivirus. *Journal Virology*. 72(1), 73–83. doi: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998.
- Leandro, A. S., Britto, A. S., Rios, J. A., Galvão, S. R., Kafka, R. et al. (2019). Molecular detection of Dengue Virus in mosquitoes as an early indicator to aid in the prevention of human infection in endemic areas. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 20(1), 54-59. doi: 10.1089/vbz.2018.2411.
- Lourenço-de-Oliveira, R., & Failloux, A. B. (2017). High risk for Chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), e0005698. doi: 10.1371/journal.pntd.0005698.
- Luna, E. J. A. (2002). A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 5(3), 229-243. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2002000300003>
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on Dengue, Chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155-163. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.020.
- Moreira-Soto, A., Carneiro, I. D. O., Fischer, C., Feldmann, M., Kümmerer, B. M., Silva, N. S., Santos, U. G., Souza, B. F. D. C. D., Liborio, F. D. A., Valença-Montenegro, M. M., Laroque, P. D. O., da Fontoura, F. R., Oliveira, A. V. D., Drosten, C, de Lamballerie, X., Franke, C. R., & Drexler, J. F. (2018). Limited evidence for infection of urban and peri-urban nonhuman primates with Zika and Chikungunya viruses in Brazil. *mSphere Journal*, 3(1), e00523-17. doi: 10.1128/mSphere.00523-17.
- Moreno, E. S., Spinola, R., Tengan, C. H., Brasil, R. A., Siciliano, M. M., Coimbra, T. L. M., Silveira, V. R., Rocco, I. M, Bisordi, I., Souza, R. P., Petrella, S., Pereira, L. E., Maeda, A. Y., da Silva, F. G., & Suzuki, A. (2013). Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(1), 45–50. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000100008>.
- Nunes, M. R. T., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U. G., de Oliveira, L. F., Azevedo, R. S. S., Silva, D. E. A., Silva, E. V. P., Silva, S. P., Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C. R., Rodrigues, S. G.,

- Vianez Jr, J. L. S. G., Nunes, B. T. D., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., Pybus, O. G. & Vasconcelos, P. F. C. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*. 13(102). doi: 10.1186/s12916-015-0348-x.
- Paraná. (2020). Situação da Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Paraná 2019/2020. Informe técnico 32 – Semana Epidemiológica 31/2019 a 13/2020. Governo do Estado do Paraná. Retrieved from http://www.Dengue.pr.gov.br/sites/Dengue/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/boletimDengue32_2020.pdf
- Patel, P., Abd El Wahed A., Faye, O., Prüger, P., Kaiser, M., Thaloengsok, S., Ubol, S., Sakuntabhai, A., Leparc-Goffart, I., Hufert, F. T., Sall, A. A., Weidmann, M., & Niedrig, M. (2016). A Field Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 10(9): e0004953. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004953>
- Paz, F. A. Z., & Bercini, M. A. (2009). Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública. *Boletim da Saúde*, 23(1), 9-14.
- Portal Brasil. (2014). Instalada em 1970, usina transforma Foz do Iguaçu. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/05/instaladas-em-1970usinatransforma-foz-do-iguacu>. Acessado em 20/12/2017.
- Roehrig, J. T., Hombach, J., & Barrett, A. D. (2008). Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to Dengue viruses. *Viral Immunology*, 21, 123–132. <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0007>
- Tongthainan, D., Mongkol, N., Jiamsomboon, K., Suthisawat, S., Sanyathitiseree, P., Sunkmak, M., Wajjwalku, W., Poovorawan, Y., Iemsaard, G., Sankharak, B., Taruyanon, K., Fungfuang, W., Tulayakul, P., & Boonnak, K. (2020). Seroprevalence of Dengue, Zika and Chikungunya viruses in wild monkeys in Thailand. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3), 1228-1233. doi: 10.4269/ajtmh.20-0057.
- Vasconcelos, P.F.C. (2003). Febre Amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 275-293. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000200012>.
- Wahed, A. A. E., Patel, P., Faye, O., Thaloengsok, S., Heidenreich, D., Matangkasombut, P., Manopwisedjaroen, K., Sakuntabhai, A., Sall, A. A., Hufert, F. T., & Weidmann, M. (2015). Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of Dengue infection. *PLoS One*, 10(6), e0129682. doi: 10.1371/journal.pone.0129682.
- Weaver, S. C. (2013). Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in Microbiology*, 21(8), 360-363. doi: 10.1016/j.tim.2013.03.003.

- Weaver, S. C. (2014). Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), e2921. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002921>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2009). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328-345. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>.

5 CONCLUSÃO

A ausência de evidências moleculares de infecção por YFV, DENV1-4 e CHIKV nos PNH do estudo demonstra a inexistência tanto da circulação quanto da manutenção destes vírus nos locais e período do estudo.

Os efeitos da mudança climática e ações antropogênicas têm causado grande impacto sob o meio ambiente modificando o mesmo e podendo contribuir sobremaneira com a emergência e/ou reemergência de patógenos.

