



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

WALFRIDO KÜHL SVOBODA

VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH)
COMO INSTRUMENTO DE MONITORAMENTO DE ARBOVIROSES E
OUTRAS VIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA.

Londrina
2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

WALFRIDO KÜHL SVOBODA

VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH)
COMO INSTRUMENTO DE MONITORAMENTO DE ARBOVIROSES E
OUTRAS VIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro.

Londrina
2007

WALFRIDO KÜHL SVOBODA

VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH) COMO INSTRUMENTO DE MONITORAMENTO DE ARBOVIROSES E OUTRAS VIROSES DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 04 de junho de 2007.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Ciências Patológicas do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina e nos Laboratórios de Sorologia e de Isolamento Viral da Seção de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA) como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 3. SETI-PR: Secretaria de Estado de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná**
- 4. SESA-PR: Secretaria Estadual de Saúde do Paraná**

DEDICATÓRIA

Grande foi o esforço e dedicação para desenvolver este trabalho...

Mas toda honra e toda glória pertencem a tí ó SENHOR!

*Dedico este trabalho a DEUS pelo seu amor incondicional,
bondade e misericórdia infinitas...*

GRANDES HOMENAGENS

A minha Família,

A minha amada, amiga, companheira e esposa Carlá, pela cumplicidade, paciência, dedicação e afeto durante todo o caminhar...

Aos meus filhos queridos, herança do Senhor, Alejandro, Guilherme e Beatriz por todas as alegrias compartilhadas que renovavam as minhas forças e o meu viver...

Muitíssimo obrigado pelo amor, carinho e esperança sempre presentes em nosso conviver diário.

Aos meus Pais,

*Ao meu pai Wenceslau e
À minha mãe Noêmia,*

A Vocês, que por vontade de Deus, colocaram-me no mundo, ensinaram-me os bons caminhos e desejaram-me as melhores coisas que este mundo pode oferecer...

A Vocês que me ensinaram reconhecer que aquele que é sábio é o mais rico, e aquele que é humilde, mais se assemelha a Deus...

Meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

Aos muito próximos da Família,

A nossa "quase irmã" Neura e a nossa "quase sobrinha" Ana Cláudia (Tata) por toda dedicação, paciência e afeto dados a minha família e especialmente aos meus filhos durante toda a nossa convivência...

A nossa Secretária do Lar Dona Neidé e a sua estimada filha Débora (Debra) pela dedicação e amizade...

Muito obrigado.

HOMENAGEM ESPECIAL

*Ao meu Orientador de Tese e "quase" pai
Prof. Dr. Itámar Teodorico Navarro,*

Muitíssimo obrigado,

*Pelas sábias palavras de incentivo, apoio e
orientação...*

*Pelo zelo, dedicação, preocupação e apreço
despendidos durante todo o meu viver em Londrina...*

Que Deus lhe retribua com toda sorte de benções...

Ao início da obra,

“Não se assuste com o tamanho da obra, seja forte e corajoso, mãos ao trabalho! Não tenha medo, nem desânimo, pois Deus, o Senhor, o meu Deus está com você. Ele não o deixará nem o abandonará até que se termine toda obra.”

I Crônicas 28:20

Aos estudos de campo

"Perdemos ou ganhamos no campo."

Fred L. Soper (1963)

“Com relação a muitíssimas doenças comunicáveis e a bom número de outras desordens, um largo fosso separa o estabelecimento de princípios básicos para o controle e a efetiva aplicação de medidas eficazes de controle. Trata-se de um tipo de fosso que não é possível transpor pela extensão dos estudos experimentais. Só pode ser transposto por meio de estudos de campo bastante intensivos.”

W. H. Frost (1929)

Aos Animais,

*Hã quem diga que o poder pode ser conquistado...
Hã quem diga que o poder é inerente ao próprio ser...
Mas para os animais o poder nada mais é do que o simples ato de sobreviver...
A estes Seres que na sua simplicidade de viver conquistam seu próprio mundo e, especialmente, àqueles que ficaram no julgo dos homens...*

Todo meu Respeito e Dedicação.

Walfrido K. Svoboda - 1998

Aos momentos difíceis,

“Não fui Eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desânimo, pois o Senhor teu Deus, estará com você, por onde você andar.”

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos de:

- estar vivo até o presente momento;
- ter uma família maravilhosa;
- conhecer pessoas maravilhosas em lugares maravilhosos;
- enriquecer minha vida pessoal e espiritual;
- poder contemplar a conclusão de mais uma etapa de minha vida profissional...

À maravilhosa Família que Deus me deu, em especial a minha querida e amada esposa Carla e aos meus queridos e amados filhos Alejandro, Guilherme e Beatriz por todas as alegrias compartilhadas que me fizeram prosseguir...

Aos meus queridos e amados pais Wenceslau e Noêmia e as minhas queridas e amadas irmãs Noeli e Rosimeri pela dedicação, apoio e carinho despendidos durante todo o meu evoluir...

Ao meu estimado primo Diógenes e família por todos os momentos em família que tivemos em Londrina e principalmente pela maravilhosa acolhida que me foi proporcionada no término deste trabalho. Que Deus possa retribuir a ti e a toda sua família com toda sorte de bênçãos. Muito obrigado por tudo...

Ao orientador, amigo e companheiro de jornada Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro pela valiosa oportunidade e por toda dedicação e esforço conjunto para realizar um sonho “quase” inatingível, porém alcançado com muita paciência e esmero. Meu sincero e profundo agradecimento pela confiança em mim depositada e sábias palavras de incentivo que foram muito importantes nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À Prof^a Dr^a Roberta Lemos Freire pela amizade, orientação, confiança, conselhos, palavras de encorajamento e alegrias compartilhadas durante toda a jornada. Além das “trocas de figurinhas” profissionais, realmente muito edificantes.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri pela participação da comissão examinadora do exame de qualificação e pelo ótimo trabalho desenvolvido na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Departamento de Medicina Veterinária.

À Prof^a Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabe e Prof. Dr. Mário Augusto Ono pela participação da comissão examinadora do exame de qualificação e por aceitarem o desafio, viabilizando a realização dos exames laboratoriais para a doença por Borna vírus e Paracoccidiodomicose, respectivamente, além da amizade, consideração e apoio profissional.

Aos professores da UEL envolvidos nos vários subprojetos derivados deste trabalho: Carmen Lúcia Scortecchi Hilst (sedação dos animais), Dr. João Luis Garcia (toxoplasmose), Dr^a Mara Regina Stipp Balarin e Dr. Júlio Lisboa (perfil hematológico e bioquímico do sangue), Dr. Júlio César de Freitas (leptospirose e clamidiose), Dr^a Ana Paula F.R. Bracarense (anatomia patológica), Dr. Milton Hissashi Yamamura (perfil parasitário), Dr. Mário Augusto Ono (paracoccidiodomicose), Dr^a Maria Angélica Ehara Watanabi (doença por Borna vírus), sem os quais o trabalho ficaria extremamente reduzido em termos de investigação.

Ao acadêmico do Curso de Biomedicina Mateus Nóbrega Aoki pela dedicação, apoio e realização dos exames laboratoriais da doença por Borna vírus.

Aos amigos e mentores deste trabalho Dr^a Ângela Maron e Prof. Dr. Lineu Roberto da Silva pela amizade, confiança, incentivo e profissionalismo vivenciado desde antes o início desta jornada...

Ao professor, médico sanitário e médico veterinário Dr. Natal Jataí de Camargo (diretor do CSA/SESA-PR) pela amizade, apoio, confiança e disposição em “vender a idéia” junto a SESA-PR para que este trabalho pudesse ter apoio financeiro e operacional, indispensáveis para o início e execução do mesmo.

A Sra. Tânia Margarete Piassa da antiga FUNASA (Regional de Curitiba-PR) por todo empenho e dedicação dados no início dos trabalhos a campo, sem sua preciosa contribuição o trabalho não teria sido iniciado...

A todos os técnicos de entomologia da SESA-PR (Porto Rico-PR), em especial aos Senhores Edilson C. Colhera (Colhera), Gonçalves Beletato (Beletato), José L. Filho (Moita), José P. dos Santos (Pelé) e Valdir O. da Silva (Miro/Ortiz), Adilson Braz Secorun (Queixa). MUITÍSSIMO obrigado por todo apoio técnico e operacional a campo, além da amizade e companheirismo que ultrapassaram as dimensões deste mero trabalho. Sem VOCÊS este trabalho não teria acontecido de forma tão eficiente e harmoniosa. E, também, aos vigias James e Makson por toda ajuda prestada. Realmente VOCÊS formam um time de excelência!

A todos os técnicos da Central de UBV da SESA-PR, em especial ao amigo, grande incentivador e companheiro de lutas operacionais e logísticas deste trabalho, Sr. João Donizette Medina por todo apoio, empenho e dedicação a este trabalho. Sem a sua ajuda e contribuição este trabalho não teria um fluxo contínuo de atividades como teve.

Ao pessoal da SESA-PR (Central) envolvido direta e indiretamente neste trabalho, em especial ao Dr. José Carlos Leite Júnior, Dr. Ricardo Matsuo, Dr. Allan Martins da Silva, Dr. Enéas Cordeiro de Souza Filho, Dr. Alceu Bisetto Jr., Joel Lopes da Silva, Milton Becker de Oliveira, Roque Perinazzo, Luciane Méri Czuby, Ana Roseli Moreira de Souza e muitas outras, por acreditarem que tudo seria possível e por todo apoio técnico, logístico, além da confiança, dedicação e amizade ao longo da execução deste trabalho.

A todos os técnicos de entomologia da SESA-MS envolvidos neste trabalho, em especial ao Sr. James Rudy Silveira, pelo apoio técnico e logístico para viabilizar as capturas de primatas no Estado do Mato Grosso do Sul, além da amizade e apoio profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando de Camargo Passos (UFPR), aos seus orientados de mestrado Lucas de Moraes Aguiar e Gabriela Ludwig e ao Prof. Gustavo Monteiro Teixeira (FAP) pela grande contribuição na área de primatologia e pelas trocas de experiências, tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho e publicações, além da amizade e apoio profissional.

Ao pessoal do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém – PA, por todo apoio técnico para realização do diagnóstico das arboviroses, em especial ao Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos (diretor da seção de arbovirologia e doenças hemorrágicas), que permitiu a nossa ida ao IEC para processar as amostras de PNH e realizar treinamento. Também às consultoras da OPAS Lívia Caricio Martins, Janifer O. Chiang e Eliana Vieira Pinto da Silva por todo

apoio técnico, além da amizade e consideração. Agradecimento especial ao Dr. Márcio Roberto Nunes Teixeira que nos abrilhantou com um curso teórico-prático de diagnóstico para arboviroses na UEL, além da amizade e apoio profissional.

À Dr^a Zouraide Guerra Antunes Costa do GT-FA do Ministério da Saúde por ter me iniciado no maravilhoso mundo das arboviroses e vigilância de epizootias, além da amizade, confiança e importantes trocas de experiências profissionais, desde a reunião de Guaíra-PR até o momento. Muito obrigado por esta oportunidade!

À técnica e colega de turma de doutorado Kerlei Cristina Médici pela amizade, disponibilidade, confiança e auxílio técnico necessários para o desenvolvimento deste trabalho junto ao Laboratório de Virologia Animal (DMVP/CCA/UEL).

Aos técnicos Ademir, Elizabete e Dalíria pela ajuda incondicional, mas principalmente pela amizade ao longo da caminhada.

À técnica Lucimara, pelo apoio junto ao Laboratório de Leptospirose (DMVP/CCA/UEL).

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial a Dona Cidinha, Zé Aldivino, Maria José, e Neuza por cada caloroso bom dia, boa tarde e sorrisos trocados nas idas e vindas pelos corredores...

Aos secretários Valdecir, Reinaldo, Nelson e Helenice pela disposição, paciência e ajuda nos trâmites burocráticos, além da amizade e apoio.

Aos amigos e companheiros de linha de frente nas capturas e análises laboratoriais, Luciano de Souza Malanski, Marcos Massaaki Shiozawa, Kledir A. Hofstaetter Spohr e Prof^a Carmen L. S. Hilst por toda amizade, convívio, dias de alegrias e tristezas compartilhados, aventuras e emoções que carregaremos para o resto de nossas vidas.

À amiga-“irmã” Célia, pela sincera amizade compartilhada durante todos estes anos, pelo respeito, por cada palavra de consolo ou conquista alcançada.

À amiga e “irmã”, por parte de orientador, Fabiana por todo apoio, incentivo e auxílio prestado, principalmente no término deste trabalho. Sem sua preciosa ajuda seria impossível terminá-lo em tão pouco tempo... Agradeço também ao amigo Horácio, pela paciência e pelos laços de amizades estreitados no final deste trabalho.

Aos queridos amigos que sem dúvida tornaram esta jornada muito mais agradável e divertida. Às amigas Flora, Luciana, Regina, Luciene e Karina pela amizade, histórias em comum, “conversas de corredor”, alegrias e tristezas compartilhadas. À amiga Juliana Dias pela amizade, orações, “conversas de corredor”, alegrias e tristezas compartilhadas. Agradeço também aos amigos de caminhada Daniela, Léo, Juliana Galhardo, Vinícius, Mauro, Felipe, Roberta, Renata, Bruno, Kleber, Bruna, Fran, Daniel (Frango), Fábio, Alexandre, Kátia e Michelle que sempre estarão vivos em minha memória.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública do DMVP/CCA/UEL.

Ao grupo de oração ecumênico do DMVP, que todas as quartas-feiras no horário do almoço se reunia para louvar ao Senhor e orar. Muitas saudades destes breves, porém ótimos momentos de comunhão e verdadeira irmandade cristã.

A todos os amados irmãos da Igreja Batista - Bairro Aeroporto (Londrina-PR) que intercederam por mim por meio de suas preces e orações... Como foi bom poder conhecê-los, conviver e compartilhar da mesma fé em Nosso Senhor Jesus Cristo... Muito obrigado por tudo... Muitas saudades...

À Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina pela liberação para realização do meu doutoramento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (DMVP/CCA/UEL) por ter me aceitado como professor em qualificação pelo Programa de Qualificação Institucional (PQI/CAPES).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Doutorado (PQI/CAPES).

A todos os Professores, Técnicos e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UEL pela formação acadêmica e científica.

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL (PROPPG).

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR (PRPPG), em especial à funcionária Conceição, pelas orientações, auxílio e empenho para resolver todos os problemas relacionados ao PQI/CAPES.

À Prefeitura do acolhedor município de Porto Rico-PR, pelos seus préstimos iniciais que garantiram o início da grande jornada.

E a todos que estiveram ligados direta ou indiretamente com a realização deste trabalho e meu evoluir...

MUITÍSSIMO OBRIGADO!!!

SVOBODA W. K. **Vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em saúde pública.** 2007, 135 f, Tese (Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

Epizootias em animais selvagens podem ser consideradas importantes indicadores para saúde pública, porém pouco utilizadas em vigilância epidemiológica. Avaliação de primatas não humanos (PNH), como “animais sentinelas”, foi realizada através deste estudo na região do município de Porto Rico-PR, alto Rio Paraná, no período de junho de 2004 a abril de 2006. Técnicas de captura foram utilizadas para três espécies nativas de PNH: *Alouatta caraya*, *Cebus nigrinus*, *Cebus cay*. Uma tropa de cavalos de fazenda, que freqüentava local próximo a um dos locais de captura de PNH, foi utilizada na pesquisa. Amostras de sangue, soro, fezes, pêlos, entre outras, foram colhidas, separadas e utilizadas para avaliar o perfil sanitário dos animais. Procedimentos operacionais foram padronizados para realizar a vigilância de epizootias de forma rápida e ordenada. Quatro esquemas de trabalho a campo foram propostos: dois na forma passiva e dois na forma ativa. Os vírus da encefalite Saint Louis (SLEV) (n=133 PNH; n=23 cavalos de fazenda) e da doença de Borna (BDV) (n=147 PNH) foram diagnosticados. A prevalência de anticorpos contra SLEV foi de 11.62% (*A. caraya*), 12.50% (*C. nigrinus*), 30.77% (*C. cay*) pelo teste de inibição da hemaglutinação. Destes, 2.32% (*A. caraya*), 6.25% (*C. nigrinus*) e 15.38% (*C. cay*) foram confirmados por soroneutralização em camundongos. Para os cavalos de fazenda a prevalência de anticorpos contra SLEV foi de 39.13% pelo teste de inibição da hemaglutinação, não sendo confirmada por soroneutralização em camundongos. Nenhum arbovírus foi isolado das 133 amostras de sangue de PNH e das 23 amostras de sangue de eqüinos testadas em células C6/36. A presença de BDV p24 RNA foi investigada pela transcrição reversa e *nested* PCR utilizando *primers* específicos para o fragmento p24 do BDV. A prevalência do BDV nestes macacos foi de 15,38%. As seqüências obtidas revelaram identidade com os dados seqüenciais depositados no *GenBank* para BDV. Somente primatas da espécie *Cebus cay* foram positivos para o BDV. Este resultado pode ajudar a entender a distribuição do BDV e SLEV entre as espécies de primatas e o possível papel destes animais na manutenção dos vírus no meio ambiente.

Palavras-chave: Vigilância, epizootias, macacos, encefalite Saint Louis, doença por Borna vírus.

ABSTRACT

SVOBODA W. K. **Epizootics surveillance in nonhuman primates (NHP) like monitoring instrument of arboviruses and other interest viruses in public health.** 2007, 135 p, Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

Epizootics in wild animals can be considered important public health indicators, besides little used in epidemiological surveillance. Evaluation of non human primates (NHP), like “sentinels animals”, was realized through this study in Porto Rico County region, upper Paraná River, including Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil, between June/04 and April/06. Capture techniques were used for three native species: *Alouatta caraya*, *Cebus nigritus* and *Cebus cay*. A horse farm herd was used in present study because lived near by one of the PNH capture locals. Biological material (blood, sera, feces, and others) was collected, separated and used to evaluate sanitary status. Operational proceedings were standardized to do quick and ordinate epizootics surveillance. Four types of field work were proposed: two in passive way and two in active form. Saint Louis encephalitis virus (SLEV) (n=133 PNH; n=23 farm horses) and Borna disease virus (BDV) (n=147 PNH) were diagnosed. The antibodies prevalence against SLEV was 11.62% (*A. caraya*), 12.50% (*C. nigritus*), 30.77% (*C. cay*) by inhibition hemagglutination test. From these, 2.32% (*A. caraya*), 6.25% (*C. nigritus*) and 15.38% (*C. cay*) were confirmed by serum neutralization in mice. For farm horses the antibodies prevalence against SLEV was 39.13% by inhibition hemagglutination test, do not being confirmed by serum neutralization in mice. No arbovirus was isolated of 133 PNH blood samples and 23 farm horses blood samples. The BDV p24 RNA presence was investigated by reverse transcription and nested PCR using specific primers to p24 from BDV. Prevalence of p24 RNA of BDV in these monkeys was 15.38%. The obtained sequences revealed identity with sequential database deposited in *GenBank* to BDV. Only *Cebus cay* monkeys were positive to BDV. This result helps understanding the distribution of BDV and SLEV between monkey species and the possible role of these animals in virus environmental maintenance.

Key words: Surveillance, epizootics, monkeys, Saint Louis encephalitis, Borna disease.

Revisão de Literatura

Figura 1. Esquema do atual modelo de vigilância epidemiológica da febre amarela preconizado pelo Ministério da Saúde, incluindo a vigilância de epizootias em primatas não humanos (Portaria nº 5 da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde de 21/02/06, publicada no Diário Oficial da União, Seção 1, nº38 em 22/02/06).....24

Vigilância de epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) como instrumento de monitoramento da Febre Amarela (FA) silvestre e outras arboviroses e zoonoses de interesse no Estado do Paraná.

Figura 1. Área de estudo: imagem LandSat mostrando a região do município de Porto Rico, Alto Rio Paraná. A) noroeste do Estado do Paraná, B) sudeste do Estado do Mato Grosso do Sul, C) Pontal do Paranapanema, Estado de São Paulo.....46

Figura 2. Localização das áreas epidemiológicas da febre amarela no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde /2003).....46

Figura 3. Ilustração de um corte transversal da calha do Alto Rio Paraná na região de Porto Rico. F.E.S.A.: Floresta Estacional Semidecidual Aluvial; F.E.S.S.: Floresta Estacional Semidecidual Submontana.....47

Figura 4. Exemplos de *Alouatta caraya*. Dimorfismo sexual: macho apresentando cor negra e fêmea cor castanho-amarelada.....48

Figura 5. *Cebus nigrinus*.....48

Figura 6. *Cebus cay*.....48

Figura 7. Particularidades da ceva utilizada para capturas de primatas não humanos do gênero *Alouatta*.....50

Figura 8. Modelo esquemático A de armadilha arbórea com duas entradas e portas tipo guilhotina, tamanho: 1,60 x 0,80 x 0,80m, armação de ferro e tela metálica com malha 2,7 x 2,7cm.....50

Figura 9. Modelo esquemático B de armadilha arbórea com uma entrada e porta tipo guilhotina, tamanho: 1,20 x 0,60 x 0,60m, armação de ferro e tela metálica com malha 2,7 x 2,7cm.....50

Figura 10. Seis bugios (fêmeas adultas e juvenis) capturados simultaneamente utilizando o modelo esquemático B de armadilha arbórea.....50

Figura 11. Visualização de armadilha arbórea do modelo esquemático B devidamente instalada sobre plataforma em copa de árvore.....50

Figura 12. Processo de tranquilização pelo uso de zarabatana e dardos anestésicos, em copa de árvore. Note o observador na altura da armadilha arbórea auxiliado pelas técnicas de escalagem.....51

Figura 13. Dardos anestésicos de diferentes volumes, para utilização em zarabatana.....51

Figura 14. Particularidades da ceva utilizada para capturas de primatas não humanos do gênero *Cebus*.....52

Figura 15. Protocolo de sedação utilizado em primatas não humanos para procedimentos de rotina: colheita de material biológico e dados biométricos, aplicação de microchip, entre outros.....52

Figura 16. Modelo esquemático de armadilha térrea tipo gaiolão utilizada para a captura de *Cebus nigrinus* no Estado do Paraná, tamanho: 2,0 x 2,0 x 3,0 m.....53

Figura 17.	Visualização de armadilha térrea tipo gaiolão devidamente instalada em fragmento de mata com pequena plataforma para fornecimento de ceva.....	53
Figura 18.	Contenção física de macaco-prego (<i>Cebus nigritus</i>) com utilização de puçá, no interior da armadilha térrea.....	53
Figura 19.	Aferição de temperatura corpórea em um exemplar de bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto tranqüilizado.....	54
Figura 20.	Auscultação cardíaca de uma fêmea adulta de bugio (<i>Alouatta caraya</i>) durante monitoramento anestésico.....	54
Figura 21.	Modelo de ficha individual de primatas não humanos para coleta de dados relativos ao animal e ao local de captura, utilizada para animais sadios, doentes ou mortos.....	56
Figura 22.	Pesagem de animal capturado em balança de precisão, devidamente sedado e colocado em saco tipo rede.....	57
Figura 23.	Verificação de coloração de mucosas e dentição em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	57
Figura 24.	Aferição do comprimento do corpo em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	57
Figura 25.	Aferição do comprimento da cauda de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	57
Figura 26.	Aferição do perímetro do crânio de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	57
Figura 27.	Aferição do perímetro da cabeça de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	57
Figura 28.	Aferição do comprimento de pé (incluindo unha) de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	58
Figura 29.	Aferição do comprimento de mão (incluindo unha) de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	58
Figura 30.	Aferição do comprimento de barba de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	58
Figura 31.	Aplicação de microchip na região interescapular em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, adulto, devidamente tranqüilizado e contido.....	59
Figura 32.	Leitura de microchip após aplicação na região interescapular em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	59
Figura 33.	Posicionamento do animal, realização do garrote e visualização da veia braquial em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	59
Figura 34.	Punção da veia braquial para colheita de sangue em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado e contido.....	59
Figura 35.	Amostra em duplicata de sangue total, devidamente alíquotada em criotubos identificados, sendo congelados em nitrogênio líquido ainda a campo, através da utilização de garrafa térmica de boca larga em aço inoxidável.....	60
Figura 36.	Tubos para obtenção de soro colocados na centrífuga em laboratório.....	60
Figura 37.	Tubos para obtenção de soro após centrifugação, prontos para a separação do soro.....	60
Figura 38.	Alíquota de soro em tubo plástico tipo criogênico.....	60
Figura 39.	Realização de enema retal de um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado.....	61

Figura 40.	Realização de massagem abdominal para facilitar eliminação final de fezes após enema retal em um bugio (<i>Alouatta caraya</i>), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado.....	61
Figura 41.	Realização de tricotomia em torno do pulso direito em macaco-prego (<i>Cebus nigritus</i>), macho, adulto, após término dos procedimentos.....	62
Figura 42.	Animal capturado, macaco-prego (<i>Cebus nigritus</i>), em processo de recuperação anestésica, após término dos procedimentos. Note que a gaiola está sendo coberta com lona, em local apropriado.....	62
Figura 43.	Organograma da Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos com a presença do Médico Veterinário, para realização das ações a campo, Estado do Paraná.....	65
Figura 44.	Organograma da Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos na ausência do Médico Veterinário, para realização das ações a campo, Estado do Paraná.....	66

Serologic evidence of Saint Louis encephalitis virus widespread in free-ranging New World monkeys and farm horses in the upper Paraná River basin region, Brazil

Figure 1.	Picture showing the region where monkeys were captured. Satellite photo shows the Porto Rico County region, upper Paraná River, Brazil. A) Northwestern of Paraná State; B) Southeastern of Mato Grosso do Sul State; C) Paranapanema Pontal, São Paulo State.....	90
Figure 2.	The figure shows the relationships among total of captured monkeys (by species) and their positive results for Hemagglutination Inhibition (HI) and Mouse Neutralization Test (MNT).....	91

Occurrence of Borna disease virus p24 RNA in free-ranging New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) in the upper Paraná river basin region, Brazil

Figure 1.	Picture showing the region where monkeys were captured. Satellite photo shows the Porto Rico County region, upper Paraná River, Brazil. A) Northwestern of Paraná State; B) Southeastern of Mato Grosso do Sul State; C) Paranapanema Pontal, São Paulo State.....	105
Figure 2.	Detection of p24 RNA for Borna disease virus (BDV) in blood samples from free-ranging New World monkeys. The product of 392 base pairs fragment was detected by RT-nested PCR in the samples 4, 73, 75, 77. L: Ladder is 100 base pairs marker (Promega, Madison, WI).....	106

LISTA DE TABELAS

Vigilância de epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) como instrumento de monitoramento da Febre Amarela (FA) silvestre e outras arboviroses e zoonoses de interesse no Estado do Paraná.