A vigilância ativa de PNH neotropicais é uma ferramenta útil para monitoramento da circulação de arboviroses em seres humanos que vivem dentro ou próximos a áreas de risco. Os PNH de vida livre servem como potenciais hospedeiros naturais e reservatórios de arboviroses e por isso a utilização da vigilância de epizootias em PNH pode contribuir tanto para a Saúde Pública quanto para a saúde animal e, conseqüentemente, para a conservação dessas espécies.

6 REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, B. M.; DURBIN, A. P.; HANLEY, K. A.; HALSTEAD, S. B.; WEAVER, S. C.; CUMMINGS, D. A. Viral kinetics of primary Dengue virus infection in non-human primates: a systematic review and individual pooled analysis. **Virology**, v. 452, n. 453, p. 237–246, 2014.
- ARAÚJO, F. A. A.; RAMOS, D. G.; SANTOS, A. L.; PASSOS, P. H. O.; ELKHOURY, A. N. S. M.; COSTA, Z. G. A.; LEAL, S. G.; ROMANO, A. P. M. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da Febre Amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 527-536, 2011.
- BARATA, R. C. B. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1997.
- BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of Yellow Fever virus. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 291–315, 2003.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of Dengue. **Nature**, v. 496, p. 504–507, 2013.
- BORGHERINI, G.; POUBEAU, P.; STAIKOWSKY, F. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1401–1407. 2007.
- BOULOS, M. Doenças emergentes e reemergentes no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 29, n.170, p. 58-60, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 01 – Situação epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020. Brasília, 2020. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/15/Boletim-epidemiologico-SVS-01.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 16 anos SVS. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019 – Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Brasília, 2019a. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico nº 41. Volume 51. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (Dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020. Brasília, 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt->

br/assuntos/media/pdf/2020/outubro/23/boletim_epidemiologico_svs_41.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da Febre Amarela. 2 ed. Brasília, 2014. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018, informe nº 27. Brasília, 2018. Disponível em:

<<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 169, de 2019 – CGARB/DEIDT/ SVS/ MS. Brasília, 2019b. Disponível em: <

<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/novembro/28/Nota-Informativa-CGARB-169-2019-Plano-de-acao-regiao-sul.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Febre Amarela: guia para profissionais de saúde. Brasília, 2017. Disponível em: <

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_saude.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.

Departamento das Doenças Transmissíveis. Informe nº 18 – 2019 –

Monitoramento de Febre Amarela Brasil – 2019. Brasília, 2019b. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde – volume único, 1ª ed. Brasília, 2016. Disponível em: <

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2005. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

BRIGHTON, S. W.; PROZESKY, O. W.; DE LA HARPE, A. L. Chikungunya virus infection: a retrospective study of 107 cases. **South African Medical Journal**, v. 63, p. 313–315, 1983

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of Yellow Fever virus into the Americas. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

CAGLIOTI, C.; LALLE, E.; CASTILLETI, C.; CARLETTI, F.; CAPOBIANCHI, M. R.; BORDI, L. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**, v. 36, p. 211–227, 2013.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: Monath, T. P. ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, vol. I. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 19–57, 1998.

CARDOSA, J.; OOI, M. H.; TIO, P. H.; PERERA, D.; HOLMES, E. C.; BIBI, K.; ABDUL M. Z. Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with Dengue hemorrhagic fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 3, n. 4, e423, 2009.

CAREY, D. E.; CAUSEY, O. R.; REDDY, S.; COOKE, A. R. Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964–68. **Lancet**, v. 1, n. 7690, p. 105–106, 1971.

CAREY, D. E.; MYERS, R. M.; DERANITZ, C. M.; JADHAV, M.; REUBEN, R. The 1964 Chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent Dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 434–445, 1969.

CATENACCI, L. S.; FERREIRA, M.; MARTINS, L. C.; DE VLEESCHOUWER, K. M.; CASSANO, C. R.; OLIVEIRA, L. C.; CANALE, G.; DEEM, S. L.; TELLO, J. S.; PARKER, P.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Surveillance of arboviruses in primates and sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **Ecohealth**, v. 15, n. 4, p. 777–791, 2018.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. First Reports of Chikungunya in Western hemisphere. Press Release. Georgia, 2007. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2013/p1218-Chikungunyas.html>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

CHEN, C.-I.; CLARK, D. C.; PESAVENTO, P.; LERCHE, N. W.; LUCIW, P. A.; REISEN, W. K.; BRAULT, A. C. Comparative Pathogenesis of Epidemic and Enzootic Chikungunya Viruses in a Pregnant Rhesus Macaque Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1249–1258, 2010.

CHEVILLON, C.; BRIANT, L.; RENAUD, F.; DEVAUX, C. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends Microbiology**, v.16, p. 80–88, 2008.