Tabela 1.	Distribuição por espécie, sexo e faixa etária ¹ dos primatas não humanos (PNH) capturados durante o período de junho de 2004 a abril de 2006 na região do município de Porto Rico - Paraná.....	49
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Serologic evidence of Saint Louis encephalitis virus widespread in free-ranging New World monkeys and farm horses in the upper Paraná River basin region, Brazil

Table 1.	Distribution for species, sex, and age of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.....	87
Table 2.	Results of Haemagglutination Inhibition (HI) and Mouse Neutralization Test (MNT) in free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.....	88
Table 3.	Association results among the characteristics studied (species, sex, age and horse presence in the same habitat) with presence of anti-Saint Louis encephalitis virus antibodies (Neutralization Logarithm Index - NLI) in serum samples of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.....	89

Occurrence of Borna disease virus p24 RNA in free-ranging New World monkeys (*Cebus spp.*; *Alouatta caraya*) in the upper Paraná River basin region, Brazil

Table 1.	Distribution for specie, sex and age of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and April/06 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.....	104
Table 2.	Association results among the studied characteristics (specie, sex, age and capture's region) with presence of Borna disease virus – BDV (molecular diagnosis) in blood samples of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and April/06 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.....	104

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos (PNH).....	20
1.1.1. Importância dos PNH para a saúde pública e meio ambiente.....	20
1.1.2. Utilização de PNH como animais sentinelas para o diagnóstico de arboviroses.....	21
1.1.3. Histórico, importância e aplicabilidade na saúde pública.....	22
1.2. Encefalite Saint Louis.....	25
1.3. Doença por Borna Vírus.....	29
1.4. Referências.....	31

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. Vigilância de epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) como instrumento de monitoramento da Febre Amarela (FA) silvestre e outras arboviroses e zoonoses de interesse no Estado do Paraná, Brasil.....

Resumo.....	42
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Proposta metodológica para vigilância de epizootias em PNH no Estado do Paraná.....	45
Localização e características da região.....	45
Procedimentos de biossegurança.....	47
Proteção imunitária do pessoal envolvido.....	47
Equipamentos de Proteção Individual (E.P.I.s).....	47
Animais.....	48
Captura de animais.....	48
Procedimentos utilizados para a captura de PNH do Gênero <i>Alouatta</i>	49
Procedimentos utilizados para a captura de PNH de Gênero <i>Cebus</i>	51
Procedimentos com animais sedados.....	53
Colheita de dados (ficha individual de PNH).....	54
Aplicação do microchip (“transponder”) de identificação.....	58
Colheita de material biológico.....	59
Término dos procedimentos, acompanhamento e soltura dos animais.....	61
Propostas para vigilância de epizootias de PNH no Estado do Paraná.....	62
Vigilância de epizootias de PNH na forma passiva.....	62
Vigilância de epizootias de PNH na forma ativa.....	63
Diagnóstico laboratorial.....	64
Discussão.....	67
Conclusão e Considerações finais.....	68
Referências.....	69

3.2. Serologic evidence of Saint Louis encephalitis virus widespread in free-ranging New World monkeys and farm horses in the upper Paraná River basin region, Brazil.....

73

Abstract.....	73
Introduction.....	73
Materials and Methods.....	76
Site of Study.....	76
Animals.....	76
Monkeys.....	76
Horses.....	77
Serological Assays.....	77
Hemagglutination Inhibition Test (HI).....	77
Mouse Neutralization Test (MNT).....	77
Attempts of virus isolation.....	78
Statistical analysis.....	78
Results.....	78
Discussion.....	79
Biographical stretch.....	81
Acknowledgements.....	81
References.....	82

3.3. Occurrence of Borna disease virus p24 RNA in free-ranging New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) in the upper Paraná river basin region, Brazil.....

.....	93
Abstract.....	93
Introduction.....	94
Materials and Methods.....	96
Site of Study.....	96
Animals.....	96
Molecular Diagnosis of BDV.....	97
Nucleic acid preparation and reverse transcriptase.....	97
Nested - Polymerase chain reaction (PCR).....	97
Statistical analysis.....	98
Results.....	98
Discussion.....	98
Acknowledgements.....	100
References.....	100

4. CONCLUSÕES.....

5. ANEXOS.....

5.1. Publicações.....	109
5.2. Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	122
5.3. Licença para Captura/Coleta/Transporte/Exposição.....	123
5.4. Normas de publicação.....	124
A. Normas de publicação do periódico <i>Cadernos de Saúde Pública</i>	125
B. Normas de publicação do periódico <i>Emerging Infectious Disease</i>	128
C. Normas de publicação do periódico <i>Veterinary Microbiology</i>	131

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH)

1.1.1. Importância dos PNH para a saúde pública e meio ambiente

O Brasil é o país detentor da maior diversidade de primatas do mundo, tendo aproximadamente 95 espécies já descritas, muitas das quais são nativas, a maioria vivendo na região Amazônica. Ainda no século XXI estão sendo descobertas novas espécies, como *Callicebus bernhardi* e *Callicebus stephennashi* (VAN ROOSMALEN; VAN ROOSMALEN; MITTERMEIER, 2002).

A grande proximidade filogenética também pode ser traduzida, entre outras, em patologias comuns aos homens e aos PNH, tornando-os ótimos modelos experimentais, poupando a espécie humana de riscos e sofrimentos. Conquanto, tal aproximação pode trazer riscos à saúde de ambos, na forma de patógenos antropozoonóticos e zooantroponóticos.

Utilizando-se a Febre Amarela (FA) como exemplo, sabe-se que a associação de vertebrados e vetores potenciais em um habitat favorável em densidades ótimas constitui um fator fundamental para a persistência do vírus amarílico. No entanto, dúvidas persistem em relação ao tamanho ótimo das populações de mosquitos. Além disso, ainda não se sabe se as populações de primatas apresentam contingências suficientes para a manutenção do vírus no ciclo silvestre da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Além do mais, estudos que visem à análise das condições de saúde dos primatas em vida livre e que impliquem na necessidade de capturá-los, defrontam-se imediatamente com problemas de quantificação de uma amostragem animal significativa a ser capturada. Um primeiro passo para amenizar os problemas de ambos os casos seria a realização de estudos em populações e comunidades dos

primatas em um determinado tempo e espaço para quantificar os parâmetros que reflitam as informações necessárias (AGUIAR, 2006). Com base em princípios de ecologia médica, Ávila-Pires (2000) salienta que a correta avaliação do papel de hospedeiros não humanos na manutenção de enfermidades requer o cálculo estimativo da população de animais em uma determinada área, o estudo de sua dinâmica populacional e a análise da estrutura e funcionamento das comunidades que integram. Neste sentido, quando houver necessidade de se realizar o controle racional de uma doença em que animais silvestres estejam envolvidos, é fundamental o conhecimento detalhado da(s) espécie(s) envolvida(s) como índices de densidade populacional, biologia, hábitos e circulação destes animais (AGUIAR *et al.*, 2005; AGUIAR, 2006).

1.1.2. Utilização de PNH como animais sentinelas para o diagnóstico de arboviroses

Os animais silvestres são importantes reservatórios nos ciclos epidemiológicos das diversas zoonoses existentes, podemos considerar os PNH como animais “sentinelas naturais” para investigação de determinadas epizootias de interesse à saúde pública. Considerando o meio ambiente e suas condições propícias para a manutenção de diversos ciclos epidemiológicos, vários agentes etiológicos podem estar envolvidos em epizootias acometendo PNH entre eles vírus, bactérias, protozoários, rickettsias, fungos e parasitas. As viroses destacam-se pelas suas características epidemiológicas.

A utilização de macacos sentinelas foi primeiramente relatada em estudos sobre FA na África (CAUSEY, 1986), no entanto Hervé *et al.* (1986), alertaram que isolamentos obtidos a partir de animais sentinelas, podem fornecer apenas indicações sobre os tipos de vertebrados selvagens que poderiam intervir no ciclo natural da doença, pelo fato de existirem preferências alimentares, por parte dos vetores, por um só tipo de vertebrado. Desta forma, a

opção por utilizar animais capturados do mesmo ecossistema, como “animais sentinelas naturais”, para pesquisa de arbovirose torna-se o caminho mais seguro e factível.

Hull *et al.* (1991), realizaram levantamento sorológico de FA em 32 primatas do gênero *Alouatta* em Trinidad Tobago, sendo posteriormente isolado o vírus amarelo em 50% das amostras sorológicas obtidas e em 19 de um total de 174 *pools* de mosquitos capturados do gênero *Haemagogus*. Analisando esses resultados, Butcher (1991) salientou a importância da utilização de macacos do gênero *Alouatta* como indicadores da presença do vírus amarelo.

Em outro estudo, Contigiani *et al.* (2000), pesquisaram a prevalência de anticorpos contra Flavivírus em 105 primatas da espécie *Alouatta caraya* autóctones da Argentina. Confirmou-se somente a infecção causada pelo vírus da encefalite Saint Louis (SLEV), apresentando prevalência de 35,23% em teste de inibição da hemaglutinação (HI) e de 32,38% em teste de neutralização em camundongos (MNT). As mesmas técnicas não detectaram outras arbovirose como FA, dengue e Bussuquara na população avaliada.

De Thoisy *et al.* (2001) avaliaram a saúde de diversas espécies de mamíferos procedentes de resgate na formação de uma usina hidrelétrica na Guiana Francesa. Dentro da ordem Primates, foram resgatados 122 *Alouatta seniculus*, 95 *Saguinus midas*, e 6 *Pithecia pithecia*. Foram detectados títulos elevados de anticorpos para os arbovírus Mayaro e FA, principalmente em *Alouatta seniculus*, porém não foi possível o isolamento viral.

1.1.3. Histórico, importância e aplicabilidade na saúde pública

A vigilância de epizootias em PNH tem sua origem e importância dentro da vigilância epidemiológica da FA, conforme documentos técnicos do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 1999; BRASIL, 2005). Nestes documentos há inferência sobre a atenção que se deve ter em relação à mortalidade de macacos sem causa definida.

A vigilância epidemiológica da FA era constituída basicamente por: vigilância entomológica, vigilância de casos humanos (contemplando a vigilância sindrômica) e na atenção para mortandade de PNH sem causa definida. A utilização da forma passiva da vigilância de epizootias em PNH, como ferramenta auxiliar da vigilância epidemiológica da FA, é um instrumento que vem sendo implementado pelo MS, mais especificamente pelo Grupo de Trabalho da FA (GT-FA). A partir de 2002, o MS iniciou trabalho com equipe interdisciplinar e interinstitucional com técnicos da área de saúde pública de diversas regiões do país, para elaboração do primeiro Manual de Vigilância de Epizootias em PNH, lançado no ano de 2005 (BRASIL, 2005). Este primeiro instrumento teve como finalidade melhorar a vigilância epidemiológica da FA, que até então, encontrava-se basicamente apoiada na vigilância de casos humanos.

Em decorrência dos esforços do GT-FA do MS, no sentido de incorporar a vigilância de epizootias em PNH como um importante instrumento para a vigilância epidemiológica da FA, foi criada a Portaria N° 5, de 21/02/2006 - DNC (publicada no D.O.U. – Seção 1 - N° 38 de 22/02/2006), que inclui morte de PNH e outras epizootias de notificação imediata. Desta forma, a partir desta data as notificações de epizootias em PNH devem ser realizadas pelos serviços de saúde pública, constituindo grande avanço não só para a vigilância epidemiológica da FA, mas também, de outras zoonoses de interesse envolvidas nestes eventos (Figura 1).

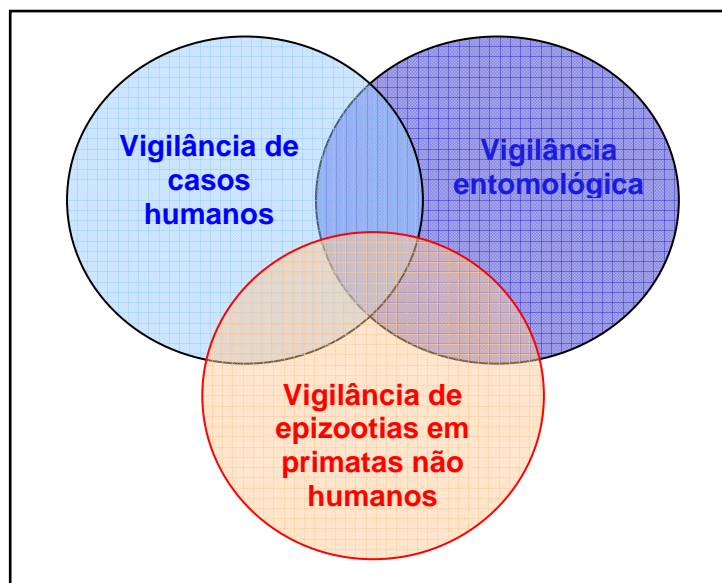


Figura 1 – Esquema do atual modelo de vigilância epidemiológica da FA preconizado pelo Ministério da Saúde, incluindo a vigilância de epizootias em primatas não humanos (Portaria nº 5 da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde de 21/02/06, publicada no Documento Oficial União, Seção 1, nº38 em 22/02/06).

Na região noroeste do Estado do Paraná no período de dezembro de 2000 a maio de 2001, ocorreram relatos de mortes de PNH da espécie *Alouatta caraya* que só foram notificados em outubro de 2001 à Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA-PR). A demora na notificação impossibilitou estabelecer a *causa mortis* dos animais. Ainda em 2001 ocorreram epizootias com mortes de PNH da espécie *Alouatta guariba* no Estado do Rio Grande do Sul, tendo como diagnóstico conclusivo a FA (TORRES *et al.*, 2003). Estes fatos contribuíram para que os técnicos da SESA-PR iniciassem o planejamento de ações que inserissem a vigilância de epizootias em PNH dentro da vigilância epidemiológica da FA contemplada no Plano Estadual de Controle da FA. Entre as ações, foi realizada a primeira capacitação de técnicos (médicos veterinários), das 22 Regionais de Saúde do Estado, para a incorporação desta vigilância como ferramenta das investigações e monitoramento não só da

FA, mas também de outras arboviroses e zoonoses de interesse envolvendo estes animais. Além disso, dentro do Plano Estadual de Controle da FA do Paraná, foi criada e estabelecida uma linha de pesquisa interdisciplinar e interinstitucional, envolvendo além da SESA-PR, a UFPR e a UEL, que visou o aprimoramento desta vigilância de epizootias, adequando à mesma à realidade e necessidades do Estado do Paraná. A proposta da SESA-PR foi estabelecer a vigilância de epizootias em PNH, tanto na forma passiva (preconizada pelo MS) quanto na forma ativa, visando um monitoramento constante não somente da FA, mas também de outras arboviroses e zoonoses de interesse à saúde pública. Além disso, consolidar uma massa crítica de técnicos e pesquisadores colaboradores, da SESA-PR, UEL e UFPR, para execução e aprimoramento deste modelo de vigilância.

1.2. ENCEFALITE SAINT LOUIS

O vírus da encefalite Saint Louis pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que contém em aproximadamente 70 espécies e subespécies de vírus distribuídos mundialmente (ICTV, 2005). Os flavivírus são pequenos (50-70 nm), envelopados, RNA fita simples, polaridade positiva (MONATH; HEINZ, 1996) e inclui algumas espécies virais associadas a doenças sindrômicas em seres humanos, tais como febre, febre hemorrágica e encefalite (HAYES, 1989). A maioria das flaviviroses é transmitida entre vertebrados suscetíveis por artrópodes hematófagos, principalmente por mosquitos (ICTV, 2005; TURELL; GUINN; OLIVER, 2000).

Os vírus patogênicos de humanos de maior importância deste gênero incluem os vírus da FA, do dengue, da encefalite russa, da encefalite japonesa, da encefalite Saint Louis e o da encefalite West Nile (MONATH; HEINZ, 1996).

Atualmente, existem onze flavivírus reconhecidos no Brasil, são eles: Bussuquara, Cacipacore, Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4), Iguape, Ilhéus, Rocio, encefalite Saint Louis e FA

(FIGUEIREDO, 2000). Isolamento de um vírus semelhante ao Naranjal na região amazônica elevou para doze o número de flavivírus isolados no Brasil (VASCONCELOS PFC, comunicação pessoal, 2007).

Aves selvagens e domésticas são consideradas como os principais hospedeiros vertebrados para encefalite Saint Louis. Esta enfermidade é transmitida aos seres humanos principalmente pelos mosquitos do gênero *Culex*, tais como o *Culex tarsalis*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens* nas Américas do Norte e Central e na Argentina (MITCHELL *et al.*, 1980), e *Culex declarator* e *Culex coronator* na bacia Amazônica (VASCONCELOS *et al.*, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1992).

O protótipo da estirpe do vírus da encefalite Saint Louis foi isolado de tecido cerebral na cidade de Saint Louis, EUA, em 1933 (KARABATSOS, 1985). No Brasil, este vírus foi isolado pela primeira vez na década de 60 de um pool de mosquitos (*Sabethes belisarioi*) capturados na rodovia Belém-Brasília (THEILER; DOWNS, 1973). Desde então, vários outros isolamentos deste vírus foram obtidos de aves e mosquitos selvagens, enquanto somente dois isolamentos foram relatados de seres humanos sem sintomas neurológicos na Amazônia (VASCONCELOS *et al.*, 1992). Outros isolamentos foram também obtidos no Vale da Ribeira na Mata Atlântica, São Paulo, incluindo um isolamento em ser humano (ROCCO *et al.*, 2005), na Argentina (SABATINI *et al.*, 1998) e no Peru (WATTS *et al.*, 1998). Recentemente, foi descrito um surto de encefalite Saint Louis na região da cidade de Córdoba, oeste da Argentina (DIAZ *et al.*, 2006).

As manifestações clínicas da infecção pelo vírus da encefalite Saint Louis variam de sintomas semelhantes à gripe até encefalite fatal (MITCHELL *et al.*, 1980). Como em várias flaviviroses, a encefalite Saint Louis apresenta neurotropismo, mas seu mecanismo neurotrópico específico que permite alcançar o SNC, ainda não está estabelecido (SOLIMAN; GOTUZZO, 2004).

O SLEV está amplamente distribuído nos Estados Unidos, sendo relatados surtos em humanos no Canadá e casos esporádicos no Caribe (SOLIMAN; GOTUZZO, 2004). Infecções podem ocorrer como surtos focais de encefalite, seguido por anos de casos esporádicos. Grandes epidemias urbanas de encefalite humana vêm sendo relatadas nos EUA, com ocorrência média de 35 casos por ano e taxa de mortalidade variando de 2 a 20%, sendo mais elevada em pacientes idosos (SOLIMAN; GOTUZZO, 2004). Pacientes com doença clínica possuem 20% de chance de desenvolver seqüelas incluindo irritabilidade, perda de memória, vários tipos de desordens no movimento e déficits motores. A incidência é mais alta em homens provavelmente devido a maior exposição ao ambiente, quando comparados a mulheres (LANCIOTTI *et al.*, 1999; MONATH; HEINZ, 1996).

Nas regiões norte e nordeste do Brasil, aproximadamente 5% das populações humanas estudadas possuem anticorpos específicos por HI para encefalite Saint Louis, muitos deles confirmados por MNT e/ou por IgG/IgM ELISA. Entretanto, os resultados do IH devem ser interpretados cuidadosamente devido às reações cruzadas existentes entre diferentes flavivíroses, especialmente em áreas endêmicas para dengue e onde a população seja freqüentemente vacinada contra a FA. Por outro lado, o vírus da encefalite Saint Louis pode estar circulando nestas áreas e infectando seres humanos, mas muitas infecções são inaparentes ou subclínicas (FIGUEIREDO, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 1998).

Na Argentina, pesquisas sorológicas em humanos indicam ampla distribuição e endemicidade para o vírus da encefalite Saint Louis em zonas temperada e tropical (SABATTINI; AVILÉS; MONATH, 1998). Diferentes estirpes virais foram isoladas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (MITCHELL *et al.*, 1985), roedores e humanos com doença sistêmica (SABATTINI; AVILÉS; MONATH, 1998). Anticorpos foram detectados em humanos, aves, mamíferos domésticos e selvagens (SABATTINI *et al.*, 1985). O diagnóstico dos casos clínicos humanos é raro, principalmente devido a falta de um sistema de

monitoramento para encefalites virais e arboviroses neste país (DIAZ *et al.*, 2003). Na região da cidade de Córdoba, foi relatada uma prevalência de anticorpos de aproximadamente 14% para o SLEV, sendo detectadas diferenças significativas entre faixas etárias. Em pessoas idosas foi encontrada uma positividade de 29,9% para o SLEV, porém anticorpos não foram detectados em crianças abaixo de 10 anos (SPINSANTI *et al.*, 2002). O comportamento epidemiológico do vírus da encefalite Saint Louis na Argentina é totalmente diferente do observado nos EUA, onde é freqüente o registro de casos clínicos de encefalite provocados por este vírus. A causa desta diferença poderia estar associada ao acúmulo de imunidade com a idade e a proteção cruzada reduzindo o número de casos clínicos (DIAZ *et al.*, 2003). Recentemente um surto de encefalite Saint Louis foi descrito na região metropolitana de Córdoba, Argentina (DIAZ *et al.*, 2006).

Investigações sorológicas prévias em animais selvagens são muito escassas na literatura. Entretanto, anticorpos contra o vírus da encefalite Saint Louis foram detectados em veados da cauda branca de Nova Iorque, Dakota do Norte, Texas, Wisconsin e Wyoming (HOFF *et al.*, 1973). O vírus da encefalite Saint Louis também tem sido isolado na vida selvagem brasileira, em animais selvagens e sentinelas e em muitos dos artrópodes da região Amazônica e do Estado de São Paulo (VASCONCELOS *et al.*, 1992; VASCONCELOS *et al.*, 1998). De fato, as últimas três epizootias de encefalite Saint Louis entre PNH incluindo duas delas em macacos sentinelas do gênero *Cebus*, foram descritas na região Amazônica (VASCONCELOS *et al.*, 1992).

Na Guiana Francesa foram avaliadas 140 amostras (sangue e soro) de três espécies de primatas de vida livre trans-locados: *Alouatta seniculus* (97), *Pithecia pithecia* (05) e *Saguinus midas* (38). A técnica para isolamento de arbovírus foi realizada somente para os bugios (*Alouatta seniculus*) e, embora nenhum arbovírus tenha sido isolado, anticorpos específicos na HI foram detectados para os seguintes vírus: FA em 33,57% (47/140), Mayaro

em 79.28% (111/140), DENV-2 em 11.43% (16/140) e SLEV em 14.28% (20/140) (DE THOISY *et al.*, 2001). Como os títulos de anticorpos (por HI) contra o vírus da encefalite Saint Louis foram baixos (< 40) e que os mesmos para FA foram muito altos (> 320) nos mesmos soros, os resultados positivos foram interpretados como reações cruzadas.

1.3. DOENÇA POR BORNA VÍRUS

O vírus da doença de Borna pertence ao gênero *Bornavirus*, família *Bornaviridae* (ICTV, 2005). É um vírus neurotrópico, RNA não-segmentado fita simples sentido negativo, que causa encefalite em cavalos e ovelhas. Este vírus altera as funções cerebrais o que resulta em distúrbios de movimento e de comportamento e pode estar associado a certas desordens psiquiátricas humanas (BODE *et al.*, 2001; FUKUDA *et al.*, 2001; HORNING; LIPKIN, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2000; TAIEB *et al.*, 2001).

Acreditava-se originalmente que a infecção pelo vírus da doença de Borna estava restrita a animais de fazenda (cavalos e ovelhas) e a alguns animais silvestres (lebres) em áreas endêmicas na Alemanha e na Suíça. Com o advento de ferramentas modernas para o diagnóstico da infecção pelo vírus da doença de Borna (hibridização *in situ* e RT-PCR) e com o aumento do interesse internacional por pesquisas envolvendo o vírus da doença de Borna, relatos de espécies suscetíveis e da localização geográfica de casos de infecção natural têm aumentado (ROTT; BECHT, 1995). Animais de risco para infecção natural ou experimental incluem macacos rhesus, cavalos, ovelhas, bovinos, coelhos, cervos, lhamas, alpacas, gatos, ratos, camundongos, gerbils, cães e avestruzes (CARBONE, 2001).

Além do cavalo, seu hospedeiro natural predominante, outros eqüídeos, ovelhas, bovinos, coelhos, cabras, cervos, alpacas, lhamas, gatos, hipopótamos, bichos-preguiça e avestruzes estão se tornando naturalmente infectados com o vírus da doença de Borna (RICHT *et al.*, 1997).

Visto que a fonte das infecções humanas por Borna vírus é desconhecida, é importante investigar a epidemiologia desta enfermidade. Sua ampla variedade de hospedeiros, bem como o alto nível de seqüências homólogas entre isolados de diferentes espécies animais (BINZ *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1994), sugere a possibilidade do vírus da doença de Borna ser uma zoonose (DEGIORGIS *et al.*, 2004). Apesar da provável existência de um hospedeiro selvagem para o vírus da doença de Borna ter sido assumido existir, evidência formal para esta idéia é ainda deficiente. Em um estudo com lince sueco (*Lynx lynx*) foi relatado um caso de doença de Borna, sendo a primeira vez que uma infecção natural foi diagnosticada em um felídeo selvagem (DEGIORGIS *et al.*, 2004).

A predileção do vírus pela região límbica-hipotalâmica e produção em alguns animais de uma síndrome semelhante a desordens afetivas humanas sugeriu a possibilidade de que o vírus da doença de Borna possa estar envolvido em algumas desordens afetivas humanas (AMSTERDAM *et al.*, 1985).

O vírus da doença de Borna é altamente neurotrópico em hospedeiros naturalmente e experimentalmente infectados. Ele se replica em neurônios e astrócitos sem induzir efeitos citopáticos (SCHNEIDER; SCHWEMMLE; STAEHELI, 2005). Este vírus infecta o sistema nervoso central de muitas espécies animais e pode causar distúrbios de comportamento que lembram autismo, esquizofrenia e alterações no humor (PLETNIKOV; MORAN; CARBONE, 2002; TOMONAGA, 2004).

Bode, Ferszt e Czech (1993) relataram que a proporção de portadores de anticorpos contra o vírus da doença de Borna era mais alta que 30% entre pacientes com depressão maior. Além disso, eles também detectaram, por RT-PCR, uma elevada positividade de RNA viral em células mononucleares do sangue periférico proveniente de pacientes psiquiátricos. (BODE *et al.*, 1995).

A análise molecular tem indicado que o genoma do vírus da doença de Borna (BDV) consiste em pelo menos seis *Open Reading Frames* (ORFs). As ORFs codificam a nucleoproteína (p40), a fosfoproteína (p24), o ativador da transcrição, matrix protéica (gp18), proteína do envelope (p56) e a RNA polimerase dependente de RNA (p180) no sentido 5' para 3' (SCHNEIDER *et al.*, 1997).

A segunda ORF (ORF II) codifica uma proteína de 24 kDa (também conhecida como p24), que representa uma suposta fosfoproteína. Adicionalmente à p24, a segunda ORF também produz uma proteína de 16 kDa pela tradução a partir do segundo códon AUG. Esta proteína tem sido identificada em culturas de células infectadas e em cérebro de animais infectados experimentalmente (IKUTA *et al.*, 2002). As proteínas p40 e p24 do BDV são encontradas em abundância nas células do cérebro de animais infectados experimental ou naturalmente com BDV (STITZ; BILZER; PLANZ, 2002).