COSTA, R. S.; SCHEER, M. A. P. S. Tríplice fronteira (AR/BR/PY): estudo da variabilidade climática, período de 1990 a 2013. XV Encontro de Geógrafos da América Latina – Havana-Cuba, 2015. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal15/Procesosambientales/Climatologia/03.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

CUNHA, M. S.; DA COSTA, A. C.; DE AZEVEDO FERNANDES, N. C. C.; GUERRA, J. M.; DOS SANTOS, F. C. P.; NOGUEIRA, J.S.; et al. Epizootics due to Yellow Fever virus in São Paulo state, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–13, 2019.

DA SILVA, N. M.; TEIXEIRA, R. A. G.; CARDOSO, C. G.; SIQUEIRA JUNIOR, J. B.; COELHO, G. E.; DE OLIVEIRA, E. S. F. Vigilância da Chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. *Epidemiologia e Serviços da Saúde*, v. 27. n. 3, p., 2018.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443–449, 2000.

DE SILVA, A. M.; DITTUS, W. P.; AMERASINGHE, P. H.; AMERASINGHE, F. P. Serologic evidence for an epizootic Dengue virus infecting toque macaque (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 300–306, 1999.

DEFILIPPIS, V.R.; VILLAREAL, L.P. Virus evolution. In: Knipe, D.M., & Howley, P.M. (eds) **Fields Virology**. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, p. 353-370, 2001.

DIALLO, M.; THONNON, J.; TRAORE-LAMIZANA, M.; FONTENILLE, D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281–286, 1999.

DIGOUTTE, J. P.; CORNET, M.; DEUBEL, V.; DOWNS, W. G. Yellow fever. In: PORTERFIELD, J. S. (ed). **Exotic viral infections (Kass handbook of infectious diseases)**. London: Chapman & Hall Medical, p. 67–102, 1995.

DOMINGO, C.; PATEL, P.; YILLAH, J.; WEIDMANN, M.; MÉNDEZ, J. A.; NAKOUNÉ, E. R.; NIEDRIG, M. Advanced Yellow Fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4054-4060, 2012.

ENDY, T. P.; WEAVER, S. C.; HANLEY, K. A. Dengue virus - past, present and future. In: HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. (ed). **Frontiers in Dengue Virus Research**. Norwich, U.K.: Horizon Press, p. 3–9, 2010.

ENGELMANN, F.; JOSSET, L.; GIRKE, T.; PARK, B.; BARRON, A.; DEWANE, J.; HAMMARLUND, E.; LEWIS, A.; AXTHELM, M. K.; SLIFKA, M. K.; MESSAOUDI, I. Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic Yellow Fever in a rhesus macaque model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, e3295, 2014.

FAUCI, A. S. Emerging and Reemerging Infectious Diseases: The Perpetual Challenge. **Academic Medicine**, v. 80, n. 12, p 1079-1085, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatic maintenance cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 259, p. 1-6, 2019.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014

FISCHER, M.; STAPLES, J.E. Notes from the field: Chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, p. 500-501, 2014.

GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; DE LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K. I.; DZHIVANIAN, T. I.; GOULD, E. A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1867–1876, 2001.

GÓIS, F. R. **Investigação de arbovírus (gênero Flavivírus) de interesse à saúde pública em mosquitos (Aedes aegypti e Aedes albopictus) em Foz do Iguaçu, Paraná**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N. The Arboviruses: Quo Vadis?. *In*: VASILAKIS, N.; GUBLER, D.J. **Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control**. UK: Caister Academic Press, p.1-6, 2016.

HANLEY, K. A.; MONATH, T. P.; WEAVER, S. C.; ROSSI, S. L.; RICHMAN, R. L.; VASILAKIS, N. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of Dengue virus and Yellow Fever virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 292–311, 2013.

HAYES, C. G.; PHILLIPS, I. A.; CALLAHAN, J. D.; GRIEBENOW, W. F.; HYAMS, K. C.; WU, S. J.; WATTS, D. M. The epidemiology of Dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 4, p. 459–463, 1996.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, p. 289-295, 2012.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. *In*: Marquardt, M. C. **Biology of Disease Vectors**. Elsevier Academic Press: New York, NY, USA, p. 167-185, 2005.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of Dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2003.

HUGHES, H. R.; ADKINS, S.; ALKHOVSKIY, S.; BEER, M.; BLAIR, C.; CALISHER, C. H.; DREBOT, M.; LAMBERT, A. J.; SOUZA, W. M.; MARKLEWITZ, M.; NUNES, M. R. T.; SHÍ, X.; ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Peribunyaviridae. **Journal of General Virology**, v. 101, n. 1, p. 1-2, 2020.

INOUE, S.; MORITA, K.; MATIAS, R. R.; TUPLANO, J. V.; RESUELLO, R. R.; CANDELARIO, J. R.; CRUZ, D. J.; MAPUA, C. A.; HASEBE, F.; IGARASHI, A.; NATIVIDAD, F. F. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, n. 2, p. 89-94, 2003.

INSTITUTE, I. L. R. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. Zoonoses Project 4. Report to Department for International Development, UK. Nairobi, Kenya. International Livestock Research Institute, 2012.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008.

JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; MAY-JUNIOR, A. J.; MORATO R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 686-710, 2010.

JUPP, P. G.; MCINTOSH, B. M. Chikungunya virus disease. *In*: MONATH, T. P. **The Arbovirus: Epidemiology and Ecology**, vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 137–157, 1988.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. Santo Antonio, TX: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, p.1147, 1985.

KINDLOVITS, L. M.; KINDLOVITS, A. **Febre amarela: clínica e terapêutica em primatas tropicais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, p. 190-191, 2009.

KUNO, G.; GWONG-JEN, J.; TSUCHIYA, C. K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, B. Phylogeny of the genus flavivirus. **Journal Virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

LEANDRO, A. S.; BRITTO, A. S.; RIOS, J. A.; GALVÃO, S. R.; KAFKA, R.; et al. Molecular detection of Dengue Virus in mosquitoes as an early indicator to aid in the prevention of human infection in endemic areas. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 1, p. 54-59, 2019.

LINDENBACH, B. D.; MURRAY, C. L.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M., editors. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2013.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1101-1152.

LLOYD-SMITH, J. O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R. C.; DOBSON, A. P.; HUDSON, P. J.; GRENFELL. Epidemic dynamics at the human-animal interface. **Science**, v. 326, n. 5958, p. 1362-1367, 2009.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for Chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, e0005698, 2017.

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 229-243, 2002.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 01, p. 91-8, 2016.

MAY, R. M.; GUPTA, S. Infectious disease dynamics: What characterizes a successful invader?" **Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences**, v. 356, n. 1410, p. 901-10, 2001.

MAYER, S. V., TESH, R. B., & VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on Dengue, Chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, 2017.

MAZAUD, R.; SALAUN, J. J.; MONTABONE, H.; GOUBE, P.; BAZILLIO, R. Acute neurologic and sensorial disorders in Dengue and Chikungunya fever. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales**, v. 64, p. 22–30, 1971.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. M.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; SIMOONS, C. P.; HAY, S. I. Global spread of Dengue virus types: mapping the 70-year history. **Cell Reviews**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.

MILLER, R. E. Quarentine protocols and preventive medicine procedures for reptiles, birds and mammals in zoos. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 15, n. 1, p. 183-189, 1996.

MIR, D.; DELATORRE, E.; BONALDO, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VICENTE, A. C.; BELLO, G. Phylodynamics of Yellow Fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–9, 2017.

MONATH, T. P. Epidemiology of Yellow Fever: current status and speculations on future trends. In: SALUZZO, J. F.; DODET, B (ed). **Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases**. Paris: Elsevier, p. 143-156, 1997.

MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 11-20, 2001.

MONATH, T. P. Yellow fever. In: MONATH, T. P. (ed). **Arboviruses: ecology and epidemiology, Volume V**. Boca Raton: CRC Press, p.139- 241, 1988.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–73, 2015.

MONATH, T.P.; HEINZ, F.X. **Flaviviruses**. Lippincott & Raven CRC Press, 1996.

MOREIRA-SOTO, A.; CARNEIRO, I. D. O.; FISCHER, C.; FELDMANN, M.; KÜMMERER, B. M.; SILVA, N. S.; SANTOS, U. G.; SOUZA, B. F. D. C. D.; LIBORIO, F. D. A.; VALENÇA- MONTENEGRO, M. M.; LAROQUE, P. D. O.; DA FONTOURA, F. R.; OLIVEIRA, A. V. D.; DROSTEN, C.; DE LAMBALLERIE, X.; FRANKE, C. R.; DREXLER, J. F. Limited evidence for infection of urban and peri-urban nonhuman primates with Zika and Chikungunya viruses in Brazil. **mSphere Journal**, v. 3, n. 1, e00523-17, 2018.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, p. 1-7, 2013.

MORENO, E.S.; SPINOLA, R.; TENGAN, C. H.; BRASIL, R. A.; SICILIANO, M. M.; COIMBRA, T. L.; SILVEIRA, V. R.; ROCCO, I. M.; BISORDI, I.; SOUZA, R. P.; PETRELLA, S.; PEREIRA, L. E.; MAEDA, A. Y.; SILVA, F.G.; SUZUKI, A. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 45-50, 2013.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 1, n. 1, p. 7-15, 1995.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of Dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in Dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, p. 67-70, 2014.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B.; PEREIRA, M. A. S.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925–926, 2001.

NORMILE, D. Surprising new Dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, p. 415, 2013.

NUNES, M. R.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M. GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; OLIVEIRA, L. F. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 102, p.1-10, 2015.