A maioria dos estudos epidemiológicos emprega as técnicas de RT-PCR ou RT-nested PCR para detectar o RNA viral em amostras biológicas.

1.4. REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, L.M.; LUDWIG, G.; SVOBODA, W.K.; SILVA, L.R.; COLHERA, E.C.; PASSOS, F.C. Ocorrência e georreferenciamento de primatas em ilhas e matas de galeria do Alto Rio Paraná. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE PRIMATOLOGIA, 2005, Porto Alegre. **Anais: Desafios para a conservação em paisagens fragmentadas**. Porto Alegre: FaBioPUCRS, 2005, p. 64-64.
2. AGUIAR, L.M. **Os primatas do corredor do Alto Rio Paraná (Região de Porto Rico, Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul): ocorrência, georreferenciamento e parâmetros populacionais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

3. AMSTERDAM, J.; WINOKUR, A.; DYSON, W.; HERZOG, S.; GONZALES, F.; ROTT, R.; KOPROWSKI, H. Borna Disease Virus. A possible etiologic factor in human Affective Disorders? **Archives of General Psychiatry**, v. 42, p. 1093-1096, 1985.
4. ÁVILA-PIRES, F.D. **Princípios de ecologia médica**. Florianópolis: Editora da UFSC. 2000.
5. BINZ, T.; LEBELT, J.; NIEMANN, H.; HAGENAU, K. Sequence analysis of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. **Virus Research**, v. 34, p. 281–289, 1994.
6. BODE, L.; FERSZT, R.; CZECH, G; Borna disease virus infection and disorders in man. **Archives of Virology**, v. 7, p. 159-167, 1993.
7. BODE, L.; RECKWARLD, P.; EVERUS, W.; STOYLOFF, R.; FERSZT, R. Borna disease virus – specific circulating immune complexes antigenemia, and free antibodies - the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 6, p. 481-491, 2001.
8. BODE, L.; ZIMMERMANN, W.; FERSZT, R.; STEINBACH, F.; LUDWIG, H. Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. **Nature Medicine**, v. 1, p. 232-236, 1995.
9. BRASIL. Ministério da Saúde – FUNASA. In: **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela**. Brasília: MS-FUNASA; 1999.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília: MS; 2005.
11. BUTCHER, L.V. Monitoring of *Alouatta* monkeys as an early warning system in yellow fever surveillance. In: TIKASINGH, E.S. (Ed.). **Studies on the natural**

- history of yellow fever in Trinidad.** Port of Spain: Caribbean Epidemiology Centre; 1991, p. 59-62.
12. CARBONE, K.M. Borna Disease Virus and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 14, p. 513-527, 2001.
 13. CAUSEY, E.C. Arboviroses: implantação dos estudos sobre arbovírus na região amazônica. In: Instituto Evandro Chagas (Org.). **Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**, v. 1. Belém: Editora Fundação Serviços de Saúde Pública; 1986, 361-363.
 14. CONTIGIANI, M.S.; FERNÁNDEZ, C.; SPINSANTI, L.I.; DÍAZ, G.E. Prevalence of flavivirus antibodies in *Alouatta caraya* primate autochthonous of Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 60, p. 348-50, 2000.
 15. DEGIORGIS, M.P.; BERG, A.L.; HARD, A.F.; SEGERSTAD, C.; MÖRNER, T.; JOHANSSON, M.; BERG, M. Borna disease in a free-ranging Lynx (*Lynx lynx*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3087-3091, 2004.
 16. DE THOISY, B.; VOGEL, I; REYNES, J.M.; POULIQUEN, J.F.; CARME, B.; KAZANJI, M.; VIÉ, J.C. Health Evaluation of Translocated Free-Ranging Primates in French Guiana. **American Journal of Primatology**, v. 54, p. 1-16, 2001.
 17. DÍAZ, L.A.; ALMIRÓN, W.R.; ALMEIDA, F.L.; SPINSANTI, L.I; CONTIGIANI, M.S. Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincial de Córdoba, Argentina. **Entomología y Vectores**, v. 10, p. 551-66, 2003.
 18. DÍAZ, L.A.; RÉ, V.; ALMIRÓN, W.R.; FARÍAS, A.; VÁZQUEZ, A.; SANCHEZ-SECO, M.P.; AGUILAR, J.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; VISINTIN, A.; GARCÍA, J.; MORALES, M.A.; TENORIO, A.; CONTIGIANI, M. Genotype III, Saint Louis Encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1752-1754, 2006.

19. FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.
20. FUKUDA, K.; TAKAHASHI, K.; IWATA, Y.; MORI, N.; GONDA, K.; OGAWA, T. Immunological and PCR analyses for Borna Disease Virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 419-429, 2001.
21. HAYES, C. West Nile fever. In: MONATH T. (Ed). **Arboviruses: epidemiology and ecology**, Boca Raton: CRC, 1989, v. 59-88.
22. HERVÉ, J.P.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Arboviroses: aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas (Org.). **Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**, v. 1. Belém: Editora Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986, p. 409-437.
23. HOFF, G.L.; ISSEL, C.J.; TRAINER, D.O.; RICHARDS, S.H. Arbovirus serology in North Dakota mule and white-tailed deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 9, p. 291-295, 1973.
24. HORNING, M.; LIPKIN, I. Infectious and Immune factors in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: epidemiology, hypotheses and animal models. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review**, v. 7, p. 200-210, 2001.
25. HULL, B.P.; DOUG, D.; RODERICK, M.A.; BUTCHER, L.V.; TIKASINGH, E.S.; RACE, M.W.; JAMES, F.; SHAIMA, A. Laboratory diagnosis of yellow fever infections in humans, Alouatta monkeys and Haemagogus mosquitoes in Trinidad, 1978-1980. In: TIKASINGH, E.S. (Ed.). **Studies on the natural history of yellow fever in Trinidad**. Port of Spain, Caribbean Epidemiology Centre, 1991, p. 45-52.

26. ICTV. **Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, 2005.
27. IKUTA, K.; IBRAHIM, M.S.; KOBAYASHI, T.; TOMONAGA, K. Borna Disease Virus and Infection in Humans. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 470-495, 2002.
28. KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 3 ed., San Antonio: 1985.
29. LANCIOTTI, R.S.; ROHRIG, J.T.; DEUBEL, V.; SMITH, J.; PARKER, M.; STEELE, K.; CRISE, B.; VOLPE, K.E.; CRABTREE, M.B.; SCHERRET, J.H.; HALL, R.A.; MAC-KENZIE, J.S.; CROPP, C.B.; PANIGRAHY, B.; OSTLUND, E.; SCHMITT, B.; MALKINSON, M.; BANET, C.; WEISSMAN, J.; KOMAR, N.; SAVAGE, H.M.; STONE, W.; MCNAMARA, T.; GUBLER, D.J. Origin of the West Nile Virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, v. 286, p.2333–2337, 1999.
30. MITCHELL, C.J.; MONATH, T.P.; SABATTINI, M. Transmission of St. Louis encephalitis virus from Argentina by mosquitoes of the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex. **Journal of Medical Entomology**, v. 17, p.282-285, 1980.
31. MITCHELL, C.J.; MONATH, T.P.; SABATTINI, M.; CROOP, C.B.; DAFFNER, J.F.; CALISHER, C.H.; JACOB, W.L.; CHRISTENSEN, H.A. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, p. 945-955, 1985.
32. MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In FIELDS B.N., KNIPE D.M., HOWLEY P.M. (Eds.). **Fields Virology**, 3 ed., Lippincott: Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1996, p. 961–1034.

33. NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, H.; SHOYA, Y.; NAKAYA, T.; WATANABE, M.; TOMONAGA, K.; IWAHASHI, K. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4601-4611, 2000.
34. PLETNIKOV, M.V.; MORAN, T.H.; CARBONE, K.M. Borna disease virus Infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 593–D607, 2002.
35. RICHT, J.A.; PFEUFFER, I.; CHRIST, M.; FRESE, K.; BECHTER, K.; HERZOG, S. Borna disease virus infection in animal and man. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 343–352, 1997.
36. ROCCO, I.M.; SANTOS, C.L.; BISORDI, I.; PETRELLA, S.M.; PEREIRA, L.E.; SOUZA, R.P.; COIMBRA, T.L.; BESSA, T.A.; OSHIRO, F.M.; LIMA, L.B.; CERRONI, M.P.; MARTI, A.T.; BARBOSA, V.M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 281–285, 2005.
37. ROTT, R.; BECHT, H. Natural and experimental Borna disease in animals. Borna disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 190, p. 17-30, 1995.
38. SABATTINI, M.S.; MONATH, T.P.; MITCHELL, C.J.; DAFFNER, J.F.; BOWEN, G.S.; PAULI, R.; CONTIGIANI, M.S. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and description of study sites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, p. 937-944. 1985.
39. SABATTINI, M.S.; AVILÉS, G.; MONATH, T.F. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In: TRAVASSOS DA ROSA A.P.A., VASCONCELOS P.E.C., TRAVASSOS DA ROSA L.E.S. (Eds.). **Overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém, 1998, p. 113-114.

40. SCHNEIDER, P.A.; BRIESE, T.; ZIMMERMANN, W.; LUDWIG, H.; LIPKIN, I. Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. **Journal of Virology**, v. 68, p. 63–68, 1994.
41. SCHNEIDER, P.A.; KIM, R.; LIPKIN, W.I. Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. **Journal of Virology**, v. 71, 5614-5619, 1997.
42. SCHNEIDER, U.; SCHWEMMLE, M.; STAEHEL, P. Genome trimming: A unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 102, p. 3441–3446. 2005.
43. SOLIMAN, E.; GOTUZZO, N. St. **Louis Encephalitis**. Disponível em: <<https://secure.emedicine.com>>. Acesso em: 16 mar 2007. In: NETTLEMAN, M.; TALAVERA, F.; BRUSCH, J.L.; MYLONAKIS, E.; CUNHA, B.A. (Eds.). United Kingdom: ICRA.
44. SPINSANTI, L.I.; RE, V.E.; DIAZ, M.P.; CONTIGIANI, M.S. Age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Córdoba, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 59-62, 2002.
45. STITZ, L.; BILZER, T.; PLANZ, O. The Immunopathogenesis of Borna Disease Virus Infection. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 541-555, 2002.
46. TAIEB, O.; BALEYTE, J.M.; MAZET, P.; FILLET, A.M. Borna disease virus and psychiatry. **Euro Psychiatry**, v. 16, p. 03-10, 2001.
47. THEILER, M.; DOWNS W.G. **The arthropod-borne viruses of vertebrates**. New Haven, Yale University Press, 1973.
48. TOMONAGA, K. Virus-induced neurobehavioral disorders: mechanisms and implications. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, p. 71–77, 2004.

49. TORRES MAN, S.E.; ALMEIDA, M.A.B.; CRUZ, L.L.; SPERB, A.F. Vigilância da Febre Amarela Silvestre no Rio Grande do Sul. In: **Boletim Epidemiológico da SESA-RS do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2003, v. 6.
50. TURELL, M.J.; GUINN, M.O.; OLIVER, J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 413-414, 2000.
51. VAN ROOSMALEN, M.G.M.; VAN ROOSMALEN, T.; MITTERMEIER, R.A. A taxonomic review of the Titi monkeys, genus *Callicebus* (Thomas, 1903) with the description of two new species, *Callicebus benhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. **Neotropical Primates**, v. 10, p. 1-52, 2002.
52. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. *Ciência e Cultura*. **Brazilian Journal Association of Advanced Science**, v. 44, p. 117-24, 1992.
53. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G. Arboviruses pathogenic from man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Eds.). **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**, Instituto Evandro Chagas, Belém, 1998, p. 72–99.
54. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; MONTEIRO, H.A.O.; CRUZ, A.C.R.; BARROS, V.L.R.; SOUZA, M.R.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Yellow fever in Pará state, Amazon region of Brazil, 1998-1999: entomologic and epidemiologic findings. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 565-569, 2001.

55. VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DEGALLIER, N.; PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovirus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 465-76, 1991.
56. WATTS, D.M.; RAMIREZ, G.; CABEZAS, C.; WOOSTER, M.T.; CARRILLO, C.; CHUY, M.; GENTRAU, E.J.; HAYES, C.G. Arthropod-borne viral diseases in Peru. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Eds.). **An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries**, Instituto Evandro Chagas, Belém, 1998, p. 193–218.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de primatas não-humanos (PNH) de vida livre para estabelecimento de modelo de vigilância para Febre Amarela (FA), outras arboviroses e zoonoses de interesse à saúde pública.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e estudar grupos de PNH na região do alto rio Paraná (noroeste do PR e sudeste do MS);
- Capturar e identificar os diferentes espécimes de PNH na região do alto rio Paraná (noroeste do PR e sudeste do MS);
- Verificar a prevalência de anticorpos para FA, encefalite Saint Louis e outras arboviroses de interesse nos PNH capturados;
- Verificar ocorrência da doença por Borna vírus nos PNH capturados;
- Propor modelo de vigilância epidemiológica para FA, outras arboviroses e certas zoonoses de interesse.

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH) COMO INSTRUMENTO DE MONITORAMENTO DA FEBRE AMARELA (FA) SILVESTRE E OUTRAS ARBOVIROSES E ZOONOSES DE INTERESSE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Cadernos de Saúde Pública*

Vigilância de epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) como instrumento de monitoramento da Febre Amarela (FA) silvestre e outras arboviroses e zoonoses de interesse no Estado do Paraná, Brasil.

RESUMO

Epizootias em animais selvagens podem ser consideradas importantes indicadores para saúde pública, porém são pouco utilizadas em vigilância epidemiológica. A febre amarela, entre outras arboviroses, tem os primatas não humanos (PNH) como hospedeiros primários. A avaliação de PNH, como “animais sentinelas”, foi realizada através deste estudo na região do município de Porto Rico-PR, alto Rio Paraná, Brasil. Três espécies nativas de PNH: *Alouatta caraya* (n=47), *Cebus negritus* (n=74), *Cebus cay* (n=26) foram capturadas. Material biológico (sangue e soro) foi colhido para avaliar o perfil sanitário dos animais. Foi possível padronizar os procedimentos para realizar a vigilância de epizootias de forma rápida e ordenada. Quatro esquemas diferentes de trabalho de campo foram propostos: dois na forma passiva, no caso de já estar ocorrendo epizootias em PNH e dois na forma ativa, para monitorar epizootias de PNH em pontos estratégicos pré-estabelecidos. Este modelo de vigilância pode ser facilmente adotado e utilizado para qualquer espécie animal de interesse em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: Vigilância, epizootias, macacos, febre amarela, arboviroses.

ABSTRACT

Epizootics in wild animals can be considered important public health indicators, besides little used in epidemiological vigilance. Jungle yellow fever, between others arboviral zoonotic disease, has nonhuman primates (NHP) as primary hosts. The evaluation of NHP, like “sentinel animals”, was carried out through a focal study in Porto Rico County region, in the upper Paraná River. Three native species were captured as follows: *Alouatta caraya* (n=47),

Cebus nigritus (n=74), *Cebus cay* (n=26), which finished a total of 147 biological samples. Biological specimens (blood, serum, and others) were collected to evaluate sanitary conditions of animals. Using this approach it was possible to standardize a protocol to perform a quick and rational epizootic surveillance. Four different types of field work were proposed: two as passive surveillance protocols, during the occurrence of NHP epizootics and two active surveillance protocols, to further monitor the occurrence of NHP epizootics in pre-established strategic capture sites. Furthermore these NHP epizootic surveillance models can be easily adopted and used for any other animal species of interest to epidemiological studies.

Key words: Surveillance model, epizootics, monkeys, yellow fever, arboviruses.

INTRODUÇÃO

Os animais silvestres são importantes hospedeiros primários nos ciclos epidemiológicos de manutenção das diversas zoonoses. Considerando o meio ambiente e suas condições propícias para a manutenção de tais ciclos, inúmeros agentes etiológicos podem estar envolvidos em epizootias acometendo diferentes espécies animais, entre eles vírus, bactérias, protozoários, rickettsias, fungos e parasitas.

Algumas viroses destacam-se por suas características epidemiológicas e sendo os PNH animais altamente sensíveis às mesmas, torna-os “sentinela natural” para investigação de determinadas epizootias.

Entre os vírus que acometem PNH destacam-se os arbovírus (*arthropod-borne virus* – vírus transmitidos por artrópodes) que são vírus de animais vertebrados, cujos ciclos de transmissão implicam obrigatoriamente na replicação em hospedeiros artrópodes hematófagos como mosquito, flebótomo, maruim e carrapato. Os arbovírus apresentam distribuição geográfica extensa abrangendo todos os continentes com predomínio nos trópicos devido a maior biodiversidade (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 1996).

A maioria dos arbovírus está distribuída nas famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2001). Entre os 535 arbovírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus (KARABATSOS,1985), mais de 100 são patogênicos para o homem e destes em torno de 20 podem causar epidemias. Embora a região amazônica albergue o maior número de hospedeiros naturais de vários tipos de arbovírus endêmicos, as outras regiões do Brasil não são indenes. Epidemias urbanas, especialmente as causadas pelos vírus da dengue, FA, febre do Oropouche, Rocio, Saint Louis e outros vírus causadores de encefalites, podem ocorrer, constituindo risco à saúde para uma importante parcela da população.

A partir da epidemia de 2000, a FA silvestre se expandiu e atingiu os Estados da Bahia (BA), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), e em 2001 uma epizootia ocorreu no Estado do Rio Grande do Sul (RS) onde esta arbovirose não ocorria desde 1966. Até então, a ocorrência estava restrita às áreas endêmicas que incluíam as regiões Amazônica e Centro-Oeste e o Estado do Maranhão. A expansão geográfica da doença, na forma de epizootias e epidemias, acarreta maior risco à população que vive em áreas rurais assim como à reurbanização da doença (BRASIL, 2005; TORRES *et al.*, 2003).

Entre as epizootias que acometem PNH, a FA é a de maior importância, podendo dizimar bandos inteiros. Primatas dos gêneros *Alouatta* (bugios), *Callithrix* (sagüis) e *Ateles* (macaco-aranha) são muito sensíveis ao vírus da FA e apresentam taxa de letalidade elevada. Já, primatas do gênero *Cebus* (macacos-prego) infectam-se facilmente, mas apresentam menor taxa de letalidade e após a doença geralmente desenvolvem imunidade duradoura, talvez para o resto da vida (BRASIL, 2005). Desta forma, os primatas deste gênero tornam-se boas fontes de informações, atuando como “animais sentinelas naturais”, quando se realizam investigações soro epidemiológicas para verificar a circulação de agentes etiológicos no meio ambiente. Em 2001, nos municípios de Garruchos e Santo Antônio das Missões - RS

ocorreram epizootias de FA em PNH do gênero *Alouatta*. Exames laboratoriais confirmaram a FA como responsável pelo óbito de bandos inteiros destes animais (TORRES *et al.*, 2003). Entretanto, outras arboviroses e enfermidades sempre devem ser levadas em consideração quando da investigação de epizootias em PNH. Exemplos disso são os casos ocorridos nos municípios de Porto Rico – PR, em 2001, onde não foi possível realizar o diagnóstico laboratorial, apesar da morte de inúmeros animais, e de Natal – RN, em 2004, onde a FA (principal suspeita) nem diversas outras zoonoses não foram confirmadas como as responsáveis pelos óbitos dos animais, após realização de exames laboratoriais específicos.

PROPOSTA METODOLÓGICA PARA VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PNH NO ESTADO DO PARANÁ

Localização e características da região

A região do município de Porto Rico fica localizada no noroeste do Estado do Paraná, divisa com os municípios de Taquarussu e Bataiporã, Estado do Mato Grosso do Sul, a 230m de altitude, no Terceiro Planalto Paranaense, formação Arenito Caiuá. Esta região compreende o segmento entre a foz do Rio Paranapanema e a primeira ligação do Rio Ivinhema com o Rio Paraná (Figura 1). Em termos nacionais pertence à área de transição ou epizoótica da FA (Figura 2), e se caracteriza por possuir importante população de primatas.

As florestas encontradas na região são classificadas como Floresta Estacional semidecidual com formação submontana ocorrendo principalmente ao lado esquerdo do Rio Paraná e formação aluvial (florestas de inundação) principalmente nos diques marginais da margem direita e nas ilhas (Figura 3).

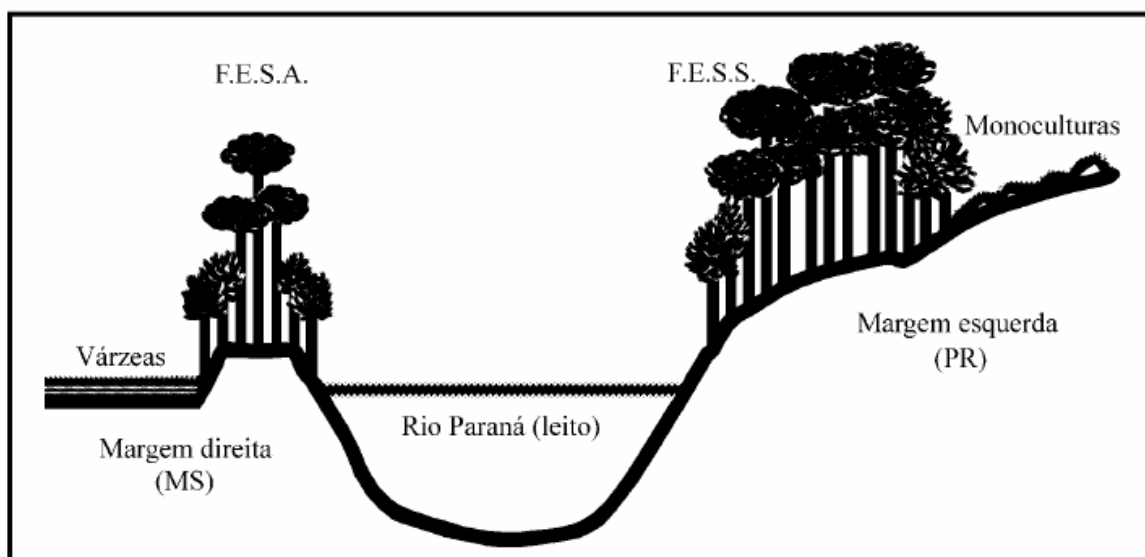


Figura 3 - Ilustração de um corte transversal da calha do Alto Rio Paraná na região de Porto Rico. F.E.S.A.: Floresta Estacional Semidecidual Aluvial; F.E.S.S.: Floresta Estacional Semidecidual Submontana.

Procedimentos de biossegurança

Proteção imunitária do pessoal envolvido

Foram realizadas vacinações e titulações sorológicas para FA, raiva, hepatites (A e B) e tétano.

Equipamentos de Proteção Individual (E.P.I.)

Foram utilizados os seguintes E.P.I., conforme necessidade: botas impermeáveis, aventais impermeáveis, aventais de laboratório, luvas de raspa de couro (contenção física manual dos animais), luvas de procedimento (colheita e processamento dos materiais biológicos), máscaras, óculos de procedimento, equipamentos para escalada (cordas especiais, aparatos para ascensão e descida das árvores para instalação das armadilhas) e equipamentos para comunicação de longo alcance.

Animais

Após o inventariamento da mastofauna da região, constatou-se a presença, entre outros mamíferos, de três espécies de primatas: *Alouatta caraya* (Figura 4), *Cebus nigritus* (Figura 5) e *Cebus cay* (Figura 6) (AGUIAR *et al.*, 2005; AGUIAR, 2006).



Figura 4. Exemplos de *Alouatta caraya*. Dimorfismo sexual: macho apresentando cor negra e fêmea cor castanho-amarelada. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)



Figura 5. *Cebus nigritus* (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 6. *Cebus cay* (Foto: MARCOS SHIOZAWA)

Captura dos animais

As capturas e os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA (licença nº, 104/04) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (registro nº 34/05). Foram capturados 147 PNH no período de junho de 2004 a abril de 2006, os quais foram distribuídos por espécie, sexo e faixa etária (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição por espécie, sexo e faixa etária¹ dos primatas não humanos (PNH) capturados durante o período de junho de 2004 a abril de 2006 na região do município de Porto Rico - Paraná.

ESPÉCIES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	FÊMEAS (F)				MACHOS (M)				Total (F, M)
	Infantil	Juvenil	Sub-adulto	Adulto	Infantil	Juvenil	Sub-adulto	Adulto	
<i>Alouatta caraya</i>	01	03	--	17	--	07	05	14	47 (F=21, M=26)
<i>Cebus nigritus</i>	--	06	02	15	05	20	04	22	74 (F=23, M=51)
<i>Cebus cay</i>	--	05	02	04	01	02	02	10	26 (F=11, M=15)
Total	01	14	04	36	06	29	11	46	147

1. A faixa etária foi classificada de acordo com o preconizado pelo Centro Nacional de Primatas (CENP) – Ananindeua – Pará.

Procedimentos utilizados para captura de PNH do Gênero *Alouatta*

Por serem animais predominantemente arborícolas e raro encontrá-los ao nível do solo, foram utilizadas armadilhas especialmente projetadas (Figuras 9 e 10) para capturá-los adotando metodologia utilizada por Aguiar *et al.* (2007).

Protocolo de captura:

- a) Acompanhamento dos animais para determinação das características do grupo (locais freqüentados, hábitos, número de indivíduos, entre outras) durante um determinado período que variou de alguns dias a algumas semanas;
- b) Montagem de plataforma nos locais mais freqüentados por esta espécie;
- c) Após a ceva inicial (Figura 7), utilizada como atrativo, instalou-se e armou-se a armadilha (Figuras 8, 9, 10 e 11);
- d) Os animais capturados foram tranqüilizados utilizando protocolo anestésico adaptado (HILST *et al.*, 2006a) (Figura 15), com o auxílio de zarabatana e dardos anestésicos (Figuras 12 e 13);
- e) Inicialmente os animais foram contidos utilizando-se luvas de raspa de couro e após completa sedação foram manipulados com luvas de procedimento.

Composição: basicamente mangas, bananas, laranjas e goiabas. Sabendo-se a preferência do grupo em questão por determinado alimento, pode-se optar pela utilização de somente um deles ou a combinação de dois ou mais, dependendo da disponibilidade.

Fornecimento:

- verificando o consumo da ceva, instalar a armadilha sobre a plataforma para que o grupo se ambientalize com a presença da mesma;
- continuar o fornecimento da ceva no interior da armadilha em dias alternados durante aproximadamente 3 semanas e diariamente na semana que precede a captura. O alimento que não foi consumido deve ser trocado por alimento novo.

Figura 7. Particularidades da ceva utilizada para capturas de primatas não humanos do gênero *Alouatta* (AGUIAR *et al.*, 2007).