PAHO. Pan American Health Organization. Chikungunya outbreaks. Washington, 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PARANÁ. Boletim epidemiológico Febre Amarela nº 13 13/05/2020. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Superintendência de Vigilância em Saúde. Curitiba, 2020a. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-06/boletim_fa_13052020.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PARANÁ. Situação da Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Paraná 2019/2020. Informe Técnico 43 – Semana Epidemiológica 31/2019 a 28/2020 (28/07/2019 a 11/07/2020). Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – Superintendência de Vigilância em Saúde. Curitiba, 2020b. Disponível em: <http://www.Dengue.pr.gov.br/sites/Dengue/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/boletimDengue43_2020.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PATEL, P.; ABD EL WAHED, A.; FAYE, O.; PRÜGER, P.; KAISER, M.; THALOENG SOK, S.; UBOL, S.; SAKUNTABHAI, A.; LEPARC-GOFFART, I.; HUFERT, F. T.; SALL, A. A.; WEIDMANN, M.; NIEDRIG, M. A Field Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 9, e0004953, 2016.

PAZ, F. A. Z.; BERCINI, M. A. Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública. **Boletim Saúde**, v 23, n 1, p 9-13. 2009.
PORTAL BRASIL. Instalada em 1970, usina transforma Foz do Iguaçu, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/05/instaladas-em-1970usinatransforma-foz-do-iguacu>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

PUERTA-GUARDO, H.; MOSSO, C.; MEDINA, F.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.; DEL-ANGEL, R. Antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. **Journal General Virology**, v. 91, p. 394-403, 2010.

PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 540-550, 2009.

REGIS, L. N.; ACIOLI, R. V.; SILVEIRA JR., J. C.; et al. Sustained reduction of the Dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, e67682, 2013.

ROBERTSON, S. E. The immunological basis for immunization series: Yellow fever. World Health Organization (Document WHO/EPI/ GEN/93.18), Geneva, 1993.

ROBINSONM, C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-1953. I. Clinical features. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 49, p. 28-32, 1955.

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

ROTHMAN, A. L. Immunity to Dengue virus: a tale of original antigenic sin and cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p.130-151, 2012.

SAAD, L. C.; BARATA, R. B. Surtos de Febre Amarela no estado de São Paulo, 2000-1020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 3, p. 531-540, 2016.

SCHILTE, C.; COUDERC, T.; CHRETIEN, F. et al. Type I IFN controls Chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 429-442, 2010.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. A timeline for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. Pan American Health Organization, Division of Disease Prevention and Control, 2001.

SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. M. T.; COELHO, G. E.; DA ROCHA SIMPLICIO, A. C.; HATCH, D. L. Dengue and Dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SOPER, F. L. Ventures in world health. Report number 355. Pan American Health Organization PAHO scientific publication. Washington (D.C.): Pan American Health Organization, 1977.

SOUZA, R. P. **Filogeografia da Febre Amarela na América do Sul**. 2013. 136f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

STRODE, G.K. Yellow fever. New York: McGraw-Hill, 1951.

SVOBODA, W. K. **Vigilância de epizootia em primatas não humanos como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de Interesse em Saúde Pública**. 2007. 135f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

TAYLOR, R. M. Epidemiology. In: STRODE, G. K. (ed). **Yellow fever**. New York: McGraw Hill, p. 427-459, 1951.

THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro vírus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 9, p. 1326-1329, 2003.

TONGTHAINAN, D.; MONGKOL, N.; JIAMSOMBOON, K.; SUTHISAWAT, S.; SANYATHITISEREE, P.; SUNKMAK, M.; WAJJWALKU, W.; POOVORAWAN, Y.; IEMSAARD, G.; SANKHARAK, B.; TARUYANON, K.; FUNGFUANG, W.; TULAYAKUL, P.; BOONNAK, K. Seroprevalence of Dengue, Zika and Chikungunya viruses in wild monkeys in Thailand. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 1228-1233, 2020.

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and Chikungunya virus emergence. **Current Opinion Virology**, v. 16, p. 143–150, 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. **Febre amarela**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2000.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v 44, n 6, p 1144-1149, 2010.

VASILAKIS, N.; HOLMES, E. C.; FOKAM, E. B. et al. Evolutionary processes among sylvatic Dengue type 2 viruses. **Journal of Virology**, v. 81, p. 9591–9595, 2007.

VOLK, S. M.; CHEN, R.; TSETSARKIN, K. A. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, p. 6497–6504, 2010.

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to Dengue virus infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, 2011.

WAHED, A. A. E.; PATEL, P.; FAYE, O.; THALOENGSOOK, S.; HEIDENREICH, D.; MATANGKASOMBUT, P.; MANOPWISEDJAROEN, K.; SAKUNTABHAI, A.; SALL, A. A.; HUFERT, F. T.; WEIDMANN, M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of Dengue infection. **PLoS One**, v. 10, n. 6, e0129682, 2015.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARETT, A. D. T.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 7, p. 3227– 3234, 2000.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, e2921, 2014.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 285-314, 2006.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2009.