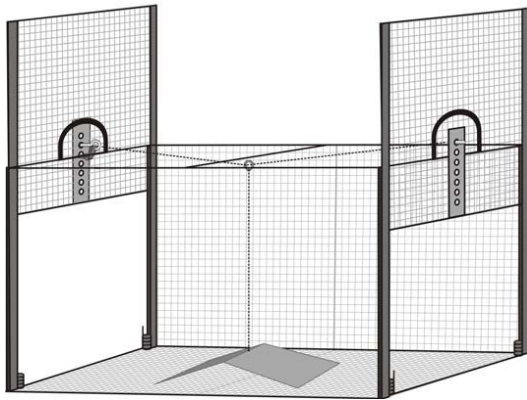


Figura 8. Modelo esquemático A de armadilha arbórea com duas entradas e portas tipo guilhotina, tamanho: 1,60 x 0,80 x 0,80m, armação de ferro e tela metálica com malha 2.7 x 2.7cm (AGUIAR *et al.*, 2007)

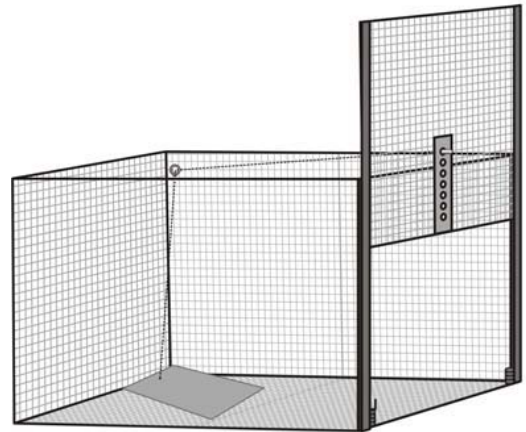


Figura 9. Modelo esquemático B de armadilha arbórea com uma entrada e porta tipo guilhotina, tamanho: 1,20 x 0,60 x 0,60m, armação de ferro e tela metálica com malha 2.7 x 2.7cm (AGUIAR *et al.*, 2007)



Figura 10. Seis bugios (fêmeas adultas e juvenis) capturados simultaneamente utilizando o modelo esquemático B de armadilha arbórea (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 11. Visualização de armadilha arbórea do modelo esquemático B devidamente instalada sobre plataforma em copa de árvore. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)



Figura 12. Processo de tranquilização pelo uso de zarabatana e dardos anestésicos, em copa de árvore. Note o observador na altura da armadilha arbórea auxiliado pelas técnicas de escalagem. (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 13. Dardos anestésicos de diferentes volumes, para utilização em zarabatana. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)

Procedimentos utilizados para captura de PNH do Gênero *Cebus*

Estes animais por serem predominantemente frugívoros e possuírem hábito de forrageio terrestre, podem ser capturados com armadilhas terrestres (Figura 16), especialmente projetadas para capturá-los adotando metodologia utilizada por Rocha *et al.*, (2007).

Protocolo de captura:

a) Acompanhamento dos animais para determinação das características do grupo (locais freqüentados, hábitos, número de indivíduos, entre outras) durante um determinado período que variou de alguns dias a algumas semanas;

b) Montagem de plataforma terrestre nos locais mais freqüentados por esta espécie (Figura 16). Foi dada preferência para áreas com dossel fechado e subosque limpo, locais no interior da mata onde era possível a visualização do grupo para com a ceva (Figura 17);

c) Após a ceva inicial (Figura 14), utilizada como atrativo, instalou-se e armou-se a armadilha;

d) Os animais capturados foram tranqüilizados utilizando protocolo anestésico adaptado (HILST *et al.*, 2006b) (Figura 15), com o auxílio de puçás, luvas de raspa de couro e seringas de 1 mL (Figura 18);

e) Inicialmente os animais foram contidos utilizando-se luvas de raspa de couro, após completa sedação, manipulados com luvas de procedimento.

Composição: mangas, bananas, laranjas, milho, cana-de-açúcar, ovos. Sabendo-se a preferência do grupo em questão por determinado alimento, pode-se optar pela utilização de somente um deles ou a combinação de dois ou mais, dependendo da disponibilidade.

Fornecimento:

- verificado o consumo da ceva, instalar a armadilha contendo a plataforma para que o grupo se ambientalize com a presença da mesma;
- continuar o fornecimento da ceva no interior da armadilha em dias alternados durante aproximadamente 3 semanas e diariamente na semana que precede a captura. O alimento que não foi consumido deve ser trocado por alimento novo.

Figura 14. Particularidades da ceva utilizada para capturas de primatas não humanos do gênero *Cebus* (ROCHA *et al.*, 2007).

O protocolo utilizado foi a base de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (1:2), sendo adaptado para as condições necessárias para os procedimentos realizados, sendo utilizadas as seguintes doses:

- 5,5 mg/Kg (IM) para o gênero *Alouatta* (HILST *et al.*, 2006a);
- 3,6 mg/Kg (IM) para o gênero *Cebus* (HILST *et al.*, 2006b).

Tanto a contenção química, quanto física inicial dos animais capturados foram realizadas dentro das próprias armadilhas.

Figura 15. Protocolo de sedação utilizado em primatas não humanos para procedimentos de rotina: colheita de material biológico e dados biométricos, aplicação de microchip, entre outros (HILST *et al.*, 2006a; HILST *et al.*, 2006b).

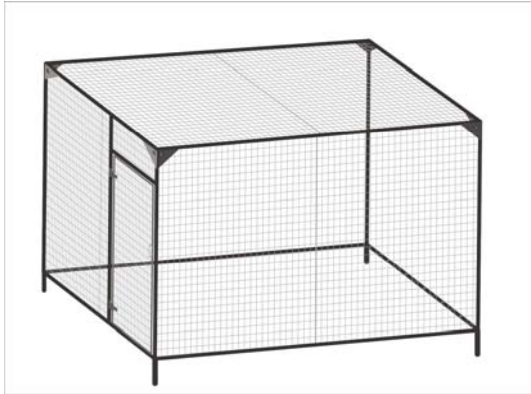


Figura 16. Modelo esquemático de armadilha térrea tipo gaiolão utilizada para a captura de *Cebus nigritus* no Estado do Paraná, tamanho: 2,0 x 2,0 x 3,0 m (ROCHA et al., 2007).



Figura 17. Visualização de armadilha térrea tipo gaiolão devidamente instalada em fragmento de mata com pequena plataforma para fornecimento de ceva. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)



Figura 18. Contenção física de macaco-prego (*Cebus nigritus*) com utilização de puçá, no interior da armadilha térrea. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)

Procedimentos com animais sedados

A manipulação dos animais e a colheita de materiais biológicos foi realizada utilizando luvas de procedimento, sobre mesa de trabalho a campo (tipo desmontável), forrada com plástico descartável. Para evitar a contaminação cruzada, após manipulação de cada animal, procedeu-se limpeza e desinfecção com produtos a base de amônia quaternária. Ao final dos procedimentos, descartou-se a forração em lixo hospitalar.

Após sedação completa do animal procedeu-se acompanhamento anestésico por meio do monitoramento da temperatura corporal (Figura 19) e das frequências cardíaca (Figura 20)

e respiratória. As mesmas foram anotadas em quadro próprio na ficha individual de PNH (Figura 21).



Figura 19. Aferição de temperatura corpórea em um exemplar de bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 20. Auscultação cardíaca de uma fêmea adulta de bugio (*Alouatta caraya*) durante monitoramento anestésico. (Foto: LUCIANO MALANSKI)

Colheita de dados (ficha individual de PNH)

A ficha individual de PNH (Figura 21) foi preenchida concomitantemente à realização dos procedimentos.

A) Dados relativos à localidade: município, localidade, endereço (quando houver), dados de GPS¹ (coordenadas e elevação), data, período/horário, temperatura ambiente².

B) Dados relativos ao animal capturado: número do “microchip” a ser aplicado, espécie, sexo, faixa etária, peso³ (Figura 22), dados do acompanhamento anestésico, estado físico geral (Figura 23) e dados biométricos, destacando-se: i) comprimento do corpo - da inserção da face externa do septo nasal com o lábio superior até a base da cauda (Figura 24); ii) comprimento da cauda (Figura 25); iii) perímetro do crânio (Figura 26); iv) perímetro da cabeça (Figura 27); v) comprimento do pé incluindo unha (Figura 28); vi) comprimento da mão incluindo unha (Figura 29); vii) comprimento de barba para bugios (Figura 30); viii)

¹ GPS (Global Positional System) Garmin, modelo E-Trex Venture.

² Termômetro analógico para aferição de temperatura ambiente.

³ Balança de precisão com capacidade de 20Kg, marca Pesola®.

comprimento de topete (macacos-pregos). Todas as mensurações foram realizadas com os animais tranqüilizados.

Devido à inexistência de dados relativos às populações de PNH do Estado do Paraná, com os dados biométricos obtidos foi possível realizar um levantamento prévio para cada espécie capturada na região do presente estudo (MALANSKI *et al.*, 2006; SHIOZAWA *et al.*, 2006; SVOBODA *et al.*, 2006).

ANIMAL/AMOSTRA Nº: _____		CHIP Nº: _____			
DATA: ___/___/___ período: () manhã () tarde () noite início: __: __h					
LOCAL CAPTURA: _____		GPS: _____			
() barranca () ilha () fragmento () outro: _____					
TIPO CAPTURA: () armadilha manual () armadilha automática () rifle					
início captura: __: __h		1º dardo: __: __h	2º dardo: __: __h		
início coleta: __: __h		término coleta: __: __h			
soltura: __: __h					
ESPÉCIE ANIMAL → peso (Kg): _____ sexo: () M () F					
() macaco-prego	() bugio	() quati	() gambá		
() cão	() gato	() outra: _____			
faixa etária: () adulto	() sub-adulto	() juvenil	() infantil		
se fêmea: () prenhe	() com cria(s): _____				
TRANQUILIZAÇÃO: () Zoletil® 50 () outro: _____					
dose inicial: _____ mL (__: __h)					
1º reforço: _____ mL (__: __h)		2º reforço: _____ mL (__: __h)			
COLETA DE AMOSTRAS:					
() SANGUE ----- qte. (mL): _____					
() SANGUE C/ EDTA - qte. (mL): _____					
() FEZES ----- qte.: () suficiente () escassa					
() PÊLO ----- qte.: () suficiente () escassa					
() ECTOPARASITAS (tipo/qte./local): _____					
() OUTROS: _____					
EXAME FÍSICO GERAL:					
HORA:	__: __h	__: __h	__: __h	__: __h	__: __h
T°C:					
F.C.:					
F.R.:					
MUCOSAS: () normais () pálidas () outra: _____					
PELAGEM: _____					
PRESENÇA ECTOPARASITAS (tipo/qte./local): _____					
DENTIÇÃO: _____					
OBSERVAÇÕES/ACIDENTES: _____					

EXAME BIOMÉTRICO:					
corpo(cm): _____		cauda(cm): _____		mão c/ unha(cm): _____	
crânio(cm): _____		cabeça(cm): _____		barba(cm): _____	
dentição: _____		Observações: _____			

Figura 21. Modelo de ficha individual de primatas não humanos para coleta de dados relativos ao animal e ao local de captura, utilizada para animais sadios, doentes ou mortos.



Figura 22. Pesagem de animal capturado em balança de precisão, devidamente sedado e colocado em saco tipo rede. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 23. Verificação de coloração de mucosas e dentição em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 24. Aferição do comprimento do corpo em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 25. Aferição do comprimento da cauda de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 26. Aferição do perímetro do crânio de um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 27. Aferição do perímetro da cabeça de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 28. Aferição do comprimento de pé (incluindo unha) de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 29. Aferição do comprimento de mão (incluindo unha) de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: LUCIANO MALANSKI)



Figura 30. Aferição do comprimento de barba de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: LUCIANO MALANSKI)

Aplicação do microchip (“transponder”) de identificação

O microchip e o seu aplicador, antes de cada uso, foram desinfetados por imersão em solução de álcool 70%. A aplicação foi realizada via subcutânea na região interescapular (Figura 31), após cada aplicação era procedida leitura de confirmação, com leitor específico (Figura 32).



Figura 31. Aplicação de microchip na região interescapular em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, adulto, devidamente tranqüilizado e contido. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 32. Leitura de microchip após aplicação na região interescapular em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)

Colheita de material biológico

A) Colheita de sangue e obtenção do soro:

A colheita de sangue foi realizada por meio de punção da veia femoral ou braquial, utilizando seringas e agulhas compatíveis com o porte do animal e calibre do vaso (Figuras 33 e 34). Antes da punção venosa procedeu-se anti-sepsia com álcool 70%, sendo colhidos de 2 a 6 mL de sangue para animais até 3 Kg e de 6-10mL para aqueles acima de 3 Kg.



Figura 33. Posicionamento do animal, realização do garrote e visualização da veia braquial em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 34. Punção da veia braquial para colheita de sangue em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranqüilizado e contido. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)

A amostra de sangue foi fracionada em três alíquotas:

- a) Duas em tubos plásticos tipo criogênico sem adição de anticoagulante, (0,5 a 1mL), identificados e congelados -196°C (Figura 35);
- b) Uma em tubo para obtenção do soro e do coágulo, centrifugado a $\pm 1.000\text{g}/10$ minutos (Figuras 36 e 37).

As alíquotas de sangue total, soro e coágulo, em duplicatas, foram armazenadas em freezer (-70°C) ou em nitrogênio líquido (-196°C) até o processamento (Figura 38).



Figura 35. Amostra em duplicata de sangue total, devidamente alíquotada em criotubos identificados, sendo congelados em nitrogênio líquido ainda a campo, utilizando-se garrafa térmica de boca larga em aço inoxidável. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 36. Tubos para obtenção de soro colocados na centrífuga em laboratório. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)

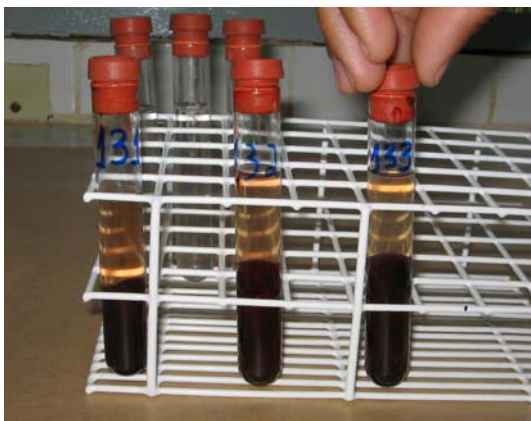


Figura 37. Tubos para obtenção de soro após centrifugação, prontos para a separação do soro. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 38. Alíquota de soro em tubo plástico tipo criogênico. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)

B) Colheita de fezes:

Foi realizado enema com solução fisiológica (10-20 mL) administrada com sonda retal (Figura 39). Após massagem abdominal foram colhidas as fezes em frasco apropriado (Figura 40). As amostras foram mantidas em refrigeração (caixa isotérmica com gelo reciclável ou geladeira) até o processamento.



Figura 39. Realização de enema retal de um bugio (*Alouatta caraya*), fêmea, adulto, devidamente tranquilizado (Foto: MARCOS SHIOZAWA).



Figura 40. Realização de massagem abdominal para facilitar eliminação final de fezes após enema retal em um bugio (*Alouatta caraya*), macho, sub-adulto, devidamente tranquilizado. (Foto: MARCOS SHIOZAWA)

C) Colheita de pêlos e ectoparasitas:

Foram colhidos pêlos de diversas regiões do corpo por retirada manual (arrancados). Em caso de suspeita de doenças na pele e/ou presença de ectoparasitas, foi procedido raspado de pele profundo e colhido ectoparasitas. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos apropriados, identificadas e mantidas em temperatura ambiente até análise.

Término dos procedimentos, acompanhamento e soltura dos animais

Os animais foram marcados por tricotomia em torno do pulso direito facilitando a distinção em relação ao restante do grupo, evitando-se recapturas (Figura 41).

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas em ambiente arejado, cobertas com lona e afastadas de fatores estressantes e monitorados até o completo retorno anestésico. (Figura 42). Após completo retorno anestésico, a gaiola era levada ao local de captura e o

animal posto em liberdade ao nível do solo. A soltura era realizada à luz do dia, com algumas horas de intervalo antes do anoitecer, favorecendo o retorno ao grupo, para diminuir a ação de predadores noturnos.



Figura 41. Realização de tricotomia em torno do pulso direito em macaco-prego (*Cebus nigritus*), macho, adulto, após término dos procedimentos. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)



Figura 42. Animal capturado, macaco-prego (*Cebus nigritus*), em processo de recuperação anestésica, após término dos procedimentos. Note que a gaiola está sendo coberta com lona, em local apropriado. (Foto: JOSÉ CARLOS LEITE JR)

PROPOSTAS PARA A VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PNH NO ESTADO DO PARANÁ

Para operacionalizar a vigilância de epizootias em PNH de forma rápida e ordenada no Estado, foram propostos quatro esquemas de trabalho a campo. Dois na **forma passiva**, ou seja, quando estiverem ocorrendo casos de epizootias em PNH, e dois na **forma ativa**, visando monitorar prospectiva e constantemente pontos estrategicamente localizados no território paranaense.

Vigilância de epizootias em PNH na forma passiva

Ocorrendo epizootias em PNH: (Figura 43) com médico veterinário presente devidamente treinado vinculado a um órgão público (Secretaria Municipal de Saúde, Regional

de Saúde ou do próprio nível central da SESA-PR); (Figura 44) quando não houver um médico veterinário.

Vigilância de epizootias em PNH de forma ativa

Os procedimentos adotados nesta vigilância seguem basicamente os preconizados na forma passiva (Figuras 43 e 44) excetuando-se o fato de que esteja(m) ocorrendo epizootia(s) em PNH. Para a realização desta vigilância foram propostos dois esquemas que visam à seleção de locais estratégicos no Estado. A seleção destes locais deve ser baseada em função de aspectos geográficos e ecológicos que favoreçam a entrada, permanência e circulação de algum agente etiológico.

O primeiro esquema: colheitas periódicas de materiais biológicos de PNH mantidos em cativeiro em parques zoológicos, criatórios públicos e privados, etc. existentes em todo o território do Estado. Um rastreamento completo destes criatórios deve ser realizado para que seja viabilizada esta vigilância de forma contínua.

O segundo esquema: estabelecer pontos de capturas permanentes em locais que possuam florestas naturais com populações símias significativas. Para o território paranaense, pelo menos dois pontos serão colocados na região norte, próximos ao rio Paranapanema (divisor geográfico dos Estados do Paraná e São Paulo); dois ou mais pontos na região oeste, próximos ao rio Paraná (divisor geográfico dos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul), sendo um deles situado na própria região onde foi realizado este estudo; e dois ou mais pontos na região litorânea, próximos a Serra do Mar e ao município de Guaraqueçaba, por possuírem extensas áreas de conservação ambiental e, portanto, grande população de PNH.

A vigilância de epizootias de forma ativa permite identificar precocemente a existência ou não da circulação de algum agente etiológico de interesse à saúde pública em populações

símias em locais estratégicos, podendo ser alcançado o planejamento de ações preventivas de saúde.

Diagnóstico laboratorial

Para atender a demanda de análise das amostras biológicas ou o exame de animais capturados a campo, foram instituídos laboratórios de referência, para o diagnóstico das principais zoonoses de interesse em saúde pública (Figuras 43 e 44), localizados na região centro-norte, sendo considerado local estratégico, para o envio das amostras no Estado do Paraná. Desta forma o pronto diagnóstico, permitirá planejar e estabelecer as ações de saúde no momento em que epizootias estejam ocorrendo, transformando-as em fontes importantes no processo de investigação epidemiológica.

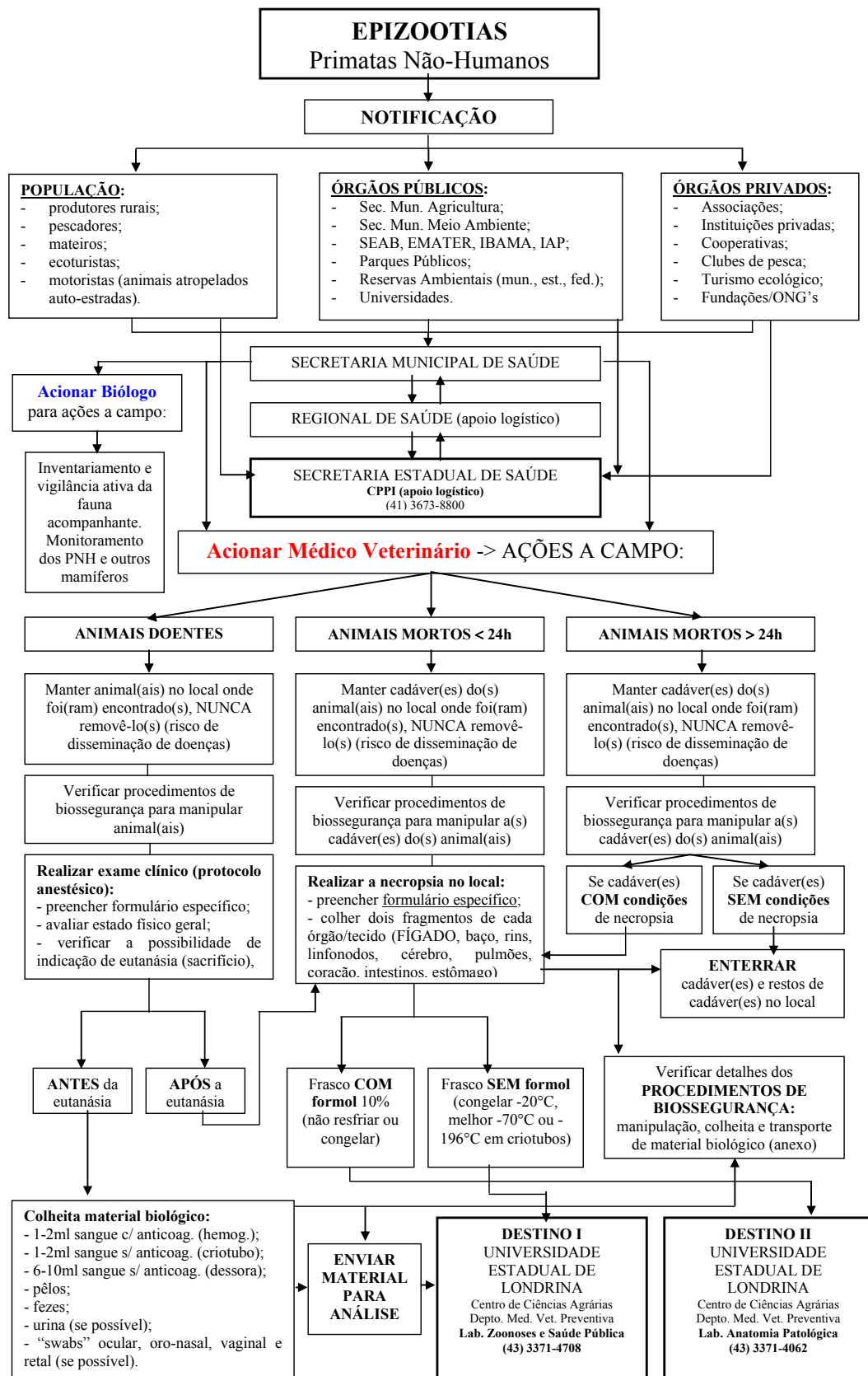


Figura 43. Organograma da Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos com a presença do Médico Veterinário, para realização das ações a campo, Estado do Paraná.

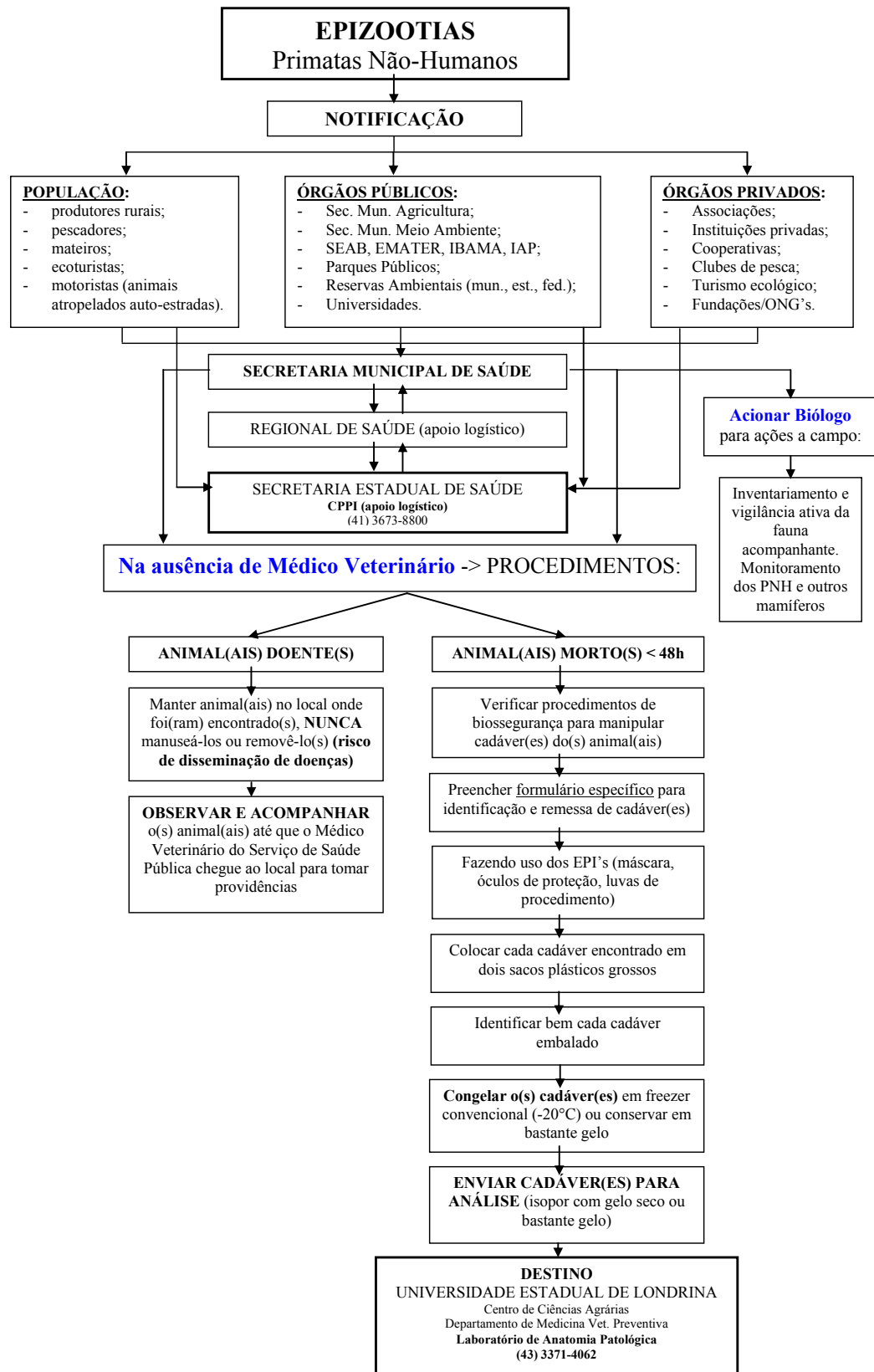


Figura 44. Organograma da Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos na ausência do Médico Veterinário, para realização das ações a campo, Estado do Paraná.