WEAVER, S.C. Vector biology in viral pathogenesis. In: NATHANSON, N. **Viral Pathogenesis**. New York: Lippincott-Raven, p. 329–352, 1997.

WHO. World Health Organization. Pan American Health Organization. Epidemiological Update Dengue in the context of COVID-19. 3 December 2020, Washington, D.C. Washington, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53174/EpiUpdate3December2020_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. n. 30. v. 91. p. 349-364. Washington, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization. WHO report of outbreaks of Chikungunya 2005, 2006, 2007. Washington, 2007. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Chikungunya>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WHO. World Health Organization/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 147. Washington, 2009. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>>. Acesso em: 10 de abr. de 2021.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KILBOURN, A.; SPIELMAN, A.; LAL, A. A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 4, p. 149-158, 1998.

APENDICE A – PROTOCOLO EXTRAÇÃO RNA 1

MagaZorb® Total RNA Mini-Prep Kit (Promega, EUA)

1. Adicionar em tubo de eppenforf 20 µL de solução de PK (Proteinase K Solution);
2. Adicionar 200 µL de amostra bem misturada no tudo sobre o topo da solução PK;
3. Adicionar 200 µL de tampão de Lise (Lysis Buffer);
4. Passar no vórtex por 15 segundos;
5. Incubar em bloco de aquecimento a 56°C durante 10 minutos;
6. Remover o tubo do bloco de aquecimento com um papel toalha ou luvas próprias para evitar queimaduras;
7. Adicionar 500 µL do tampão de ligação (Binding Buffer);
8. Passar no vórtex por 15 segundos + spin centrífuga;
9. Adicionar 20 µL de reagente MagaZorb® (MagaZorb® Reagent);
10. Passar no vórtex por 15 segundos + spin centrífuga;
11. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos enquanto se mistura, realizar mistura manual a cada 2 minutos;
12. Deixar descansar na estante magnética por 60-90 segundos;
13. Retirar o sobrenadante, o tubo deve ser pressionado firmemente contra o ímã, para evitar a retirada de partícula;
14. Adicionar 1ml/ 1000 µL de tampão de lavagem (Wash Buffer);
15. Misturar bem com a inversão por 2 minutos + spin na centrífuga;
16. Deixar descansar na estante magnética por 60-90 segundos;
17. Retirar o sobrenadante, o tubo deve ser pressionado firmemente contra o ímã, para evitar a retirada de partícula;
18. Repetir a solução de lavagem;
19. Adicionar 50-100 µL, ou a quantidade desejada da água RNase-livre (Elution Buffer/ RNase-Free Water) no tubo, misture suavemente invertendo e girando;
20. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos enquanto se mistura, realizar a mistura manual a cada 2 minutos;
21. Deixar descansar na estante magnética por 60-90 segundos;
22. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um tubo limpo. Evite colecionar partículas durante a transferência. O sobrenadante transferido contém o RNA purificado. O material está pronto para uma análise mais aprofundada. Se o RNA isolado não estiver indo para ser testado no mesmo dia, deve ser congelado a -70°C até o momento da análise.

APENDICE B – PROTOCOLO EXTRAÇÃO RNA 2

MagMax™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, EUA)

1. Adicionar em tubo de eppendorf 1,5ml, 10 µL de solução de PK (Proteinase K Solution);
2. Adicionar 400 µL da amostra ou controle negativo;
3. Adicionar 550 µL do mix de binding bead;
4. Adicionar 10 µL de MS2 se a amostra for analisada com o kit TagPath da Thermo Fischer
5. Passar no vórtex por 2 minutos;
6. Incubar em bloco de aquecimento a 65°C durante 5 minutos;
7. Remover o tubo do bloco de aquecimento com papel toalha ou luvas próprias para evitar queimaduras;
8. Agitar no vórtex por 1 minuto, centrifugar brevemente as amostras e dispor as amostras na estante eletromagnética por 5 minutos ou até total fixação das beads na parede;
9. Retirar o sobrenadante e adicionar 1000 µL de Wash Buffer;
10. Agitar por 1 minuto no vórtex + spin centrífuga;
11. Deixar descansar na estante magnética por 2 minutos;
12. Retirar o sobrenadante e adicionar 1000 µL de etanol 80%;
13. Agitar por 1 minuto no vórtex + spin centrífuga;
14. Deixar descansar na estante magnética por 2 minutos;
15. Retirar o sobrenadante e adicionar 500 µL de etanol 80%;
16. Agitar por 1 minuto no vórtex + spin centrífuga;
17. Deixar descansar na estante magnética por 2 minutos;
18. Retirar o sobrenadante, o tubo deve ser pressionado firmemente contra o ímã, para evitar a retirada de partícula de beads, retirar todo o excesso de etanol;
19. Adicionar 50-100 µL ou a quantidade desejada de Elution solution no tubo;
20. Agitar no vórtex por 1 minuto;
21. Incubar à temperatura de 65°C durante 10 minutos;
22. Remover o tubo do bloco de aquecimento com um papel toalha ou luvas próprias para evitar queimaduras;
23. Agitar no vórtex por 1 minuto, centrifugar brevemente as amostras e dispor as amostras na estante eletromagnética por 2 minutos ou até total fixação das beads na parede;
24. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um microtubo de 0,2ml limpo. Evite colecionar partículas durante a transferência. O sobrenadante transferido contém o RNA purificado. O material está pronto para uma análise mais aprofundada. Se o RNA isolado não estiver indo para ser testado no mesmo dia, deve ser congelado a -80°C até o momento da análise.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Comissão de Ética no Uso de Animais



Certificado

Certificamos que o **Protocolo nº 16/2019** referente ao projeto de pesquisa **Avaliação da presença de arbovirose de interesse em saúde pública em mamíferos silvestres de vida livre no município de Foz do Iguaçu - PR** sob responsabilidade da **Profa. Silvia Cristina Osaki**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em **29/05/2019**.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:

- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 29 de maio de 2019

Certificate

*Certify that the **Protocol n. 16/2019** regarding the research project **Evaluation of arboviruses of public health interest in wild mammals in the municipality of Foz do Iguaçu - PR** of **Silvia Cristina Osaki** is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the National Council for Animal Experiments Control (CONCEA) and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in **May 29, 2019**.*

Palotina, May 29, 2019.

Prof. Geraldo Camilo Alberton
Coordenador/Coordinator
CEUA/Palotina - UFPR

ANEXO B – SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69136-2	Data da Emissão: 30/07/2020 13:15:47	Data da Revalidação*: 01/05/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sílvia Cristina Osaki	CPF: 979.536.109-06
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ARBOVIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS E MAMÍFEROS SILVESTRES DE VIDA LIVRE NO ESTADO DO PARANÁ	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura para coleta de amostras biológicas de animais silvestres	07/2019	06/2021
2	Processamento das amostras obtidas dos animais silvestres	08/2019	06/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Stacy Wu	Médica Veterinária	010.824.059-22	Brasileira
2	Walfrido Kúhl Svoboda	Médico Veterinário	826.531.869-34	Brasileira
3	ROBSON MICHAEL DELAI	Biólogo	022.881.319-00	Brasileira
4	Lucas de Moraes Aguiar	Biólogo	029.623.189-40	Brasileira
5	Eliane Maria Pozzolo	Colaboradora	532.285.969-15	Brasileira
6	Márcio Roberto Teixeira Nunes	Colaborador	558.405.232-91	Brasileira
7	ANDRÉ DE SOUZA LEANDRO	Colaborador	030.182.047-35	Brasileira
8	Marcos José de Oliveira	Colaborador	703.698.879-72	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0691360220200730

Página 1/6

ANEXO C – INSTRUÇÃO AOS AUTORES

PREPARAÇÃO PARA SUBMISSÃO

Os manuscritos devem ser submetidos em formato Word ou arquivo rtf e deve ser escrito na língua inglesa. O manuscrito deve ser submetido em arquivos separados: arquivo com texto principal; figuras.

Arquivo do texto

O arquivo de texto deve ser apresentado na seguinte ordem:

(i) Título; (ii) título curto com até 40 caracteres; (iii) nome completo dos autores; (iv) afiliação institucional do autor em que o trabalho foi realizado (nota de rodapé para o endereço atual do autor se for diferente do local onde o trabalho foi realizado); (v) agradecimentos; (vi) resumo e palavras-chave, (vii) impactos, (viii) texto principal, (ix) declaração de conflito de interesses, (x) referências, (xi) tabelas (cada tabela completa com título e notas de rodapé) (xii) legendas das figuras, (xiii) apêndices (se relevante). Figuras e informações de apoio devem ser fornecidas em arquivos separados.

Título

A página de título deve conter:

(i) título informativo curto que contém as palavras-chave principais. O título não deve ter abreviações (consulte as dicas SEO recomendadas pela Wiley).

Autoria

Consulte a política de autoria da revista na seção Políticas editoriais e considerações éticas para obter detalhes sobre a elegibilidade para a lista de autores.

Agradecimentos

As contribuições de qualquer pessoa que não atenda aos critérios de autoria devem ser listadas, com a permissão do colaborador nesta seção de Agradecimentos. Veja a seção sobre Autoria para mais detalhes. Apoio financeiro e de materiais/ insumos também devem ser mencionado. Agradecimento a revisores anônimos não é recomendado.

Declaração de conflito de interesse

Você será solicitado a fornecer uma declaração de conflito de interesses durante o processo de envio. Consulte a seção 'Conflito de interesses' na seção de Políticas editoriais e considerações éticas para obter detalhes sobre o que incluir nesta seção. Certifique-se de entrar em contato com todos os co-autores para confirmar a concordância com a declaração final. A declaração de conflito de interesses deve ser incluída junto a submissão do arquivo do texto principal.