DISCUSSÃO

A necessidade de estudos eco-epidemiológicos mais amplos de algumas enfermidades é de fundamental importância, tendo em vista a emergência e re-emergência de doenças em locais onde exista proximidade com áreas de mata, onde a circulação e manutenção de alguns patógenos são favorecidas pelas condições ambientais ali encontradas, como aspectos geográficos, clima, vegetação e fauna residente. Considerando essa necessidade, a vigilância epidemiológica da FA constituída basicamente pela vigilância de casos humanos e entomológicos, está sendo reformulada com a utilização da vigilância de epizootias em PNH, pois esta última pode ser considerada um importante instrumento para vigilância epidemiológica prospectiva da FA.

Apesar da importância e necessidade da vigilância de epizootias em PNH, até o momento não há um modelo sistematizado. O Ministério da Saúde (MS) vem incentivando a utilização de metodologias que contemplem a vigilância de epizootias em PNH frente as graves lacunas encontradas em investigações epidemiológicas do passado. Desta maneira, este Ministério iniciou um trabalho de sensibilização envolvendo as Secretarias Estaduais de Saúde por meio de cursos de capacitação colocando as premissas básicas para a realização de uma vigilância de epizootias de forma passiva e centralizada. Desde então, a vigilância de epizootias em PNH começou a ser considerada quando do planejamento das ações de saúde pelas autarquias estaduais. Desta forma alguns Estados, tentando capacitar seus técnicos em vigilância de epizootias em PNH, têm encontrado dificuldade em estabelecer um modelo para a mesma.

Por outro lado, em virtude da ocorrência de epizootias em PNH, os Estados do Paraná e Rio Grande do Sul se anteciparam na criação de modelos de vigilância. Diferentemente do Estado do Paraná que vem adotando a metodologia de captura por armadilhas, com um esquema de vigilância ativa com pontos estratégicos de captura pré-determinados, o Estado do

Rio Grande do Sul utiliza captura com rifles e dardos anestésicos (TORRES *et al.*, 2003). É importante ressaltar que ambas as metodologias podem ser aplicadas dependendo das condições técnicas e naturais encontradas.

A aplicação do modelo proposto neste trabalho, na realidade territorial e biológica do Estado do Paraná, visa basicamente conhecer a população de PNH, identificar os patógenos circulantes, por meio de diagnóstico laboratorial e estabelecer e sistematizar ações de campo, tanto na forma ativa quanto passiva de monitoramento. Esse modelo, “animais sentinelas naturais”, pode ser utilizado em qualquer ecossistema, servindo ainda de base para a investigação e o controle de outras endemias de interesse em saúde pública onde os PNH e/ou outros animais silvestres possam estar envolvidos.

O diagnóstico das arboviroses, centralizado no Instituto Evandro Chagas – IEC (Belém-PA) tem dificultado o envio das amostras e o retorno dos resultados, pela distância e sobrecarga de serviço. Desta forma, a Secretaria Estadual de Saúde do Paraná para estabelecer o pronto-diagnóstico em amostras biológicas de PNH colhidas a campo, descentralizou a rotina de atendimento através de convênio com laboratórios da Universidade Estadual de Londrina (UEL), que estão atuando com o apoio do IEC.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As atividades de campo permitiram capturar os PNH dentro do seu ecossistema, bem como estudar sua biologia e obter espécimes biológicos para diagnóstico específico dos principais patógenos que circulam entre eles. As pesquisas desenvolvidas e os resultados obtidos deram suporte para a elaboração do modelo vigilância de epizootias em PNH, proposto neste trabalho e adotado pela Secretaria Estadual de Saúde do Paraná.

Este modelo de vigilância faz parte de um trabalho inédito realizado na Região Sul do Brasil para o monitoramento da FA e outras arboviroses e zoonoses de interesse em saúde pública em PNH e outras espécies animais.

A implantação da metodologia proposta deve ser realizada por equipe multidisciplinar constituída por médicos veterinários, biólogos, médicos, entre outros técnicos, e interinstitucional com a participação da Secretaria de Saúde, como órgão executor, e de Universidades e Instituições de referência nas áreas de saúde pública (MS, IEC), ambiental (IBAMA, IAP) e de agricultura (SEAB, EMATER).

REFERÊNCIAS

Aguiar LM, Ludwig G, Svoboda WK, Silva LR, Colhera EC, Passos FC, et al. Ocorrência e georreferenciamento de primatas em ilhas e matas de galeria do Alto Rio Paraná. In: XI Congresso Brasileiro de Primatologia, 2005, Porto Alegre. Programa e livro de resumos - Desafios para a conservação em paisagens fragmentadas. Porto Alegre: FaBioPUCRS, 2005. p. 64-64.

Aguiar LM. Os primatas do corredor do Alto Rio Paraná (Região de Porto Rico, Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul): ocorrência, georreferenciamento e parâmetros populacionais. [Dissertação – Mestrado em Zoologia]. Paraná: Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná; 2006.

Aguiar LM, Ludwig G, Svoboda WK, Teixeira GM, Hilst CLS, Shiozawa MM, et al. Use of Traps to Capture Black and Gold Howlers (*Alouatta caraya*) in the Islands of the Upper Paraná River, Southern Brazil. Am J Prim 2007; 69:241-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos. Brasília: MS; 2005.

Hilst CLS, Svoboda WK, Spohr KAH, Malanski LS, Shiozawa MM, Aguiar LM, et al. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas da espécie *Alouatta caraya*. In: Anais do XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa. Vitória; 2006a. p. 92-3.

Hilst CLS, Spohr KAH, Svoboda WK, Shiozawa MM, Malanski LS, Aguiar LM, et al. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas do gênero *Cebus*. In: Anais do XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa. Vitória; 2006b. p.92.

Karabatsos N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.

Malanski LS, Svoboda WK, Hilst CLS, Shiozawa MM, Aguiar LM, Ludwig G. et al. Dados biométricos de *Cebus nigrinus* de vida livre da região do município de Porto Rico-PR. [CD-ROM]. In: Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. Londrina; 2006.

Rocha VJ, Aguiar LM, Ludwig G, Hilst CLS, Teixeira GM, Svoboda WK, et al. Techniques and trap models for capturing wild tufted capuchins. Int J Prim 2007; 28 Suppl 1: 231-43.

Siqueira-Batista R, Gomes AP, Igreja RP, Huggins DW. Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: Siqueira-Batista R, Gomes AP, Igreja RP, Huggins DW,

organizadores. Medicina Tropical. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica; 2001. vol. 2. p.621-9.

Shiozawa MM, Hilst CLS, Svoboda WK, Malanski LS, Aguiar LM, Ludwig G. Dados biométricos de *Cebus cay* de vida livre de matas ciliares do rio Baia, região do município de Taquarussu-MS. [CD-ROM]. In: Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. Londrina; 2006.

Svoboda WK, Malanski LS, Shiozawa MM, Hilst CLS, Ludwig G, Aguiar LM et al. Dados biométricos de *Alouatta caraya* de vida livre de ilhas do alto rio Paraná, região do município de Porto Rico-PR. [CD-ROM]. In: Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. Londrina; 2006.

Torres MAN, Santos E, Almeida MAB, Cruz LL, Sperb AF. Vigilância da Febre Amarela Silvestre no Rio Grande do Sul. In: Boletim Epidemiológico da SESA-RS do Estado do Rio Grande do Sul (v. 6, n.5). Porto Alegre; 2003.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa AA, Pinheiro FP. Arboviroses. In: Veronesi R, Focaccia R, organizadores. Tratado de infectologia. São Paulo: Editora Atheneu; 1996. p. 169-180.

**3.2. SEROLOGIC EVIDENCE OF SAINT LOUIS ENCEPHALITIS VIRUS
WIDESPREAD IN FREE-RANGING NEW WORLD MONKEYS AND FARM
HORSES IN THE UPPER PARANÁ RIVER BASIN REGION, BRAZIL**

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Emerging Infectious Diseases*

Serologic evidence of Saint Louis encephalitis virus widespread in free-ranging New World monkeys and farm horses in the upper Paraná River basin region, Brazil.

Abstract

The main Saint Louis encephalitis virus (SLEV) reservoirs include wild birds and fowls and its transmission is done by mosquitoes. One hundred thirty-three monkeys were trapped at the Paraná River basin region. The captured period was between June/04 and December/05. Besides, 23 blood samples of farm horses were obtained. All samples were submitted to Hemagglutination Inhibition (HI). Positive monkey samples were further submitted to Mouse Neutralization Test (MNT). All blood samples were inoculated in C6/36 cell culture. Serum prevalence for SLEV antibodies was 11.62% (*A. caraya*), 12.50% (*C. nigritus*), 30.77% (*C. cay*). From these, 2.32% (*A. caraya*), 6.25% (*C. nigritus*) and 15.38% (*C. cay*) were confirmed by MNT. For farm horses the seroprevalence for SLEV antibodies by HI test was 39,13% (9/23). Prevalence was higher to female horses (57.14%; 4/7) than male ones (31.25%; 5/16). No association was established with studied characteristics. No arbovirus was isolated of all blood samples inoculated in cell culture. The study tried to establish some relation between these animals and the disease.

Key-words: Saint Louis encephalitis, SLEV, monkeys, horses, arboviruses.

Introduction

The Saint Louis encephalitis virus (SLEV) belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, which consists of nearly 70 virus species and subspecies distributed worldwide (ICTV, 2005). Flaviviruses are small, enveloped, single-stranded positive sense RNA viruses (Monath & Heinz, 1996) and include some virus species associated with important human disease syndromes, such as febrile illness, hemorrhagic fever and encephalitis (Hayes, 1989). Mostly flaviviruses are transmitted among susceptible vertebrates by hematophagous arthropods especially mosquito (ICTV, 2005; Turell et al., 2000).

To date, eleven flaviviruses have been recognized in Brazil: Bussuquara, Cacipacore, Dengue (serotypes 1, 2, 3, and 4), Iguape, Ilhéus, Rocio, Saint Louis encephalitis, and yellow fever (Figueiredo, 2000). An additional isolate of Naranjal-like virus in Amazon region have recently elevated to twelve the number of flaviviruses isolated in Brazil (Vasconcelos PFC, personal communication, 2007).

Wild birds and domestic fowl have been recognized as the main SLEV vertebrate hosts. SLEV is transmitted to humans principally by *Culex* mosquitoes such as *Culex tarsalis*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* in North and Central America, and in Argentina (Mitchell *et al.*, 1980), and *Culex declarator* and *Culex coronator* in Amazon basin in South America (Vasconcelos *et al.*, 1991; Vasconcelos *et al.*, 1992).

In Brazil, SLEV was first isolated in the 1960's from a pool of mosquitoes (*Sabethes belisarioi*) captured on the Belém - Brasília Highway (Theiler & Downs, 1973). Since then, several dozens of other isolates of SLEV were obtained from wild birds and sylvan mosquitoes, while only two isolates were recovered from humans in Amazon, and both of them without neurological symptoms (Vasconcelos *et al.*, 1992). SLEV isolates were also reported in the Ribeira Valley in Atlantic coast forests, São Paulo state – Brazil, including a human isolate (Rocco *et al.*, 2005), in Argentina (Sabatini *et al.*, 1998) and in Peru (Watts *et al.*, 1998). Recently, it was described a small outbreak of SLEV in the Cordoba city region, Argentina (Diaz *et al.*, 2006).

The clinical manifestations of SLEV infection range from mild flu-like symptoms to fatal encephalitis (Mitchell *et al.*, 1980). Like several other flaviviruses, SLEV exhibit neurotropism, but its specific neurotropic mechanism allowing to get central nervous system (CNS) has not been established yet (Soliman & Gotuzzo, 2004).

In Northern and Southeastern Brazil, approximately 5% of human populations surveyed have specific HI antibodies to SLEV, a lot of them confirmed by mouse

neutralization tests (MNT) and or IgG/IgM ELISA. From one side, the results from HI should be interpreted carefully due to antibody cross-reactivity among different flaviviruses, especially in dengue endemic areas and where population is frequently vaccinated against yellow fever. From the other side, SLEV may be circulating in these areas and infecting humans, but many infections are missed (Figueiredo, 2000, Vasconcelos et al., 1998).

Previous serological investigations in wildlife are very scarce in literature. However, SLEV antibodies were detected in white-tailed deers from New York, North Dakota, Texas, Wisconsin and Wyoming (Hoff et al., 1973). SLEV had also been isolated in Brazilian wildlife, with positive wild and sentinel animals and lots of arthropods from Amazon region and São Paulo State (Vasconcelos et al., 1992; Vasconcelos et al., 1998). In fact, at least three epizootics of SLEV among nonhuman primates including two of them in sentinel *Cebus* monkeys have been described in the Brazilian Amazon region (Vasconcelos et al., 1992).

In French Guiana were evaluated 140 serum samples from three species of translocated free-ranging primates: *Alouatta seniculus* (n=97), *Pithecia pithecia* (n=05) and *Saguinus midas* (n=38), attempt of virus isolation from these animals samples were negative. Although, specific HI antibodies were detected to YFV in 33.57% (47/140), Mayaro virus in 79.28% (111/140), DENV-2 in 11.43% (16/140), and SLEV in 14.28% (20/140) (De Thoisy et al., 2001). As SLEV antibodies titers were low (HI titers <40) and that ones to YFV were very high (>320) in the same sera, positive SLEV results should be interpreted as cross-reactions.

In this study we report the major findings regarding a serologic investigation of SLEV in free-ranging New World monkeys and farm horses.

Materials and Methods

Site of study

All animals used in this study were trap captured in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, upper Paraná River, Brazil (Figure 1), in islands and sub-tropical forest reserves (where animals were captured), protected by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). For this study, four islands were chosen: Mutum, Porto Rico, Gaivota, and Japonesa, besides the forests of Paraná River basin localized in that region. Porto Rico County is located in Northwestern Paraná State at 22°46'20"S latitude and 53°16'01"W-GR longitude. The average annual temperature in this area ranges from 16 and 29°C.

Animals

Monkeys

One hundred thirty-three nonhuman primates were captured (43 *Alouatta caraya* [black and golden howler monkey], 64 *Cebus nigritus* and 26 *Cebus cay* [both called capuchin monkeys]) (Table 1), as described elsewhere (Rocha *et al.*, 2007 and Aguiar *et al.*, 2007). The captured period was between June/04 and December/05. A group composed of biologists and veterinarians was responsible for capturing the monkeys, who had an IBAMA license (number 104/04) to do it. Besides, the study was approved by Animal Experimental Ethics Committee of Londrina State University (register nº 34/05). Animals were anesthetized with Zoletil® (Hilst *et al.*, 2006a, Hilst *et al.*, 2006b). Next, blood samples were obtained by jugular or brachial venipuncture, and serum samples were clarified by centrifuge ($\pm 1,000$ g) and stored at -196°C until tested. After that, biological and clinical parameters (data not shown) of the animals were evaluated, subcutaneous transponder applied (in inter scapular

region) for future control. Release of trapped animals, after complete recovery, was made in the same local where they were captured.

All captured monkeys had strictly forest habits. However, some *Cebus nigratus* specimens (n=13) were trapped in a forest reserve (in Paraná River basin) near a farm whose owner reported to occur frequent contact with some monkeys.

Horses

Twenty-three blood samples of farm horses were obtained by jugular venipuncture. The farm was situated nearby a place where *Cebus cay* monkeys were captured. Then, serum samples were also obtained and stored at -196C as above. All horses were adults and without defined breed. The horses' herd was composed of 16 males and 7 females.

Serological Assays

All serological assays were performed at the Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers at Instituto Evandro Chagas (IEC) in Belém, Par state, Brazil. All samples were stored in dry ice before shipping by airplane to Belém.

Hemagglutination Inhibition Test (HI)

All samples were initially submitted to microplate hemagglutination inhibition tests (Shope and Sather, 1979) against a panel standardized antigens from 19 types of arbovirus, including four from genus *Alphavirus* (Eastern Equine Encephalomyelitis, Western Equine Encephalomyelitis, Mayaro, and Mucambo), six from genus *Flavivirus* (Yellow Fever, Saint Louis encephalitis, Rocio, Ilhéus, Cacipacor and Bussuquara), eight from genus *Orthobunyavirus* (Oropouche, Caraparu, Cat, Guaroa, Maguari, Tacaiuma, Utinga and Belém) and one from genus *Phlebovirus* (Icoaraci).

Mouse Neutralization Test (MNT)

All positive monkey sera showing HI titer >20 were submitted to MNT, as confirmatory test and to characterize the virus responsible by infection. The protocol used was

that one as described by Shope and Sather (1979). The results were calculated by neutralization logarithmic index (NLI), as previously described (Reed & Muench, 1938). None horses' sera were tested by MNT.

Attempts of virus isolation

All blood samples were inoculated into *Aedes albopictus* cell culture (clone C6/36) and immunofluorescence was used to viral identification, as described elsewhere (Beatty *et al.*, 1989).

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed using Chi-square and Fisher exact tests to establish differences among the characteristics studied. Associations were determined by odds ratios (OR) at a 95% confidence level. Results were considered statistically significant when ρ -value was ≤ 0.05 .

Results

None arbovirus was isolated of all 133-monkey serum samples. Although, when they were submitted to serologic tests, only SLEV antibodies were detected by HI and confirmed by MNT (Table 2, Figure 2). A total of 21 monkey samples showed HI titers to SLEV ranging from 20 to 640 (Table 2).

Serum prevalence for SLEV antibodies in monkeys by HI test was 11.62% (5/43) to *A. caraya*, 12.50% (8/64) to *C. nigrinus*, 30.77% (8/26) to *C. cay*. From these, 2.32% (1/43) to *A. caraya*, 6.25% (4/64) to *C. nigrinus* and 15.38% (4/26) to *C. cay* were confirmed by MNT (Table 3)

Association of the results obtained with characteristics studied (species, sex, age and horse presence in the same habitat) are summarized in Table 3. Prevalence was higher to *C. cay* monkeys (15.38%) than to *C. nigrinus* (6.25%) and *A. caraya* (2.32%). Female animals had higher prevalence (8%) than male ones (6%). Interesting, infant and juvenile animals

showed absence of HI antibodies to SLEV, while the prevalence of SLEV antibodies to sub-adult and adult was 13.33% and 9.21%, respectively. Primates that live near farm horse herd have higher antibody prevalence (15.38%) than those living without this condition (4.67%). However, there were not any statistical differences among species ($p = 0.1090$), sex ($p = 0.7281$), age ($p = 0.1876$), and horse presence in the same habitat ($p = 0.0727$).

No arbovirus was isolated of all 23-horse blood samples, but as previously observed to monkeys, by HI, specific antibodies were only found to SLEV. Seroprevalence for SLEV antibodies by HI test was 39.13% (9/23). Prevalence was higher to female animals (57.14%; 4/7) than male ones (31.25%; 5/16). The titers distribution was 160 (3 males and 2 females), 320 (1 male and 1 female) and 640 (1 male and 1 female). However, significant statistical difference was not observed by sex [$p=0.3630$; OR = 0.34 (0.04 < OR < 2.91)]. No HI results were confirmed by MNT.

Discussion

Conventional flavivirus serologic diagnosis is based on the presence of virus-specific antibodies in the serum (Scaramozzino et al., 2001). Classical HI and MNT have been used for this purpose. HI is relatively simple and inexpensive technique used to access antibody responses following vaccination or natural infection by arbovirus including SLEV (Soliman & Gotuzzo, 2004).

SLEV has been commonly described in the USA where it is frequently responsible for limited human encephalitis epidemics (Soliman & Gotuzzo, 2004). The occurrence of this arboviral disease in Brazil shows quite different characteristics. One of them is an occurrence of very few human cases of encephalitis (Figueiredo *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 2001). One can speculate that this is possibly due to specific environmental and biological factors found in Brazil which changed its virulence or pathogenicity to humans. However, few studies were carried out in order to describe truly what factors play a role in this phenomenon, but at least

two factors should be associated. First, the endemicity of other related flaviviruses that elicits cross protection such is the case of dengue and the vaccination to yellow fever; and second, a deficiency to recognize and or to diagnosis of encephalitis in both public and private health services. Comparing the disease behavior in Brazil with the USA situation, besides differences in the environmental and biological conditions, it is observed that in USA there are more facility and access to diagnostic services. These facts could partially explain the differences between the disease expression and epidemiology among these countries.

Differently of the De Thoisy *et al.* (2001) that found antibodies in low titers to SLEV (HI titers <40) and very high antibodies titers to yellow fever (HI titers >320) to free-ranging monkeys, suggesting that SLEV antibodies should result of cross-reactions with yellow fever, the present study showed absence of HI antibodies to yellow fever in the monkey samples, for several of them the absence was confirmed by MNT.

In Argentina several SLEV studies were made focusing basically mosquitoes and human populations (Sabattini *et al.*, 1985; Mitchell *et al.*, 1985; Sabattini *et al.*, 1998; Spinsanti *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2006), but none of them showed the importance of monkeys and horses in the sylvatic SLEV cycle. In the present study, was established, based on serologic results, a participation of these animals in the maintenance cycle of SLEV. Previously, it was observed in an area influenced by a hydroelectric dam in Tucuruí, Pará state, the occurrence of specific SLEV antibodies (HI) in nonhuman primates in Brazilian Amazon region (Dégallier *et al.*, 1992), but this is the first time in an area outside Amazon basin.

Domestic equines are commonly found in the region where collection of samples were done, mainly in farms near forest regions, and the relationship of SLEV antibodies in these animals should be considered. Again, previously it has been found high prevalence of SLEV antibodies among horses in Amazon and in Pantanal region (Iversson *et al.*, 1992;

Vasconcelos et al., 2005), but now this was obtained for the first time in southern Brazil in an ecosystem very far and quite different from Amazon and Pantanal. Therefore, these animals have played a role as vertebrate hosts and, probably should be considered as amplifier source of SLEV to primates or vice-versa. Nevertheless, this needs further investigation.

In conclusion, this is the first report of seroprevalence of specific SLEV antibodies in wild monkeys at Paraná State, Southern Brazil, and incriminates nonhuman primates in the natural maintenance cycle of SLEV in Southern Cone region, where recently an SLEV encephalitis outbreak was recognized in Northern Argentina (Diaz et al., 2006). The next research step will be conducting a study involving collection of local mosquitoes and human population to try establishing their roles in the SLEV life cycles.

Biographical stretch

Walfrido Kühl Svoboda DVM, MSc, PhD, is Professor at Paraná Federal University (UFPR) – Palotina *Campus*, Palotina County, Paraná State, Brazil. His research interest is on the epidemiology of zoonotic diseases focusing the public health, environment and sanitary aspects of them.

Acknowledgements

The authors wish to thank Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA-PR), Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI-PR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for granting the necessary financial support. Mr. Basílio S. Buna, Geraldo M. da Silva and Luiz R. O. Costa, Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers of the Instituto Evandro Chagas (Belém-Brazil) for performing serologic tests. Entomology Team of SESA-PR (Porto Rico-PR) for giving technical support to collected samples. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos

Naturais Renováveis (IBAMA) for giving them permission to capture animals for this experiment (license number 104/04).

References

1. Aguiar LM, Ludwig G, Svoboda WK, Teixeira GM, Hilst CLS, Shiozawa MM, et al. Use of traps to capture black and gold howlers (*Alouatta caraya*) on the Islands of the upper Paraná River, Southern Brazil. *Am J Primatol.* 2007;69: 241-47.
2. Batista WC, Kashima S, Marques AC, Figueiredo LTM. Phylogenetic analysis of Brazilian Flavivirus using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non-coding regions. *Virus Res.* 2001;75:35-42.
3. Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE. Arboviruses. In *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections*, 6th edn, 1989:797-855. Edited by N. J. Schmidt & E. W. Emmons. Washington: American Public Health Association.
4. Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Hervé JP, Sá Filho GC, Travassos da Rosa JFS, et al. Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.* 1992;44:(2/3):124-35.
5. De Thoisy B, Vogel I, Reynes JM, Pouliquen JF, Carme B, Kazanji M, Vié JC. Health Evaluation of Translocated Free-Ranging Primates in French Guyana. *Am J Primatol.* 2001; 54:1-16.
6. Díaz LA, Almirón WR, Almeida FL, Spinsanti LI, Contigiani MS. Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincia de Córdoba, Argentina. *Entomol. Vect.* 2003;10(4):551-66.
7. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III, Saint Louis Encephalitis outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1752-4.

8. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*. 2000;2:1643-1649.
9. Figueiredo LTM History, present and future of Dengue fever in Brazil. In: An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. 1998:154-63. Edited by A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos & J.F.S. Travassos da Rosa. Belém: Instituto Evandro Chagas.
10. Hayes C. West Nile fever, In: *Arboviruses: epidemiology and ecology*. 1989;V:59-88. Edited by T. Monath. Boca Raton: CRC.
11. Hilst CLS, Svoboda WK, Spohr KAH, Malanski LS, Shiozawa MM, Aguiar LM, et al. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas da espécie *Alouatta caraya*. In: *Anais 2006 - XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa*. Vitória - ES: ANCLIVEPA, 2006a;1:92-3.
12. Hilst CLS, Spohr KAH, Svoboda WK, Shiozawa MM, Malanski LS, Aguiar LM, et al. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas do gênero *Cebus*. In: *Anais 2006 - XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa*. Vitória - ES: ANCLIVEPA, 2006b;1:92.
13. Hoff GL, Issel CJ, Trainer DO, Richards SH. Arbovirus serology in North Dakota mule and white-tailed deer. *J Wildl Dis*. 1973;9(4): 291-5.
14. ICTV. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, 2005.
15. Iversson LB, Coimbra TLM, Travassos da Rosa APA, Monath TP. Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of Rocio encephalitis. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1992;44 (2/3):164-6.

16. Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini M. Transmission of St. Louis encephalitis virus from Argentina by mosquitoes of the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex. *J Med Entomol.* 1980;17:282-5.
17. Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini M, Croop CB, Daffner JF, Calisher CH, Jacob WL, Christensen HA. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *Amer J Trop Med Hyg* 1985;34:945-55.
18. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM Fields *Virology*, 3 ed., Lippincott: Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1996:961–1034.
19. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene.* 1938; 27:493-7.
20. Rocha VJ, Aguiar LM, Ludwig G, Hilst CLS, Teixeira GM, Svoboda WK, et al. Techniques and traps models for capturing wild tufted capuchins. *International Journal of Primatology* 2007;28(1): 231-243.
21. Rocco IM, Santos CL, Bisordi I, Petrella SM, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47: 281–5.
22. Sabattini MS, Monath TP, Mitchell CJ, Daffner JF, Bowen GS, Pauli R, et al. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and description of study sites. *Amer J Trop Med Hyg.* 1985;34:937-44.
23. Sabattini MS, Avilés G, Monath TF. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. In: Instituto Evandro Chagas, Belém. 1998:113-4. Edited by A.P.A. Travassos da Rosa,

- P.F.C. Vasconcelos & I.F.S. Travassos da Rosa ed. Overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries.
24. Scaramozzino N, Crance J-M, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1922-7.
 25. Shope RE, Sather GE. Arboviruses. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5th ed, 1979:767-814. Edited by E.H. Lennette & N.J. Schmidt. Washington: Amer. Public Health Association.
 26. Soliman E, Gotuzzo N. St. Louis Encephalitis. In: eMedicine from WebMD, March 16, 2007. Accessed at <https://secure.emedicine.com>, sections 1-9. 2004. Edited by M. Nettleman, F. Talavera, J.L. Bruschi, E. Mylonakis & B.A. Cunha. United Kingdom: ICRA.
 27. Spinsanti LI, Re VE, Diaz MP, Contigiani MS Age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Córdoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(2):59-62.
 28. Theiler M, Downs WG. The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of the Rockefeller Foundation virus program, 1951-1970. 1st edn. 1973. New Haven: Yale University Press.
 29. Turell MJ, Guinn MO, Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Amer J Trop Med Hyg.* 2000;62:413-4.
 30. Vasconcelos PF, Travassos Da Rosa JFS, Travassos Da Rosa APA, Degallier N, Pinheiro FP, Sá Filho GC. Epidemiologia das encefalites por arbovirus na Amazônia brasileira. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo,* 1991;33, 465-76.

31. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. *Ciência e Cultura, Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1992;44(2/3):117-24.
32. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, et al. Arboviruses pathogenic from man in Brazil. In: An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. 1998:72–99. Edited by A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos & J.F.S. Travassos da Rosa. Belém: Instituto Evandro Chagas.
33. Vasconcelos PFC, Chiang JO, Araújo FAA, Henriques DF, Costa LRO, Martins LC, et al. Vigilance of equine encephalitis viruses in the Brazilian amazon: serologic survey in equines. *Journal of the Brazilian Society for Virology*. 2005;10(Supp.1):103-103.
34. Watts DM, Ramirez G, Cabezas C, Wooster MT, Carrillo C, Chuy M, et al. Arthropod-borne viral diseases in Peru. In: An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries. 1998:193–18. Edited by A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos, J.F.S. Travassos da Rosa. Belém: Instituto Evandro Chagas.

Table 1. Distribution for species, sex, and age of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.

MONKEY SPECIES	FEMALE (F)				MALE (M)				Total (F, M)
	Infant	Juvenile	Sub-adult	Adult	Infant	Juvenile	Sub-adult	Adult	
<i>Alouatta caraya</i>	01	03	--	16	--	05	06	12	43 (F=20, M=23)
<i>Cebus nigritus</i>	--	04	02	13	05	16	03	21	64 (F=19, M=45)
<i>Cebus cay</i>	--	05	02	04	01	02	02	10	26 (F=11, M=15)
Total	01	12	04	33	06	23	11	43	133

Table 2. Results of Haemagglutination Inhibition (HI) and Mouse Neutralization Test (MNT) in free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.

HI result* (antibody titer)	<i>Alouatta caraya</i>		<i>Cebus nigritus</i>		<i>Cebus cay</i>		Total (Male/Female)
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
Negative	21	17	40	16	10	8	112 (71/41)
20	--	2	2	1	2	2	9 (4/5)
40	2	1 ^(2.7)	1	--	2 ^(1.8/2.7)	--	6 (5/1)
80	--	--	1 ^(1.9)	1 ^(2.1)	--	1 ^(2.7)	3 (1/2)
160	--	--	--	1 ^(2.8)	--	--	1 (--/1)
320	--	--	--	--	--	--	--
640	--	--	1 ^(3.5)	--	1 ^(3.1)	--	2 (2/--)
Total	23	20	45	19	15	11	133 (83/50)

*HI Test result: positive HI ≥ 20

⁽ⁿ⁾ Neutralization Logarithmic Index (NLI): positive NLI ≥ 1.8

Table 3. Association results among the characteristics studied (species, sex, age and horse presence in the same habitat) with presence of anti-Saint Louis encephalitis virus antibodies (Neutralization Logarithm Index - NLI) in serum samples of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and December/05 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.

	NLI Test			OR (95% CI) ^a	p-values
	Positive(%)	Negative(%)	Total (%)		
Species					
<i>Alouatta caraya</i>	1 (2.32)	42 (97.68)	43 (32.33)	NC	0.1090 ^b
<i>Cebus nigritus</i>	4 (6.25)	60 (93.75)	64 (48.12)		
<i>Cebus cay</i>	4 (15.38)	22 (84.61)	26 (19.55)		
Sex					
Male	5 (6.02)	78 (93.98)	83 (62.41)	0.74	0.7281 ^c
Female	4 (8.00)	46 (92.00)	50 (37.59)	0.16 < OR < 3.48	
Age					
Infant	0	7 (100.00)	7 (5.27)	NC	0.1876 ^b
Juvenile	0	35 (100.00)	35 (26.31)		
Sub-adult	2 (13.33)	13 (86.67)	15 (11.28)		
Adult	7 (9.21)	69 (90.79)	76 (57.14)		
Horse presence in the same habitat					
Yes	4 (15.38)	22 (84.62)	26 (19.55)	3.71	0.0727 ^c
No	5 (4.67)	102 (95.33)	107 (80.45)	0.76 < OR < 17.79	
Total (%)	9 (6.77)	124 (93.23)	133 (100.00)		

NC: not calculated.

^a Odds ratio and 95% confidence limits.

^b Chi-square.

^c Fisher exact.

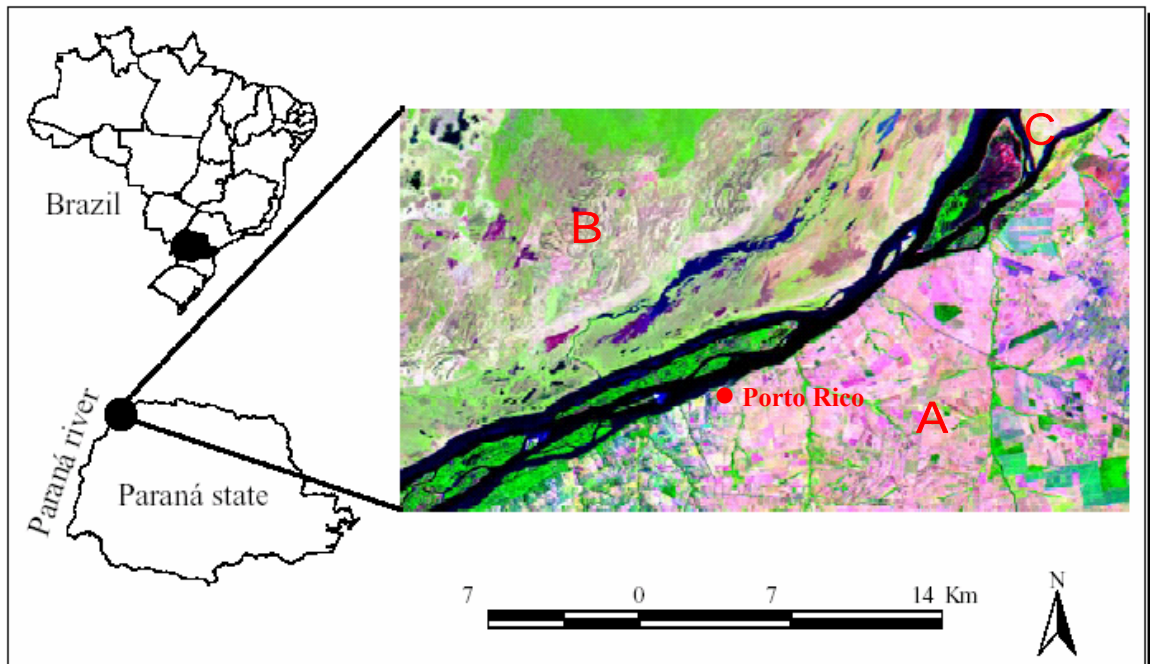


Figure 1. Picture showing the region where monkeys were captured. Satellite photo shows the Porto Rico County region, upper Paraná River, Brazil. A) Northwestern of Paraná State; B) Southeastern of Mato Grosso do Sul State; C) Paranapanema Pontal, São Paulo State.

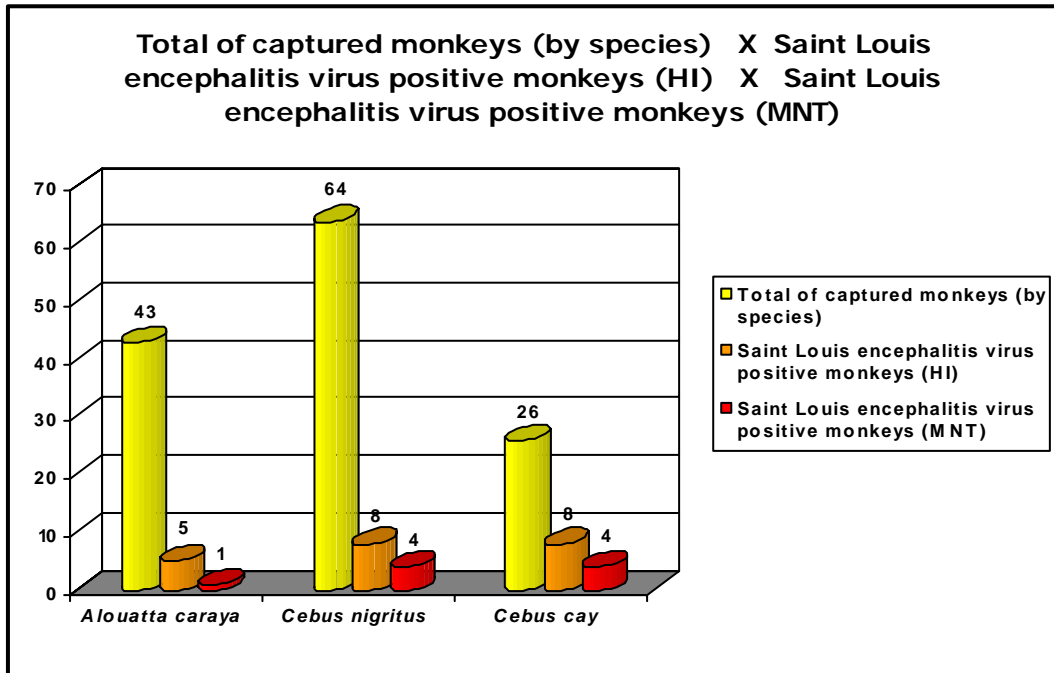


Figure 2. The figure shows the relationships among total of captured monkeys (by species) and their positive results for Hemagglutination Inhibition (HI) and Mouse Neutralization Test (MNT).

3.3. OCCURRENCE OF BORNA DISEASE VIRUS P24 RNA IN FREE-RANGING NEW WORLD MONKEYS (*CEBUS* SPP.; *ALOUATTA CARAYA*) IN THE UPPER PARANÁ RIVER BASIN REGION, BRAZIL

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Veterinary Microbiology*

Occurrence of Borna disease virus p24 RNA in free-ranging New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) in the upper Paraná River basin region, Brazil

Abstract

Borna disease virus (BDV) is a virus which naturally infects a broad range of warm-blooded animals. BDV is an enveloped, non-segmented virus, with a negative-stranded RNA genome and which belongs to the family *Bornaviridae* in the order Mononegavirales. In the present study we investigated the presence of BDV p24 RNA in peripheral blood cells from 147 free-ranging wild New World monkeys (47 *Alouatta caraya*, 74 *Cebus nigritus*, and 26 *Cebus cay*). The animals were captured using new methodologies totally adapted to environmental conditions at the local of captures following the law and regulations of Brazilian Environmental Institute (IBAMA). The captured period was between June/04 and April/06. Blood samples were obtained by jugular or brachial venipuncture; blood samples were separated and stored at -20°C with Trizol LS reagent (1:3) until tested. The presence of BDV p24 RNA was investigated by reverse transcription and nested PCR (RT-nested PCR) using specific primers designed to the p24 gene of BDV. The specificity of the genomic amplification and detection was analyzed by nucleotide sequencing of PCR products. Only *Cebus cay* monkeys showed positive results to BDV. Prevalence of BDV p24 RNA in these monkeys was 15.38% (n=4). The obtained sequences revealed identity with GenBank database sequences for BDV. This is the first time in Brazil that was detected BDV p24 RNA in the peripheral blood cells of free-ranging wild monkeys, specifically in species *Cebus cay*. This finding can help understanding the distribution of BDV among native non human primates and the possible role of these animals in maintenance cycle of BDV in the natural environment.

Key words: BDV, p24 RNA, primates, wild monkeys, *Cebus cay*

Introduction

Borna disease virus (BDV) is a neurotropic, non-segmented, single-stranded, negative sense RNA virus which causes encephalitis in horses and sheep. This virus causes changes in the brain of infected animals resulting in several functional disturbances including of movement and behavior. Furthermore, may be associated with human psychiatric disorders (Nakamura *et al.*, 2000; Bode *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2001; Horning *et al.*, 2001; Taieb *et al.*, 2001).

The BDV infection was originally believed to be limited to farm animals (horses and sheep) and certain wild animals (rabbits) in endemic areas of Germany and Switzerland. More recently, with the development of more modern and powerful tools for the specific diagnosis of BDV infection (*in situ* hybridization, reverse transcription PCR (RT-PCR) and with the increasing international research interest in BDV, reports of new susceptible species to and the geographic location of cases of natural infection have expanded the knowledge of epidemiology of it (Rott and Becht, 1995). Animals at risk for natural acquires or experimental BDV infection include rhesus monkeys, horses, sheep, cattle, goats, rabbits, deer, llamas, alpacas, cats, rats, mice, gerbils, dogs, and ostriches (Carbone, 2001). Besides its recognized main natural host, the horse, other Equidae, as well as sheep, cattle, rabbits, goats, deer, alpacas, llamas, cats, pigmy hippopotamus, sloth, vari monkeys, and ostriches have been found naturally infected with BDV (Richt *et al.*, 1997).

Since the source of human BDV infections is unknown, it is important to investigate the epidemiology of BDV. Its wide host range, as well as the high level of nucleotide sequence homology found between several isolates from different animal species (Binz *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994), strongly suggest that BDV should be a zoonotic virus (Degiorgis *et al.*, 2004). Although a wildlife reservoir for BDV has been assumed to exist, strong evidence to incriminate any animal species for this recur aims to be determined. In a

survey carried out with a free-ranging Swedish lynx (*Lynx lynx*) it was reported a positive sample to BDV, which was the first time that a natural BDV infection was recognized in a wild felid (Degiorgis *et al.*, 2004).

The predilection of the BDV to replicate in the limbic-hypothalamic region has been associated in some animals with the development of a syndrome somewhat resembling human affective disorders suggesting that BDV may be involved in certain human affective disorders (Amsterdam *et al.*, 1985).

BDV is highly neurotropic for natural and experimental infected hosts. It replicates in neurons and astrocytes without inducing cytopathic effects (Schneider *et al.*, 2005). This virus infects the central nervous system (CNS) of many animal species and may be implicated in the etiology of behavioral disturbances reminiscent of autism, schizophrenia and mood disorders (Pletnikov *et al.*, 2002; Tomonaga, 2004).

Bode *et al.* (1993) reported that the proportion of BDV antibody carriers was over 30% among examined patients showing major depression. In addition, these authors also detected a high rate of BDV RNA by RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from psychiatric patients.

Molecular analysis has indicated that BDV genome consists of at least six open reading frames (ORFs). From 5' to 3' ORFs encode the nucleoprotein (p40), phosphoprotein (p24), transcriptional activator, matrix protein (gp18), envelope protein (p56), and a predicted RNA-dependent RNA polymerase (p180) (Schneider *et al.*, 1997).

The second ORF encodes a 24 kDa protein (also known as p24), representing the putative phosphoprotein. In addition to the p24 protein, the second ORF also produces a 16 kDa protein by translation of the second in-frame AUG codon. This 16 kDa protein has been detected in BDV infected cultured cells and in brains of experimentally infected animals (Ikuta *et al.*, 2002). Among BDV proteins, the p40 and p24 have been frequently found in

BDV-infected brain cells of both animals experimentally and naturally infected (Stitz *et al.*, 2002).

Most epidemiological studies employed RT-PCR or nested-PCR to detect viral RNA in biological specimens. Thus, in this study we report the major findings obtained by using the nested RT-PCR of BDV p24 RNA in the PBMC of free-ranging New World monkeys, collected in the upper Paraná River basin.

Materials and Methods

Site of study

All animals used in this study were trap captured in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, upper Paraná River, Brazil (Figure 1), in islands and sub-tropical forest reserves (where animals were captured), protected by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). For this study, four islands were chosen: Mutum, Porto Rico, Gaivota, and Japonesa, besides the forests of Paraná River basin localized in that region. Porto Rico County is located in Northwestern Paraná State at 22°46'20"S latitude and 53°16'01"W-GR longitude. The average annual temperature in this area ranges from 16 and 29°C.

Animals

One hundred forty-seven free-ranging New World Monkeys were captured, 47 *Alouatta caraya* (black and golden howler monkey), 74 *Cebus nigrinus* and 26 *Cebus cay* (both *Cebus* species called capuchin monkeys) using new approach adapted to the site of study conditions as described (Aguiar *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007). The captured period was between June/04 and April/06. A field team composed of biologists and veterinarians was responsible for trapping the monkeys, following an IBAMA license (number 104/04) and its recommendations. Furthermore, the present study was approved by the Experimental

Animal Ethics Committee of the Londrina State University (register nº 34/05). Animals were anesthetized with Zoletil® as described elsewhere (Hilst *et al.*, 2006a; Hilst *et al.*, 2006b). Then, blood samples were obtained by jugular or brachial venipuncture and stored at -20°C with Trizol LS reagent (Invitrogen™) (1:3) until tested. In this study, biological and clinical parameters (data not shown) of the animals were evaluated, a subcutaneous transponder was applied (inter scapular region) in each captured monkeys for future control, and after complete recuperation they were set free in the same place where had been captured.

All captured primates had strictly forest habits. However, some *Cebus nigrinus* specimens (n=13) were trap captured in a forest reserve (in Paraná River basin) near a farm whose owners reported having contact with some monkeys.

Molecular Diagnosis of BDV

Nucleic acid preparation and reverse transcription

Leukocytes were prepared from peripheral blood samples after using erythrocytes lyses buffer B (solution A: 0.32 M sucrose; 10mM Tris-HCl pH-7.5; 5mM MgCl₂; 1% Triton X-100). Total cellular RNA was extracted from peripheral white blood cells with Trizol LS reagent (Invitrogen™, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was resuspended into 20µl of sterile water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, *Invitrogen*). cDNA was generated from 6µl of total RNA, using cDNA synthesis kit (*GeneAmp RNA PCR kit – Applied Biosystems, USA*).

Nested - Polymerase chain reaction (PCR)

BDV specific primers (*GenBank* – accession number: NC 001607) were used for amplification: BDV1 (5'-TGACCCAACCAGTAGACCA-3'), BDV2 (5'-GTCCCATTCATCCGTTGTC-3'), BDV3 (5'-TCAGACCCAGACCAGCGAA-3'), BDV4 (5'-AGCTGGGGATAAATGCGCG-3') according to Kishi *et al.* (1996). PCR products of 392 base pairs were revealed by a 10% acrylamide gel silver staining eletrophoresis. The PCR

products were purified and directly sequenced using *DYEnamic*[™] *ET* dye terminator cycle sequencing kit (*Amersham Pharmacia Biotech - USA*) in a *MegaBace*[™] sequencer (*Amersham Pharmacia Biotech, USA*). Amplified nucleotide sequences were analyzed by comparison with the *GenBank* BDV sequence database.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by using Chi-square and Fisher exact Test in order to establish differences among studied characteristics, and associations were determined by odds ratio (OR) at a 95% confidence interval. A p -value of ≤ 0.05 was considered as statistically significant

Results

A total of 147 wild monkeys (Table 1) had examined their blood for BDV RNA p24 by nested-RT-PCR in peripheral cells. When the nested RT-PCR technique was applied for the detection of BDV related RNA, positive signals were detected in 2.72% (4/147) of the samples. All positive PCR samples had nucleotide sequences identity with Borna disease virus, sequences obtained from the GeneBank database.

All four positive samples were from *Cebus cay* species (4/26) (Figure 2), representing a positive rate of 15.38% (Table 2), and were trapped in the same site of capture in an area near the Mato Grosso do Sul State, Brazil. Statistical differences were observed among capture's region ($p=0.0008$) and species ($p=0.0001$) (Table 2).

Discussion

Nowadays the detection of BDV RNA has been observed in a wide variety of domestic animal species including cats, dogs, cattle, sheep and horses. In addition, the potential role of BDV as a human pathogen in connection with etiology of psychiatric diseases has increased the interest in the investigation of this virus and its pathogenic

pathways. Molecular biology analyses have revealed important data, such as, genomic organization and BDV specific proteins (Miranda *et al.*, 2006).

For over two centuries, Borna disease has been described as a sporadically occurring infectious meningoencephalomyelitis affecting horses and sheep in Central Europe (Dauphin *et al.*, 2002). Over the last decade, the BD epidemiology has been intensely investigated. Firstly, its geographical distribution seems larger than was previously supposed. Secondly, the disease can affect a large number of warm-blooded animal species, including humans (Dauphin *et al.*, 2002). BDV genome has been recently detected in France in the blood and brain of different animal species: horses, bovines and foxes (Dauphin *et al.*, 2002).

In spite of some authors have considered the BD as potential as zoonotic disease (Degiorgis *et al.*, 2004), it is very important to consider the necessity to study this pathogenic agent in different potential hosts in nature in order to define the biological cycle inside of different ecosystems. There are several research articles in the recent years describing the occurrence of the BDV p24 RNA in psychiatric patients and several animal species (Richt *et al.*, 1997; Carbone, 2001; Degiorgis *et al.*, 2004). Therefore, it is necessary that well designed research studies investigate the possible role of BDV in the pathogenesis of these psychiatric disorders.

The present study is the first report of BDV detection in free-ranging monkeys at Northwestern Paraná State, Southern Brazil. This finding is very important for several reasons including: i) the description of a potential natural host (*Cebus cay*); ii) the recognition of a possible natural focus of BDV; iii) as *Cebus* monkeys are easily reproduced in captive, it is a potential target for the development of experimental studies on the BDV pathogenesis, and to test potential effective medicine for the treatment of Borna disease. The next step will be conducting a study involving other animal species (wild and domestic) and local human population to establish the roles of each other in the cycle of BDV.

Acknowledgements

The authors wish to thank Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA-PR), Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI-PR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for granting the necessary financial support. Thanks are due also to the Entomology Team of SESA-PR (Porto Rico-PR) for their technical support during the field activities, and to the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for giving the permission for animal captures during this experiment (license number 104/04).

References

1. Aguiar, L.M., Ludwig, G., Svoboda, W.K., Teixeira, G.M., Hilst, C.L.S., Shiozawa, M.M., Malanski, L.S., Mello, A.M., Navarro, I.T., Passos, F.C., 2007. Use of traps to capture black and gold howlers (*Alouatta caraya*) on the islands of the upper Paraná River, Southern Brazil. *Amer. J. Prim.* 69, 241-247.
2. Amsterdam, J., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzales, F., Rott, R., Koprowski, H., 1985. Borna Disease Virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch. Gen. Psychiatry.* 42, 1093-1096.
3. Binz, T., Lebelt, J., Niemann, H., Hagenau, K., 1994. Sequence analysis of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res.* 34, 281–289.
4. Bode, L., Ferzt, R., Czech, G., 1993. Borna disease virus infection and disorders in man. *Arch. Virol.* 7, 159-167.
5. Bode, L., Reckwarld, P., Everus, W., Stoyloff, R., Ferszt, R., 2001. Borna disease virus – specific circulating immune complexes antigenemia, and free antibodies - the

- key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol. Psychiatry*. 6, 481-491.
6. Carbone, K.M., 2001. Borna disease virus and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3), 513-527.
 7. Dauphin, G., Legay, V., Pitel, P.H., Zientara, S., 2002. Borna disease: current knowledge and virus detection in France. *Vet. Res.* 33(2), 127-138.
 8. Degiorgis, M.P., Berg, A.L., Hard af Segerstad, C., Mörner, T., Johansson, M., Berg, M., 2004. Borna disease in a free-ranging Lynx (*Lynx lynx*). *J. Clin. Microbiol.* 38(8), 3087-3091.
 9. Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Ogawa, T., 2001. Immunological and PCR analyses for Borna Disease Virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38(2), 419-429.
 10. Hilst, C.L.S., Svoboda, W.K., Spohr, K.A.H., Malanski, L.S., Shiozawa, M.M., Aguiar, L.M., Ludwig, G., 2006. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas da espécie *Alouatta caraya*. In: *Anais 2006 - XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa*. Vitória - ES: Anclivepa, 2006a. v. 1, p. 92-93.
 11. Hilst, C.L.S., Spohr, K.A.H., Svoboda, W.K., Shiozawa, M.M., Malanski, L.S., Aguiar, L.M., Ludwig, G., 2006. Estudo e adaptação de protocolo de sedação à base de tiletamina/zolazepan em primatas do gênero *Cebus*. In: *Anais 2006 - XXVII Congresso Brasileiro da Anclivepa*. Vitória - ES: Anclivepa, 2006b. v. 1, p. 92-92.
 12. Horning, M., Lipkin, I., 2001. Infectious and Immune factors in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: epidemiology, hypotheses and animal models. *Mental retardation and developmental disabilities. Res. Rev.* 7, 200-210.

13. Ikuta, K., Ibrahim, M.S., Kobayashi, T., Tomonaga, K., 2002. Borna Disease Virus and Infection in Humans. *Front. Biosci.* 7, 470-495.
14. Kishi, M., Arimura, Y., Ikuta, K., Shoya, Y., Lai, P.K., Kakimuna, M., 1996. Sequence variability of Borna disease virus open reading frame II found in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 70(1), 635-640.
15. Miranda, H.C., Nunes, S.O.V., Calvo, E., Suzart, S., Itano, E.N., Watanabe, M.A., 2006. Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients. *J. Affect. Disord.* 90, 43-47.
16. Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., 2000. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J. Virol.* 74(10), 4601-4611.
17. Pletnikov, M.V., Moran, T.H., Carbone, K.M., 2002. Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. *Front. Biosci.* 7, 593–607.
18. Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., Herzog, S., 1997. Borna disease virus infection in animal and man. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 343–352
19. Rocha, V.J., Aguiar, L.M., Ludwig, G., Hilst, C.L.S., Teixeira, G.M., Svoboda, W.K., Shiozawa, M.M., Malanski, L.S., Navarro, I.T., Mariño, J.H.F., Passos, F.C., 2007. Techniques and traps models for capturing wild tufted capuchins. *International Journal of Primatology.* 28 (1), 231-243.
20. Rott, R., Becht H., 1995. Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190, 17-30.
21. Schneider, P. A., Briese, T., Zimmermann, W., Ludwig, H., Lipkin, I., 1994. Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J. Virol.* 68, 63–68.

22. Schneider, P.A., Kim, R., Lipkin, W.I., 1997. Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J. Virol.* 71(7), 5614-5619.
23. Schneider, U., Schwemmler, M., Staeheli, P., 2005. Genome trimming: A unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *PNAS.* 102(9), 3441–3446.
24. Stitz, L., Bilzer, T., Planz, O., 2002. The Immunopathogenesis of Borna Disease Virus Infection. *Front. Biosci.* 7, 541-555.
25. Taieb, O., Baleyte, J.M., Mazet, P., Fillet, A.M., 2001. Borna disease virus and psychiatry. *Euro Psychiatry.* 16, 03-10.
26. Tomonaga, K., 2004. Virus-induced neurobehavioral disorders: mechanisms and implications. *Trends Mol. Med.* 10, 71–77.

Table 1. Distribution for specie, sex and age of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and April/06 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.

MONKEY SPECIES	FEMALE (F)				MALE (M)				Total (F, M)
	Infant	Juvenile	Sub-adult	Adult	Infant	Juvenile	Sub-adult	Adult	
<i>Alouatta caraya</i>	01	03	--	17	--	07	05	14	47 (F=21, M=26)
<i>Cebus nigritus</i>	--	06	02	15	05	20	04	22	74 (F=23, M=51)
<i>Cebus cay</i>	--	05	02	04	01	02	02	10	26 (F=11, M=15)
Total	01	14	04	36	06	29	11	46	147

Table 2. Association results among the studied characteristics (specie, sex, age and capture's region) with presence of Borna disease virus – BDV (molecular diagnosis) in blood samples of free-ranging New World monkeys captured between June/04 and April/06 in the Porto Rico County region, located in Northwestern Paraná State and Southeastern Mato Grosso do Sul State, Brazil.

	Molecular diagnosis (Nested-PCR and genetic sequencing)			OR (95% CI) ^a	p-Values
	Positive (%)	Negative (%)	Total (%)		
Specie					
<i>Alouatta caraya</i>	0	47 (100.00)	47 (31.97)	NC	0.0001^b
<i>Cebus nigritus</i>	0	74 (100.00)	74 (50.34)		
<i>Cebus cay</i>	4 (15.38)	22 (84.62)	26 (17.69)		
Sex					
Male	2 (2.17)	90 (97.83)	92 (62.59)	0.59	0.6300 ^c
Female	2 (3.64)	53 (96.36)	55 (37.41)	0.06 < OR < 6.06	
Age					
Infant	0	7 (100.00)	7 (4.76)	NC	0.8222 ^b
Juvenile	1 (2.33)	42 (97.67)	43 (29.25)		
Sub-adult	0	15 (100.00)	15 (10.20)		
Adult	3 (3.66)	79 (96.34)	82 (55.78)		
Capture's region					
Mato Grosso do Sul (MS) State, Brazil	4 (15.38)	22 (84.62)	26 (17.69)	undefined	0.0008^c
Paraná (PR) State, Brazil	0	121 (100.00)	121 (82.31)		
Total (%)	4 (2.72)	143 (97.28)	147 (100.00)		

NC: not calculated.

^a Odds ratio and 95% confidence limits.

^b Chi-square.

^c Fisher exact.

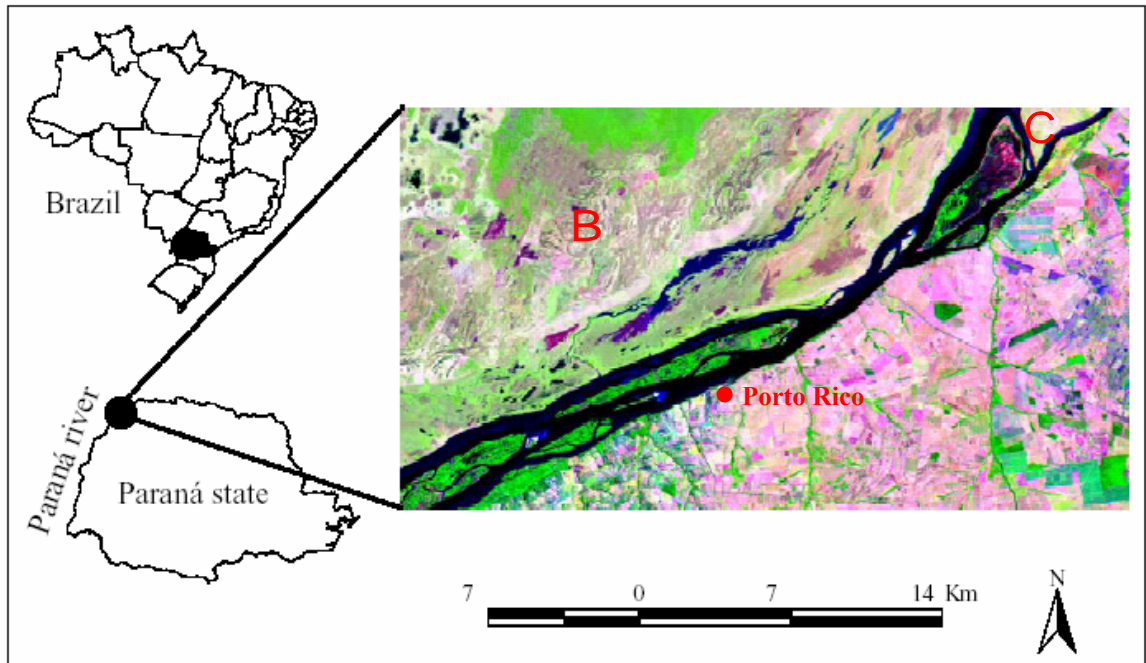


Figure 1. Picture showing the region where monkeys were captured. Satellite photo shows the Porto Rico County region, upper Paraná River, Brazil. A) Northwestern of Paraná State; B) Southeastern of Mato Grosso do Sul State; C) Paranapanema Pontal, São Paulo State.

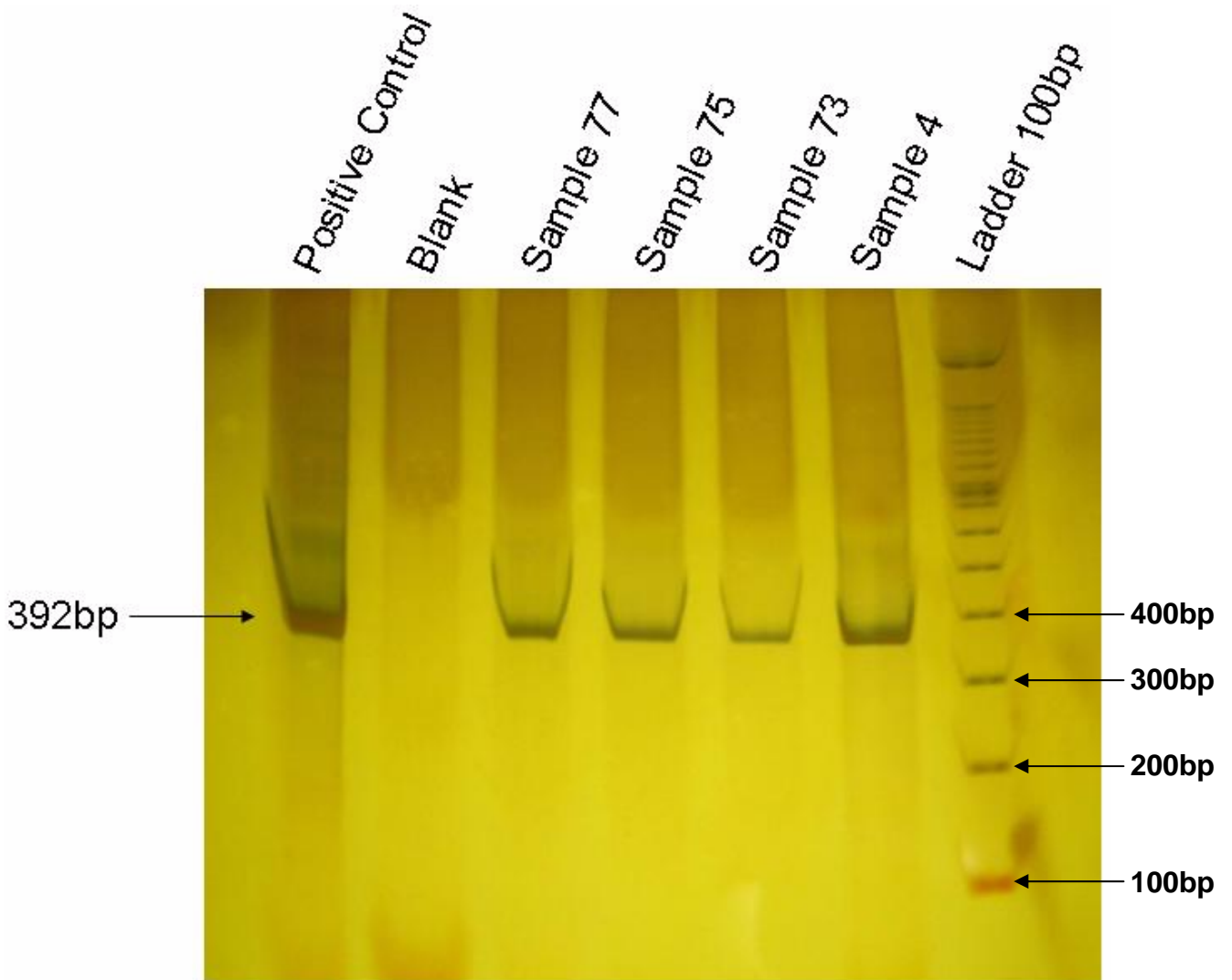


Figure 2. Detection of p24 RNA for Borna disease virus (BDV) in blood samples from free-ranging New World monkeys. The product of 392 base pairs fragment was detected by RT-nested PCR in the samples 4, 73, 75, 77. L: Ladder is 100 base pairs marker (Promega, Madison, WI).

4. CONCLUSÕES

As manobras de captura e a identificação de novos espécimes de PNH que habitam a região do estudo resultaram no desenvolvimento de novos modelos de armadilhas e na adaptação de protocolos de sedação, reduzindo danos aos animais capturados.

Algumas viroses de interesse à saúde pública como encefalite Saint Louis e doença por Borna vírus foram diagnosticadas pela primeira vez em PNH da região do alto rio Paraná.

Os resultados obtidos deram subsídios para a criação de um modelo de vigilância ativa para FA, outras arboviroses e zoonoses de interesse à saúde pública em parceria com a SESA-PR, MS, IEC-PA, UEL e UFPR, de acordo com a realidade e necessidades do Estado do Paraná.

5. ANEXOS

5.1 Publicações

BRIEF REPORT

Use of Traps to Capture Black and Gold Howlers
(*Alouatta caraya*) on the Islands of the Upper Paraná
River, Southern Brazil

LUCAS M. AGUIAR^{1*}, GABRIELA LUDWIG¹, WALFRIDO K. SVOBODA²
GUSTAVO M. TEIXEIRA³, CARMEN L.S. HILST⁴, MARCOS M. SHIOZAWA⁵
LUCIANO S. MALANSKI⁶, ANGELA M. MELLO⁶, ITALMAR T. NAVARRO⁵,
AND FERNANDO C. PASSOS¹

¹Laboratório de Biodiversidade Conservação e Ecologia de Animais Silvestres,
Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

²Laboratório de Saúde Pública, Universidade Federal do Paraná, Palotina, Brasil

³Laboratório de Zoologia, Curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Apucarana,
Apucarana, Brasil

⁴Hospital Veterinário, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de
Londrina, Londrina, Brasil

⁵Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

⁶Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, Curitiba, Brasil

Howlers (genus *Alouatta*) are widely captured with the use of anesthetic projectiles; however, no capture protocol involving the use of traps has been described to date. In the present study we describe the first efficient capture program for black and gold howlers (*Alouatta caraya*) using traps, which was implemented on the islands of the upper Paraná River in southern Brazil. We constructed two trap models with either manual or automatic activation (trap A with two entrances and guillotine-type doors; trap B with one entrance and a guillotine-type door). The traps were suspended in the canopy by means of vertical climbing techniques, and were baited regularly and abundantly with bananas and mangoes. We captured 70 howlers (86% using manual activation and 14% using automatic activation) on four different islands. We restrained 41 of these animals and measured their body mass, which averaged $5.30 \text{ kg} \pm 1.79$. Given our results, we suggest that the system described in the present study represents an alternative capture program for howlers in areas that have low food diversity and no other mammal species that will compete for the bait, as has been observed in riparian environments, islands, and forest fragments. *Am. J. Primatol.* 69:241–247, 2007. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: capture; traps; management; body mass; primates

Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Contract grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
Contract grant sponsor: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA/PR).

*Correspondence to: Lucas M. Aguiar, Programa de Pós-graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19020, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brasil.
E-mail: lucasmoraes@ufpr.br

Received 25 February 2006; revised 30 June 2006; revision accepted 5 July 2006

DOI 10.1002/ajp.20372

Published online 19 December 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Techniques and Trap Models for Capturing Wild Tufted Capuchins

Vlamiir J. Rocha,^{1,9} Lucas M. Aguiar,^{2,3} Gabriela Ludwig,^{2,3}
Carmen L. S. Hilst,⁴ Gustavo M. Teixeira,⁵ Walfrido K. Svoboda,^{6,7}
Marcos M. Shiozawa,⁷ Luciano S. Malanski,⁷ Italmir T. Navarro,⁷
José Hernan F. Mariño,⁸ and Fernando C. Passos^{2,3}

Received September 13, 2005; accepted November 9, 2005; Published Online February 15, 2007

The difficulty of capturing capuchins (genus Cebus) via anesthetic projectiles, as well as the scarcity of methodological descriptions of operational trapping programs, are widely known. The limitations hamper studies focusing on the conservation and evaluation of the health of capuchins that depend on their capture. We report on techniques and trap models used for capturing black tufted capuchins (Cebus nigrurus) in Londrina, Telêmaco Borba, and Porto Rico, municipalities of the State of Paraná, Southern Brazil. Captures occurred in forest fragments, continuous forests, and gallery forests belonging to several vegetational formations. The trap model we developed was a 2 × 2 × 3 m cage equipped with a 2 × 1 m door that we operated manually

¹Klabin S.A., Manejo Ambiental, Fazenda Monte Alegre, Lagoa s/no.- Pesquisa Florestal, CEP 84279-000, Lagoa-PR, Brasil.

²Graduate Program in Zoology, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil.

³Biodiversity, Conservation and Ecology of Wild Animals Laboratory, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba, PR Brazil.

⁴Veterinary Hospital, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina-UEL, 86050-970 Londrina, PR, Brazil.

⁵Zoology Laboratory, Curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Apucarana, R. Osvaldo de Oliveira 600, 86811-500 Apucarana, PR, Brazil.

⁶Public Health Laboratory, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil.

⁷Protozoology Laboratory, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina-UEL, 86050-970 Londrina, PR, Brazil.

⁸Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina-UEL, 86050-970 Londrina, PR, Brazil.

⁹To whom correspondence should be addressed; e-mail: vlamiir@klabinpr.com.br.

International Journal of Primatology, Vol. 28, No. 1, February 2007 (© 2007)
DOI: 10.1007/s10764-006-9103-7

Cougar Predation on Black-and-Gold Howlers on Mutum Island, Southern Brazil¹

Gabriela Ludwig,^{2,3,8} Lucas M. Aguiar,^{2,3} João M. D. Miranda,^{2,3}
Gustavo M. Teixeira,⁴ Walfrido K. Svoboda,^{5,6} Luciano S. Malanski,⁶
Marcos M. Shiozawa,⁶ Carmen L. S. Hilst,⁷ Italmar T. Navarro,⁶
and Fernando C. Passos^{2,3}

Received September 13, 2005; accepted December 15, 2005;

Published Online March 13, 2007

Researchers consider predation rates by terrestrial animals to be lower in the case of arboreal primates, particularly among large-bodied species. We recorded the consumption of black-and-gold howlers (Alouatta caraya) by cougars (Puma concolor) as evidence of predation on an island of the upper Paraná River. We collected and processed fecal samples of the felid in 2004 and 2005. We identified items in the laboratory by comparison with museum specimens. We considered each species in a fecal sample as a single occurrence. Based on analysis of the cuticle scale pattern, we identified the felid as cougar. Howlers occurred in 4 out of the 8 fecal samples (40% of the occurrences). In addition to howlers, we also recorded 5 occurrences of agouti (Dasyprocta azarae; 50%) and a small unidentified sigmodontine

¹This work is contribution 1590 of Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

²Graduate Program in Zoology, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Portal Box 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil.

³Biodiversity, Conservation and Ecology of Wild Animals Laboratory, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Postal Box 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil.

⁴Zoology Laboratory, Curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Apucarana, R. Osvaldo de Oliveira 600, 86811-500 Apucarana, PR, Brazil.

⁵Public Health Laboratory, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil.

⁶Protozoology Laboratory, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil.

⁷Veterinary Hospital, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil.

⁸To whom correspondence should be addressed; e-mail: gabiludwig@ufpr.br.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

veterinary
parasitology

Veterinary Parasitology 133 (2005) 307–311

www.elsevier.com/locate/vetpar

Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil

João Luis Garcia^{a,*}, Walfrido Kühl Svoboda^{b,c}, Andréas Lazaros Chryssafidis^c,
Luciano de Souza Malanski^c, Marcos Massaaki Shiozawa^c,
Lucas de Moraes Aguiar^d, Gustavo Monteiro Teixeira^e,
Gabriela Ludwig^d, Lineu Roberto da Silva^f,
Carmem Hilst^g, Itamar Teodorico Navarro^c

^a Microbiology and Immunology Laboratory, Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Centro Oeste-UNICENTRO,
R. Simeão Camargo Varela de Sá, 03, Bairro Cascavel, 85040-080 Guarapuava, PR, Brazil

^b Public Health Laboratory, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Rua Pioneiro, 2153,
Jardim Dallas, 85950-000 Palotina, PR, Brazil

^c Protozoology Laboratory, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina-UEL,
Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil

^d Biodiversity, Conservation and Ecology of Wild Animals Laboratory, Departamento de Zoologia,
Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

^e Zoology Laboratory, Curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Apucarana, R. Osvaldo de Oliveira 600,
86811-500 Apucarana, PR, Brazil

^f Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA/PR), Centro de Saúde Ambiental (CESA), Rua Piquiri, 170,
Bairro Reboças, 80230-140 Curitiba, PR, Brazil

^g Veterinary Hospital, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina-UEL,
Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brazil

Received 21 April 2005; received in revised form 6 June 2005; accepted 7 June 2005

Abstract

In this study, we captured 60 wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil, and modified agglutination test (MAT) was performed to evaluate anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. Prevalence was 30.2% (13/43) in *Cebus* spp. (capuchin monkeys) and 17.6% (3/17) for *A. caraya* (black and golden howler monkeys). MAT showed antibody titers of 16 (15/16) and 64 (1/16). Herein, we have observed an odds ratio (OR) = 4.67 (1.06 < OR < 21.42, $p < 0.01$) among monkeys with presumed risk of human contact. There were not any statistical differences among age, species

* Corresponding author. Tel.: +55 42 6291444; fax: +55 42 6291444.
E-mail address: jlgarcia@unicentro.br (J.L. Garcia).

Toxo & Food 2006

Has the time come
for control
of *Toxoplasma*-infection
through
Toxoplasma-free food?

8-10 May 2006
Palermo, Italy



Abstract
book

ADDITIONAL SERO-EPIDEMIOLOGICAL SURVEY FOR TOXOPLASMOSIS IN WILD NEW WORLD MONKEYS (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) AT THE PARANÁ RIVER BASIN, PARANÁ STATE, BRAZIL

Garcia J.L.¹, Svoboda, W.K.^{2,3}, Spohr, K.A.H.², Shiozawa⁴; M.M., Hilst, C.L.S.³, Agular, L.M.⁵, Ludwig, G.⁵, Teixeira, G.M.⁶, Maron, A.⁷, Passos, F.C.⁸, Navarro IT²

¹ Microbiology and Immunology laboratory, Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Guarapuava-Brazil; ² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de Londrina - UEL, Londrina-Brazil; ³ Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Palotina, PR, Brazil; ⁴ UNINORTE, Araçongas, PR, Brazil; ⁵ Biodiversity, Conservation and Ecology of Wild Animals Laboratory, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, PR, Brazil; ⁶ Faculdade de Apucarana – FAP, Apucarana, PR, Brazil; ⁷ Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, Brazil

Key words: *Toxoplasma gondii*; monkeys; seroprevalence

Abstract

In this study we captured 67 wild new world monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil, and modified agglutination test (MAT) was performed to evaluate anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. Prevalence was 30.2% (13/43) into *Cebus* spp. (capuchin monkey) and 17.6% (3/17) for *Alouatta caraya* (black and golden howler monkey). MAT showed antibody titers of 16 (15/16) and 64 (1/16). Herein, we have observed an OR= 4.67 (1.06<OR<21.42, p<0.01) among monkeys with presumed risk of human contact. There were not any statistical differences among age, species and sex (p > 0.05). The present work is the first report on serum occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in wild capuchin monkeys and in wild black and golden howler monkeys.

1. Introduction

Toxoplasmosis research in nonhuman primates is important to understand host-parasite relations (1). Macaques and other Old World monkeys are more resistant to clinical toxoplasmosis than New World monkeys (2). Here we describe serum occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in *Cebus* spp. (capuchin monkey) and *Alouatta caraya* (black and golden howler monkey).

2. Material and Methods

2.1 Site of study

All animals used in this study were trap captured at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. This locality has island and forest reserves (where animals were captured), which are environmentally protected by Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). These reserves are basically formed by sub tropical forests. Two islands from that region were chosen, Mutum and Porto Rico, besides the forests of Paraná river basin located in the Porto Rico county. This one is located in Northwest Paraná State at 22° 46' 20" South latitude and 53° 16' 01" W-GR longitude. The average temperature in this area ranges between 16-29° C.

2.2 Monkey samples

Sixty serum samples of new world monkeys were evaluated, being forty-three from *Cebus* spp. (Capuchin monkey) and seventeen from *Alouatta caraya* (black and golden howler monkey). The primates had strictly forest habits. A group composed of Biologists and Veterinarians was responsible for capturing the monkeys, who had an IBAMA license (number 104/04) to do it. Animals were anesthetized with Zoletil[®] (Hilst, in prep.). Next, blood samples were obtained by jugular venipuncture. Serum samples were stored at -20 ° C until tested. After that, biological and clinical

parameters (data not shown) of the animals were evaluated, and after complete recuperation they were set free.

2.3 Modified agglutination test (MAT)

Serum samples were tested by modified agglutination test (MAT), as described previously (3), in Protozoology laboratory at Universidade Estadual de Londrina. Antigen of MAT was kindly provided by Dr. J.P.Dubey (USDA, Beltsville, Maryland, USA).

2.4 Statistical analysis

Statistical evaluation was carried out using Mantel-Haenszel chi-square and Fisher exact to establish differences among the characteristics studied. We have considered as significant a p value of ≤ 0.05.

3. Results

Serum occurrence of anti-*T. gondii* antibodies was 69.5% (32/46) for *Cebus* spp. (capuchin monkey) and 52.6% (10/19) for *Alouatta caraya* (black and golden howler monkey). MAT showed antibody titers of 16 (39/42) and 32 (3/42). Results among risk factors of age, sex and species are summarized in Table 1.

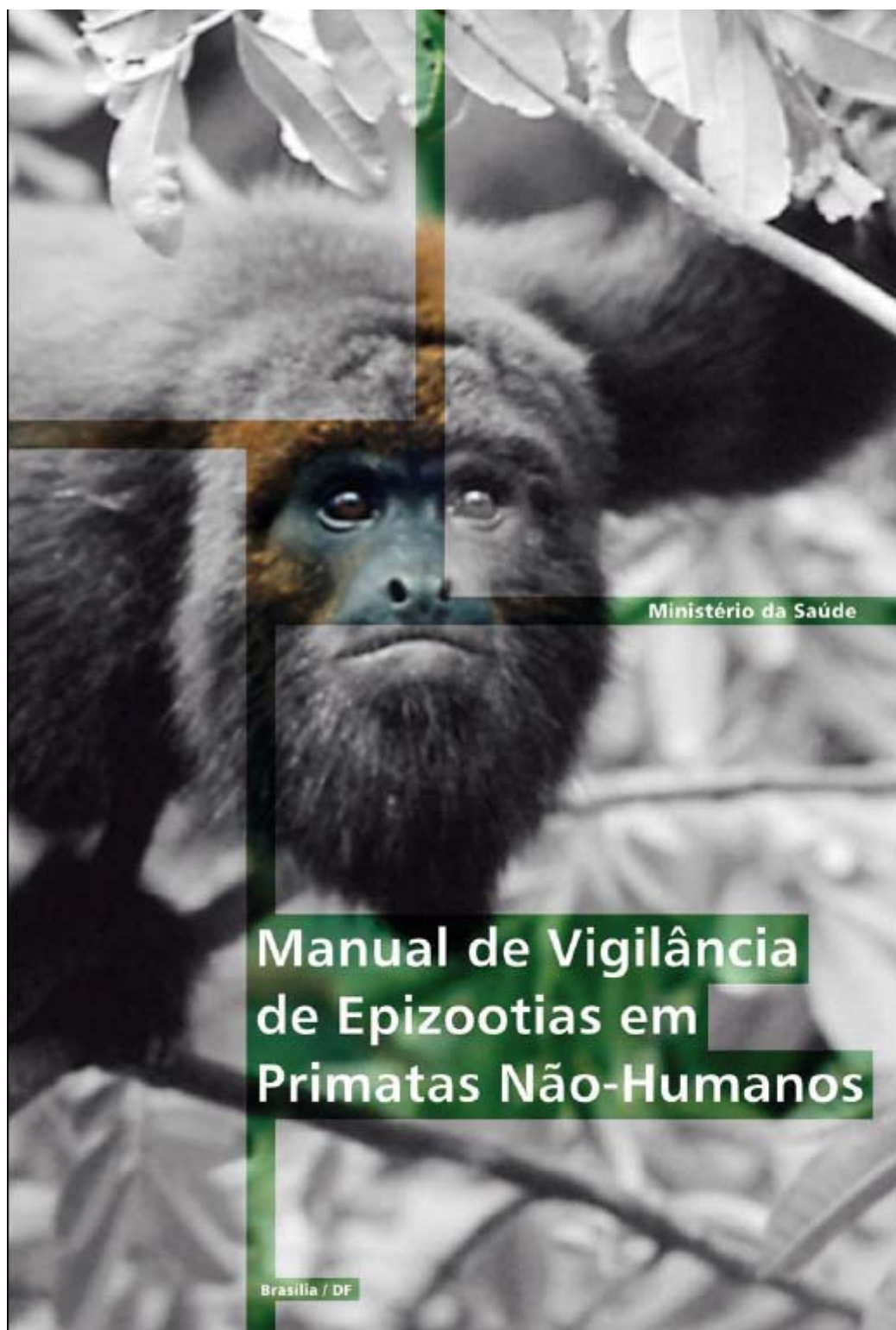
Table 1. Results of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum samples from *Cebus* spp. and *Alouatta caraya* obtained after the modified agglutination test performed.