Resumo

Forneça um resumo de no máximo 300 palavras.

Palavras-chave

Forneça de 3 a 6 palavras-chave e liste-as em ordem alfabética. As palavras-chave devem ser preferencialmente daquelas recomendadas pela lista de navegadores da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA (MeSH) em <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

Impactos

Incluir três pontos-chave, de no máximo 100 palavras, explicando a importância das descobertas do artigo para o público não especializado. Esses pontos serão publicados no início do artigo em uma caixa intitulada 'Impactos'.

Texto principal

Sempre que possível, o texto deve ser dividido nas seguintes seções: Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Declaração de Conflito de Interesses e Referências.

Referências

As referências devem ser formatadas de acordo com o Manual de Publicação da Associação Americana de Psicologia (6ª edição). Isso significa que as citações no texto devem seguir no formato autor-data, em que o sobrenome do autor e o ano de publicação da fonte devem aparecer no texto, por exemplo: (Jones, 1998). A lista de referências completa deve aparecer em ordem alfabética no final do artigo.

Abaixo segue alguns modelos de exemplos de referências. O DOI deve ser fornecido para todas as referências, quando disponíveis. Para obter mais informações sobre o estilo de referência da APA, consulte o FAQ da APA. Observe que, para artigos de periódicos, os números das edições não são incluídos, a menos que cada edição do volume comece com a página um.

Artigo em jornais

Beers, S. R., & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:[10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Livro

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Documento da internet

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

Tabelas

As tabelas devem ser auto explicativas e complementar, mas não duplicar, as informações contidas no texto. Eles devem ser fornecidos como arquivos editáveis, não colados como imagens. As legendas devem ser concisas, mas abrangentes - a tabela, a legenda e as notas de rodapé devem ser compreensíveis sem referência ao texto. O significado das abreviações deve estar no rodapé. Símbolos de rodapé: †, ‡, §, ¶, devem ser usados nessa ordem e *, **, *** devem ser reservados para os valores de P. Medidas estatísticas como desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM) deve ser identificado nos cabeçalhos.

Legenda da imagem

As legendas devem ser concisas, mas abrangentes - a imagem e legenda devem ser compreensíveis sem referência ao texto. Incluir definições de quaisquer símbolos usados e definir/ explicar as abreviações e unidades de medida.

Preparação das imagens

Embora recomendemos que os autores nos enviem imagens de alta qualidade quando possível, para fins de revisão por pares, aceitamos uma ampla variedade de formatos, tamanhos e resoluções.

[Clique aqui](#) para obter os requisitos básicos de imagens submetidas com manuscrito para avaliação inicial dos revisores, bem como os requisitos de figuras pós-aceitação mais detalhados.

Imagens coloridas: As imagens coloridas podem ser publicadas online gratuitamente; no entanto, o jornal cobra pela publicação da impressão de imagens coloridas. Após o envio de imagens coloridas na publicação Early View, você será convidado a preencher um acordo de cobrança da impressão colorida no RightsLink dos serviços autorais. Você terá a opção de pagar imediatamente com cartão de crédito ou débito ou pode solicitar uma fatura. Se você optar por não adquirir a impressão em cores, as imagens serão convertidas em preto e branco para a edição impressa da revista.

Diretrizes para submissão de sugestões para capa da revista

Se você deseja enviar sugestões de ilustrações relacionadas ao seu manuscrito para serem consideradas na capa da revista, siga estas [orientações gerais](#).

Apêndice

Os apêndices serão publicados após as referências. Para submissão, eles devem ser fornecidos em arquivos separados, mas mencionados no texto.

Informações de Apoio

Informações de apoio são informações que não são essenciais para o artigo, mas que fornece maior contextualização. Ele é online e aparece sem edição ou composição. Pode incluir tabelas, figuras, vídeos, conjuntos de dados etc. [Clique aqui](#) para ver as perguntas frequentes de Wiley sobre informações de apoio.

Pontos de estilo geral

Os links a seguir fornecem conselhos gerais sobre formatação e estilo.

- **Abreviações:** Em geral, os termos não devem ser abreviados, a menos que sejam usados repetidamente e a abreviatura seja útil para o leitor. Use inicialmente a palavra por extenso, seguida da abreviatura entre parênteses. Depois disso, use apenas a abreviatura.

- **Unidades de medida:** As medidas devem ser fornecidas em unidades Sistema Internacional (SI) ou derivadas de SI. Visite o site da Organização Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) em <http://www.bipm.fr> para obter mais informações sobre as unidades SI.

Nomes comerciais: As substâncias químicas devem ser referidas apenas pelo nome genérico. Nomes comerciais não devem ser usados. Os medicamentos devem ser referidos por seus nomes genéricos. Se medicamentos patenteados que forem usados no estudo, referencie-os pelo nome genérico, mencionando o nome comercial e o nome e localização do fabricante, entre parênteses.