	MAT		P values
	Positive (%)	Negative (%)	
Sex			
Male	28 (70.0)	12 (30.0)	0.37
Female	14 (56.0)	11 (44.0)	
Age			
Juvenile	17 (94.5)	1 (0.05)	<0.005
Sub-adult	5(50.0)	5 (50.0)	
adult	20 (54.0)	17 (46.0)	
Specie			
<i>Cebus</i> spp	10 (52.6)	9 (47.4)	0.31
<i>Alouatta caraya</i>	32 (69.6)	14 (30.4)	
Total (%)	42(64.6)	23 (35.4)	

¹Odds Ratio and 95% Confidence Limits ²Mantel-Haenszel Chi-square ³Fisher Exact NC = not calculated

4. Discussion

Toxoplasmosis in New World monkeys has been commonly described in the acute form (4). We reported the first serum occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in wild capuchin monkeys and in wild black and golden howler monkeys (5). After that report we obtained more monkey serum samples which are described here. The results from the studies are complementary, however higher



Apresentação

O presente *Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos*, lançado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, traz aos interessados na temática informações técnicas abrangentes e normas e condutas para o desenvolvimento de estudos visando, primordialmente, prevenir a ocorrência de casos humanos de febre amarela com vistas à redução de sua morbimortalidade – e, secundariamente, a investigação das epizootias.

As ações ora propostas basearam-se em experiências desenvolvidas na organização e execução de atividades voltadas à detecção precoce da circulação do vírus da febre amarela em ambiente silvestre, em primatas não-humanos e em vetores.

Sua leitura atualizará os profissionais de saúde nos conhecimentos acerca dos aspectos epidemiológicos, características e distribuição geográfica dos primatas não-humanos, realização de necropsia em campo, colheita de material biológico, análise e divulgação dos dados, medidas de controle da febre amarela e diretrizes para o estabelecimento da vigilância entomológica e de epizootias.

Esperamos que sua ampla divulgação nos serviços de vigilância das diversas secretarias estaduais e municipais de saúde efetivamente contribua para uma melhor estruturação e implementação das ações de vigilância e controle da febre amarela silvestre no Brasil.

Jarbas Barbosa da Silva Júnior
Secretário de Vigilância em Saúde

Equipe de elaboração

Ângela Maron de Mello – Funasa/Core/PR
Cristiana Toscano – Opas/Brasil
Francisco Acácio Alves – colaborador
José Augusto Pereira Carneiro Muniz – Centro Nacional de Primatas/SVS
Maria Amélia Nascimento Torres – SES/RS
Otávio Pinheiro de Oliva – Opas/Washington–USA
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos – IEC/SVS/MS
Rodrigo del Rio do Valle – colaborador
Vera Lúcia Carvalho da Silva – SVS/MS
Vera Lúcia Reis Souza de Barros – IEC/SVS
Walfrido Kuhl Svoboda – Universidade Federal do Paraná
Zouraide Guerra Antunes Costa – SVS/MS

Revisão técnica

Almério de Castro Gomes – Departamento de Epidemiologia/USP/SP
Ângela Maron de Mello – Funasa/Core/PR
Dionéia Garcia – SES/PB
Eduardo Hage Carmo – SVS/MS
Maria Amélia Nascimento Torres – SES/RS
Rodrigo del Rio do Valle – USP/SP
Rosely Cerqueira de Oliveira – SVS/MS
Talita Leal Chamone – SES/MG
Vera Lúcia Carvalho da Silva – SVS/MS
Wanderson Kleber de Oliveira – SVS/MS
Zouraide Guerra Antunes Costa – SVS/MS



Secretaria Estadual de Saúde do Paraná - SESA/PR

Guia Prático de Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) no Estado do Paraná

(Adaptado do Manual de Vigilância de Epizootias em PNH do Ministério da Saúde, Brasília, 2005)

- VERSÃO PRELIMINAR -

Curitiba / PR

!!! VERSÃO PRELIMINAR !!!

GUIA PRÁTICO PARA VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH) NO ESTADO DO PARANÁ

(Adaptado do Manual de Vigilância de Epizootias em PNH do Ministério da Saúde, Brasília, 2005)

APRESENTAÇÃO

A partir de 2000/2001, a febre amarela silvestre venceu novas fronteiras, atingindo os Estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Até então, sua ocorrência estava restrita à região Amazônica. A expansão geográfica da doença na forma de epizootias e epidemias acarretaram maior risco à população rural assim como à reurbanização da doença, inclusive para o Estado do Paraná.

O presente "Guia Prático para Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos no Estado do Paraná" é o resultado de um trabalho inédito no Brasil para o monitoramento da febre amarela, outras arboviroses e zoonoses de interesse na região noroeste do Paraná, mais especificamente, no município de Porto Rico a partir de 2001. É fruto de pesquisas interdisciplinares envolvendo a Secretaria Estadual de Saúde do Paraná e outras instituições como a Universidade Federal do Paraná e Universidade Estadual de Londrina. O documento aborda desde os aspectos epidemiológicos das principais zoonoses associadas aos primatas não humanos, às características biológicas e distribuição geográfica desses animais no Estado do Paraná. Além disso, descreve detalhadamente todos os procedimentos para captura, contenção, colheita de material, necropsia e técnicas de biossegurança específicas para a vigilância de epizootias em PNH.

Este manual é, portanto, o instrumento básico para a implantação e desenvolvimento de um sistema de vigilância epidemiológica sensível e oportuno para a febre amarela no Paraná, preenchendo uma grave lacuna na vigilância dessa doença que até o momento vem sendo desenvolvida exclusivamente na população humana.

Natal Jataí de Camargo

Diretor do Centro de Saúde Ambiental / SESA-PR

ORGANIZAÇÃO:

Walfrido Kühn Svoboda – UFPR Campus Palotina e UEL/PR

EQUIPE DE ELABORAÇÃO:

Adilson Braz Seocorun – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

Allan Martins da Silva – SESA/PR

Ana Paula F. R. Bracarense – DMVP – CCA – UEL/PR

Ângela Maron – CPPI – SESA/PR

Carmen Lúcia Scortecci Hilst – DCV – CCA – UEL/PR

Edilson Colhera Cristóvão – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

Fernando de Camargo Passos – DZ – SCB – UFPR

Gabriela Ludwig – Colaborador

Gonçalves Beletato – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

Gustavo Monteiro Teixeira – FAP/PR

Italmar Teodorico Navarro – DMVP – CCA – UEL/PR

João Donizette Medina – CALI – SESA/PR

José Carlos Leite Júnior – CPPI – SESA/PR

José do Parto dos Santos – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

José Luiz Filho – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

Kledir Anderson Hofstaetter Spohr – DMVP – CCA – UEL/PR

Lineu Roberto da Silva – CPPI – SESA/PR

Lucas de Moraes Aguiar – DZ – SCB – UFPR

Luciano de Souza Malanski – Colaborador

Marcos Massaaki Shiozawa – UEL/PR e UNOPAR/PR

Natal Jataí de Camargo – CSA – SESA/PR

Ricardo Matsuo – CPPI – SESA/PR

Valmir Ortiz da Silva – Equipe Entomologia Porto Rico – SESA/PR

Walfrido Kühn Svoboda – UFPR Campus Palotina e UEL/PR

5.2 Comitê de Ética em Experimentação Animal

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 44/2005

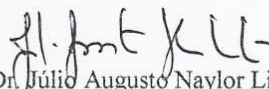
Londrina, 27 de setembro de 2005

Prezado Pesquisador

O CEEA/UUEL, reunido aos 20 de setembro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Investigação e monitoramento da circulação do vírus da Febre Amarela (FA) e outros arbovírus de interesse visando a criação de um modelo estadual de vigilância epidemiológica**", registrado no CEEA sob o nº 34/05 processo nº 17115/2005, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o aprovado para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,




Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa

Coordenador do CEEA/UUEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro
Coordenador do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias

Cópia para Paulo Sérgio Basoli (Chefe da DCA/PROPPG)

5.3 Licença para Captura/Coleta/Transporte/Exposição


 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
 Gerência Executiva Estadual do Paraná
LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA LICENÇA 104/04	N.º DE REGISTRO NO IBAMA x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x	PERÍODO DE VALIDADE 24.05.04 a 24.08.05	PROCESSO IBAMA. N.º 02017.002508/02-14
-----------------------------	-------------------------------------------------------------	--------------------------------------------	-------------------------------------------

OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUB-PRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input checked="" type="checkbox"/> OUTROS – coleta de animais silvestres atropelados nas rodovias federais, estaduais, municipais no território do Estado do Paraná.	FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS (ESPECIFICAR)
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO:
 NOME: SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE
 ENDEREÇO: RUA PIQUIRI, 170 - CEP 80.230-140 - CURITIBA PARANÁ
 RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): : EDILSON CÔLERA CRISTÓVÃO RG 3.928.112-0 Pr / CPF 523.319.119-91 E WALFRIDO KUHLMAN SVOBODA- RG - 4501.645-5 - Pr / CPF 826.531.869 - 34

PESQUISADOR/TRANSPORTADOR: EDILSON CÔLERA CRISTÓVÃO RG 3.928.112-0 Pr / CPF 523.319.119-91 E WALFRIDO KUHLMAN SVOBODA- RG - 4501.645-5 - Pr / CPF 826.531.869 - 34

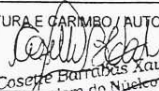
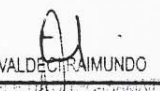
MEIO DE TRANSPORTE: TERRESTRE/AEREO

PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: TODO O TERRITÓRIO DO ESTADO DO PARANÁ

DESTINO: SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, CENTRO NACIONAL DE PRIMATOLOGIA, LABORATORIO EVANDRO CHAGAS, BELEM, PARÁ

LISTA DAS ESPÉCIES QUANT. (TIPO)	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
ANIMAIS COM SINTOMAS DE FEBRE AMARELA	MAMMALIA	MAMIFEROS

DATA DE EMISSÃO: CURITIBA, 24 DE MAIO DE 2004

ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA:

 Rivaldo Cossette Baruffis Xavier da Silva
 Diretor de Administração do Núcleo de Fauna e Flora
 Núcleo de Pesquisas IBAMA/PR

 VALDECIR RAMUNDO
 Coordenador de Licenciamento

- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO
 - ESTA LICENÇA AUTORIZA A COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA FINS DE PESQUISA CIENTÍFICA.
 - ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
 1. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO; SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO DE PESQUISA ESPECIFICADO E APROVADO PELO IBAMA;
 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO FORA DAS ÁREAS ESPECIFICADAS NESTA LICENÇA;
 3. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19.12.97; SALVO QUANDO ESPECIFICADO.
 4. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;
 5. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
 6. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS, MORTOS, PARTES E MATERIAL BIOLÓGICO.
 - SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE D.R.): INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
 - ESTA LICENÇA NÃO EXIME O PESQUISADOR DE CUMPRIR O DISPOSTO NA MEDIDA PROVISÓRIA N.º 2186-16/01, QUE VERSA SOBRE O ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO. No caso de acesso e amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da Medida Provisória n.º 2.186-16/2001 e Decreto n.º 3.945/2001.
 - VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

MOD. 09.008 1a. VIA -INTERESSADO 2a. VIA - IBAMA/PROCESSO

5.4 Normas para publicação

A. Normas para publicação no periódico – *Cadernos de Saúde Pública*



ISSN 0102-311X *versão impressa*
ISSN 1678-4464 *versão online* INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo e política editorial Apresentação do texto

Objetivo e política editorial

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais que contribuam ao estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins, como epidemiologia, nutrição, parasitologia, ecologia e controle de vetores, saúde ambiental, políticas públicas e planejamento em saúde, ciências sociais aplicadas à saúde, dentre outras.

Serão aceitos trabalhos para as seguintes seções: (1) **Revisão** - revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à saúde pública (máximo de 8.000 palavras); (2) **Artigos** - resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual (máximo de 6.000 palavras); (3) **Notas** - nota prévia, relatando resultados parciais ou preliminares de pesquisa (máximo de 1.700 palavras); (4) **Resenhas** - resenha crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.200 palavras); (5) **Cartas** - crítica a artigo publicado em fascículo anterior de CSP ou nota curta, relatando observações de campo ou laboratório (máximo de 1.200 palavras); (6) **Artigos especiais** - os interessados em contribuir com artigos para estas seções deverão consultar previamente o Editor; (7) **Debate** - artigo teórico que se faz acompanhar de cartas críticas assinadas por autores de diferentes instituições, convidados pelo Editor, seguidas de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras); (8) **Fórum** - seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual (máximo de 12.000 palavras no total).

O limite de palavras inclui texto e referências bibliográficas (folha de rosto, resumos e ilustrações serão considerados à parte).

Apresentação do texto

Serão aceitas contribuições em português, espanhol ou inglês. O original deve ser apresentado em espaço duplo e submetido em 1 via, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, com margens de 2,5cm. Deve ser enviado com uma página de rosto, onde constará título completo (no idioma original e em inglês) e título corrido, nome(s) do(s) autor(es) e da(s) respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo apenas do autor responsável pela correspondência. Todos os artigos deverão ser encaminhados acompanhados de disquete ou CD contendo o arquivo do trabalho e indicação quanto ao programa e à versão utilizada (somente programas compatíveis com Windows). Notas de rodapé não serão aceitas. É imprescindível o envio de carta informando se o artigo está sendo encaminhado pela primeira vez ou sendo reapresentado à nossa secretaria. No envio da segunda versão do artigo deverá ser encaminhada uma cópia impressa do mesmo, acompanhada de disquete.

Colaboradores

Deverão ser especificadas, ao final do texto, quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

Ilustrações

As figuras deverão ser enviadas em impressão de alta qualidade, em preto-e-branco e/ou diferentes tons de cinza e/ou hachuras. Os custos adicionais para publicação de figuras em cores serão de total responsabilidade dos autores.

É necessário o envio dos gráficos, separadamente, em arquivos no formato WMF (Windows Metafile) e no formato do programa em que foram gerados (SPSS, Excel, Harvard Graphics etc.), acompanhados de seus parâmetros quantitativos, em forma de tabela e com nome de todas as variáveis. Também é necessário o envio de mapas no formato WMF, observando que os custos daqueles em cores serão de responsabilidade dos autores. Os mapas que não forem gerados em meio eletrônico devem ser encaminhados em papel branco (não utilizar papel

vegetal). As fotografias serão impressas em preto-e-branco e os originais poderão ser igualmente em preto-e-branco ou coloridos, devendo ser enviados em papel fotográfico no formato 12x18cm.

O número de tabelas e/ou figuras deverá ser mantido ao mínimo (máximo de cinco tabelas e/ou figuras). Os autores deverão arcar com os custos referentes ao material ilustrativo que ultrapasse este limite.

Resumos

Com exceção das contribuições enviadas às seções *Resenha* ou *Cartas*, todos os artigos submetidos em português ou espanhol deverão ter resumo na língua principal e em inglês. Os artigos submetidos em inglês deverão vir acompanhados de resumo em português ou em espanhol, além do *abstract* em inglês. Os resumos não deverão exceder o limite de 180 palavras e deverão ser acompanhados de 3 a 5 palavras-chave.

Nomenclatura

Devem ser observadas rigidamente as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

Pesquisas envolvendo seres humanos

A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na Declaração de Helsinkí (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000), da World Medical Association (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>), além do atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada. Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Metodologia do artigo). Após a aceitação do trabalho para publicação, todos os autores deverão assinar um formulário, a ser fornecido pela Secretaria Editorial de CSP, indicando o cumprimento integral de princípios éticos e legislações específicas.

Referências

As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (Ex.: Silva¹). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos *Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos* (<http://www.icmje.org>).

Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

Exemplos:

Artigos de periódicos

Artigo padrão

Até 6 autores:

Barbosa FS, Pinto R, Souza OA. Control of schistosomiasis mansoni in a small north east Brazilian community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971; 65:206-13.

Mais de 6 autores:

DeJong RJ, Morgan JA, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PF, et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol* 2001; 18:2225-39.

Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 116:41-2.

Sem indicação de autoria

Cancer in South Africa [Editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

Volume com suplemento

Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 Suppl 3:1-20.

Fascículo com suplemento

Lebrão ML, Jorge MHPM, Laurenti R. Hospital morbidity by lesions and poisonings. *Rev Saúde Pública* 1997; 31 (4 Suppl):26-37.

Parte de um volume

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 3):303-6.

Parte de um fascículo

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in aging patients. *N Z Med J* 1994; 107 (986 Pt 1):377-8.

Livros e outras monografiasIndivíduo como autor

Barata RB. Malária e seu controle. São Paulo: Editora Hucitec; 1998.

Editor ou organizador como autor

Duarte LFD, Leal OF, organizadores. Doença, sofrimento, perturbação: perspectivas etnográficas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998.

Denzin NK, Lincoln YS, editors. Handbook of qualitative research. Thousand Oaks: Sage Publications; 1994.

Instituição como autor e publicador

Institute of Medicine. Looking at the future of the Medicaid programme. Washington DC: Institute of Medicine; 1992.

Capítulo de livro

Coelho PMZ. Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: Barbosa FS, organizador. Tópicos em malacologia médica. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1995. p. 208-18.

Eventos (anais de conferências)

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. In: Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Trabalho apresentado em evento

Bengtson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Coangress on Medical Informatics. Amsterdam: North Holland; 1992. p. 1561-5.

Dissertação e tese

Escobar AL. Malária no sudoeste da Amazônia: uma meta-análise [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 1994.

Outros trabalhos publicadosArtigo de jornal

Novas técnicas de reprodução assistida possibilitam a maternidade após os 40 anos. Jornal do Brasil 2004 Jan 31; p. 12.

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3.

Documentos legais

Decreto n. 1.205. Aprova a estrutura regimental do Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, e dá outras providências. Diário Oficial da União 1995; 2 ago.

Material eletrônicoCD-ROM

La salud como derecho ciudadano [CD-ROM]. Memoria del VI Congreso Latinoamericano de Ciencias Sociales y Salud. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2001.

Internet

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas da saúde: assistência médico-sanitária. <http://www.ibge.gov.br> (acessado em 05/Fev/2004).

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]

© 2006 Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz

Rua Leopoldo Bulhões, 1480

21041-210 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil

Tel.: +55 21 2598-2511 / 2598-2508

Fax: +55 21 2298-2737 / 2598-2514



cadernos@ensp.fiocruz.br

B. Normas para publicação no periódico – *Emerging Infectious Diseases*

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

For information about editorial policy visit http://www.cdc.gov/ncidod/eid/about/ed_policy.htm.

Manuscript Preparation

For word processing, use MS Word. Create tables within MS Word's table tool. Do not format tables as columns or tabs. Do not use endnotes for references. Send graphics in native, high-resolution (200 dpi minimum) .TIF (Tagged Image File) or .EPS (Encapsulated Postscript) format. Graphics should be in a separate electronic file from the text file. For graphic files, use Arial font. Convert Macintosh files into the suggested PC format.

Begin each of the following sections on a new page and in this order: title page, keywords, abstract, text, acknowledgments, first author's biographical sketch, references, tables, figure legends, and appendixes. Each figure should be in a separate file.

Title Page

Give complete information about each author (i.e., full name, graduate degree(s), affiliation, and the name of the institution in which the work was done). Clearly identify the corresponding author and provide that author's address (include phone number, fax number, and e-mail address). Include separate word counts for both the abstract and the body of the text.

Keywords and Abstract

Include up to 10 keywords; use terms listed in the [Medical Subject Headings from Index Medicus](#). Do not cite references in the abstract. Abstracts for perspectives, synopses, policy reviews, and research studies should not exceed 150 words. Abstracts for dispatches should be no more than 50 words.

Article Summary Line

Submit a clear, one-sentence summary of the article's conclusions.

Text

Double-space everything, including the title page, abstract, references, tables, and figure legends. Indent paragraphs; leave no extra space between paragraphs. After a period, leave only one space before beginning the next sentence. Use 12-point Times New Roman font and format with ragged right margins (left align). Italicize (rather than underline) scientific names when needed.

Biographical Sketch

Include a short biographical sketch of the first author (both authors if only two). Include affiliations and the author's primary research interests.

References

Follow Uniform Requirements style (see [Style Guide](#) for URL). Do not use endnotes for references. Place reference numbers in parentheses, not superscripts. Number citations in order of appearance (including in text, figures, and tables). Cite personal communications, unpublished data, and manuscripts in preparation or submitted for publication in parentheses in text. Consult [List of Journals Indexed in Index Medicus](#) for accepted journal abbreviations; if a journal is not listed, spell out the journal title in full. List the first six authors followed by "et al." Below are some examples of references that may not be listed in Uniform Requirements.

Electronic Journal Citation

Komar N, Lanciotti R, Bowen R, Langevin S, Bunning M. Detection of West Nile virus in oral and cloacal swabs collected from bird carcasses. *Emerg Infect Dis* [serial online]. 2002 Jul [cited 2002 May 30]. Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no7/02-0157.htm>

ProMed Citation

Lipkin I. West Nile-like virus: PCR primers and protocols. ProMed. October 13, 1999. Accessed at <http://www.promedmail.org>, archive number: 19991013.1826.

Published Conference Abstract Citation

Galil K, Singleton R, Levine O, Fitzgerald M, Ajello G, Bulkow L, et al. High prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) carriage among Alaska Natives despite widespread use of Hib-conjugate vaccine. In: Abstracts of the 35th Infectious Diseases Society of America; San Francisco, California; 1997 Sept 13-16; Abstract 421. Alexandria, (VA): Infectious Disease Society of America; 1997.

Tables and Figures

Tables must be created with MS Word's table tool. Using columns and tabs within the word processing program is never acceptable, and the tables will be returned to the author for proper formatting. For figures, use color only as needed; send files in native, high-resolution (200 dpi minimum) .TIF (Tagged Image File) or .EPS (Encapsulated Postscript) format; mail slides, photographs, or prints only if electronic format is unavailable. Figures should be sent in separate files and not be included with the manuscript. Use Arial for figure lettering. Figures, symbols, lettering, and numbering should be clear and large enough to remain legible when reduced. Place figure keys within the figure. For more information access and search the [EID Style Guide](#).

Manuscript Submission

To submit a manuscript, access [Manuscript Central](#). Include a cover letter indicating the proposed category of the article (e.g., research, dispatch) and verifying that the final manuscript has been seen and approved by all the authors. Complete the submission [checklist](#). After you have received acknowledgment of manuscript receipt, use assigned manuscript number in all correspondence.

Announcement Submission

To submit an announcement, send an email message to EIDEditor (eideditor@cdc.gov). In 50-150 words, describe timely events of interest to our readers. Include the date of the event, the location, the sponsoring organization(s), and a web site that readers may visit or a telephone number or email address that readers may contact for more information.

Announcements may be posted on the journal Web page only, depending on the event date.

Announcements are no longer submitted through Manuscript Central.

Types of Articles

Perspectives

Articles should be under 3,500 words and should include references, not to exceed 40. Use of subheadings in the main body of the text is recommended. Photographs and illustrations are encouraged. Provide a short abstract (150 words), a one-line summary of the conclusions, and a brief biographical sketch of first author—both authors if only two. Articles in this section should provide insightful analysis and commentary about new and reemerging infectious diseases and related issues. Perspectives may also address factors known to influence the emergence of diseases, including microbial adaptation and change, human demographics and behavior, technology and industry, economic development and land use, international travel and commerce, and the breakdown of public health measures. If detailed methods are included, a separate section on experimental procedures should immediately follow the body of the text.

Synopses

Articles should be under 3,500 words and should include references, not to exceed 40. Use of subheadings in the main body of the text is recommended. Photographs and illustrations are encouraged. Provide a short abstract (150 words), a one-line summary of the conclusions, and a brief biographical sketch of first author—both authors if only two. This section comprises concise reviews of infectious diseases or closely related topics. Preference is given to reviews of new and emerging diseases; however, timely updates of other diseases or topics are also welcome. If detailed methods are included, a separate section on experimental procedures should immediately follow the body of the text.

Research Studies

Articles should be under 3,500 words and should include references, not to exceed 40. Use of subheadings in the main body of the text is recommended. Photographs and illustrations are encouraged. Provide a short abstract (150 words), a one-sentence summary of the conclusions, and a brief biographical sketch of first author—both authors if only two. Report laboratory and epidemiologic results within a public health perspective.

Explain the value of the research in public health terms and place the findings in a larger perspective (i.e., "Here is what we found, and here is what the findings mean").

Policy and Historical Reviews

Articles should be under 3,500 words and should include references, not to exceed 40. Use of subheadings in the main body of the text is recommended. Photographs and illustrations are encouraged. Provide a short abstract (150 words), a one-line summary of the conclusions, and a brief biographical sketch of first author—both authors if only two. Articles in this section include public health policy or historical reports that are based on research and analysis of emerging disease issues.

Dispatches

Articles should be no more than 1,200 words and need not be divided into sections. If subheadings are used, they should be general, e.g., "The Study" and "Conclusions." Provide a brief abstract (50 words); references (not to exceed 15); figures or illustrations (not to exceed two); tables (not to exceed two); and a brief biographical sketch of first author—both authors if only two. Dispatches are updates on infectious disease trends and research. The articles include descriptions of new methods for detecting, characterizing, or subtyping new or reemerging pathogens. Developments in antimicrobial drugs, vaccines, or infectious disease prevention or elimination programs are appropriate. Case reports are also welcome.

Commentaries

Thoughtful discussions (500–1,000 words) of current topics. Commentaries may contain references but no figures or tables.

Another Dimension

Thoughtful essays, short stories, or poems on philosophical issues related to science, medical practice, and human health. Topics may include science and the human condition, the unanticipated side of epidemic investigations, or how people perceive and cope with infection and illness. This section is intended to invoke compassion for human suffering and to expand the science reader's literary scope. Manuscripts are selected for publication as much for their content (the experiences they describe) as for their literary merit.

Letters

Letters commenting on recent articles as well as letters reporting cases, outbreaks, or original research are welcome. **Letters commenting on articles** should contain no more than 300 words and 5 references; they are more likely to be published if submitted within 4 weeks of the original article's publication. **Letters reporting cases, outbreaks, or original research** should contain no more than 800 words and 10 references. They may have one Figure or Table and should not be divided into sections. All letters should contain material not previously published and include a word count.

Book Reviews

Short reviews (250–500 words) of recently published books on emerging disease issues are welcome. The name of the book and publisher, and the number of pages should be included, as well as price and ISBN #.

Announcements

We welcome brief announcements (50–150 words) of timely events of interest to our readers. (Announcements may be posted on the journal Web page only, depending on the event date.)

Conference Summaries

Summaries (500 to 1,000 words) of emerging infectious disease conference activities are published online only (effective January 2005). Summaries, which should contain 500–1,000 words, should focus on content rather than process and may provide illustrations, references, and links to full reports of conference activities.

VETERINARY MICROBIOLOGY

An International Journal

Guide for Authors

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Instructions for the preparation of such articles are available from the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu). Prior to submitting Review papers, authors should discuss the proposed content with the Reviews Editor.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publically accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed— if necessary — by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates —publications of the same author with one co-author — publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
 - c. *For books*

Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

d. *For multi-author books*

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object Identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.**

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Proofs

One set of proofs will be sent by e-mail to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. **Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication.** Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

1. The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (100 for Review Articles). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.
2. Additional paper offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra paper offprints.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetmic> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.