MÓNICA ROMERO SOLORIO

Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de Sauim-de-coleira
(*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas

São Paulo
2015

MÓNICA ROMERO SOLORIO

Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauíim-de-coleira (*Saguinus
bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Ferreira

Co-Orientador:

Dr. Wilson Roberto Spironello

De acordo: _____

Orientador

São Paulo 2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3045
FMVZ

Solorio, Mónica Romero

Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauíim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas / Mónica Romero Solorio. -- 2014.
54 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira.

Co-orientador: Dr. Wilson Spironello

1. Agentes infecciosos. 2. *Saguinus bicolor*. 3. Amazônia. 4. Perturbação antrópica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauíim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas", protocolado sob o nº 2226/2011, utilizando 70 (setenta) sauíim-de-coleira, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no Uso de Animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/5/2011.

We certify that the Research "Survey of infectious agents in subpopulations of pied-tamarin (*Saguinus bicolor*) in Manaus, Brazil", protocol number 2226/2011, utilizing 70 (seventy) pied tamarins, under the responsibility Prof. Dr. Fernando Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the Use of Animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/18/2011.

São Paulo, 4 de novembro de 2014.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

Autor: ROMERO SOLORIO, Mónica

Título: Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Para Julien Ernesto

AGRADECIMENTOS

A Fernando Ferreira, meu orientador por ter me acolhido mais uma vez como orientada, obrigada pela força, paciência e liberdade na escolha de decisões durante a pesquisa.

A Wilson Spironello por ter sido a pessoa que me aceitou como estudante em Manaus e ter a bendita ideia de me encaminhar com o Marcelo Gordo.

A Marcelo Gordo por ter me aberto as portas do projeto Sauim de Coleira e ter sempre me ajudado, obrigada pela paciência, pelos bons conselhos e pelo bom astral.

À equipe do Projeto Sauim de Coleira especialmente a Jefferson Barros, Benedito Monteiro, Jero e Tainara Sobroza.

A equipe do PAN Sauim de Coleira, especialmente a Dayse Campista e Diogo Lagroteria.

Aos torcerdores e defensores de primeira linha do sauim de coleira especialmente a Suelen Fonseca, Erika Schloemp e Carolina Fernandes.

Ao pessoal do Parque do Mindu, INPA, SESI, Hotel Tropical, Ibama-Cetas, Reserva Indígena Beija-flor e aos moradores que me permitiram instalar plataformas em seus quintais e que se envolveram no trabalho.

Ao pessoal que deu força nos campos: Rafael Pinto, Jefferson, Fernando Santos, Seu Raimundo, Zica e Sabbá.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia do ICB II especialmente para Edison Durigon, Angelica Campos, Jansen, Mariana, Luiz Gustavo, Luciano e Danielle, muito obrigada pela força nas análises e pela revisão do texto e as discussões filosóficas-viológicas.

Ao Professor Paulo Brandão, Professor Marcos Bryan, Giselle e o Prof. Rodrigo Soares do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, obrigada pelo apoio nas análises.

Ao pessoal do laboratório da Malária do Instituto Tropical de São Paulo, especialmente para a Dra. Karin Kirchgatter e Lilian Guimarães.

Ao pessoal da EcoHealth especialmente para Mindy Rostal e Evelyn Luciano.

Aos companheiros do LEB-VPS, obrigada pela força e pelas risadas.

A Ethan por ser meu grande companheiro.

À FAPESP pelo apoio ao projeto realizado.

RESUMO

SOLORIO, M. R. **Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas**. [Infectious agents survey in pied tamarins subpopulations in Manaus, Amazonas State]. 2014. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

Estudos tem salientado que a expansão urbana, fragmentação do habitat, desmatamento e sobreposição das áreas de vida das populações humanas e silvestres tem contribuído para o surgimento de doenças emergentes e reemergentes nas últimas décadas. A paisagem da floresta amazônica vem sofrendo constantemente a dominância antropica e como resultado suas populações silvestres encontram-se cada vez mais expostas ao contato com populações humanas e domesticas com um alto risco de transmissão de agentes infecciosos. A cidade de Manaus, localizada na Amazônia Brasileira, tem afrontado um crescimento desordenado e vertiginoso devido ao seu desenvolvimento industrial causando uma alteração constante em sua paisagem; representando um modelo potencialmente útil para entender os mecanismos de transmissão de doenças. Os primatas são as espécies evolutivamente mais próximas dos humanos e essa proximidade filogenética tem facilitado o compartilhamento de diversos agentes infecciosos. O presente estudo propõe utilizar subpopulações de sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*) que ocupam os fragmentos urbanos de Manaus como espécie sentinela, para avaliar a presença de agentes infecciosos na interface-humano primata. A pesquisa objetiva também determinar se a perturbação antrópica dos locais de estudo estaria favorecendo a transmissão desses agentes. Entre os anos 2011 e 2014 um total de 55 saúins de coleira foram capturados em 9 fragmentos florestais urbanos e 1 area controle. Análises moleculares foram realizados para detectar Rotavírus A, Hantavírus, Coronavírus, Flavivírus, Enterovírus, Influenza A, Adenovírus, Metapneumovírus, Vírus Sincicial Respiratório Humano, Parainfluenza 1, 2, 3, 4, Vírus do Oeste de Nilo e *Plasmodium spp.* Os resultados indicaram uma prevalência para Hantavírus de (4/48), Rotavírus (9/48). Pela primeira vez é detectada a presença de hantavírus em primatas neotropicais. Nossos dados indicaram que a presença de infecção estaria associada com a existência de algum tipo de impacto antrópico nos locais pesquisados. Nenhum indivíduo resultou infectado na area controle.

Palavras-chave: Agentes infecciosos. *Saguinus bicolor*. Amazônia. Perturbação antrópica.

ABSTRACT

SOLORIO, M. R. **Infectious agents survey in pied tamarins subpopulations in Manaus, Amazonas State.** [Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauí-de-coleira (*saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, estado de Amazonas]. 2014. 58 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

In past decades, numerous studies have highlighted how urban expansion, habitat fragmentation, deforestation, and superposition of human and wildlife population areas contribute to surges in emergent and reemergent diseases. As a result of continuing anthropogenic disturbance in the Amazon, wildlife populations find themselves increasingly exposed to human populations and their domestic animals, bringing higher risks of transmission of a variety of infectious agents. Manaus, located in the Brazilian Amazon, represents a potentially useful model to understand the mechanisms of disease transmission. The city has undergone a disorganized and precipitous growth with ongoing industrial development, causing constant landscape alteration. Because non-human primates are closely evolutionary related to humans they share a diversity of infectious agents. The present study proposes to use subpopulations of Pied tamarins (*Saguinus bicolor*) occupying urban forest fragments in Manaus as a flagship species to evaluate the presence of infectious agents at the human-nonhuman primate interface. It will also assess whether anthropogenic perturbation at sites favors transmission of agents within this human dominated matrix. During the period of 2011-2014 a total of 55 pied tamarins in 9 urban forest fragments and 1 control area. Molecular analyses were performed for the detection of Rotavirus, Hantavirus, Coronavirus, Flavivirus, Enterovirus, Influenza A, Adenovirus, Metapneumovirus, Syncytial Human Respiratory virus, Parainfluenza 1, 2, 3, 4, West Nile Virus and Plasmodium spp. The results indicate prevalence for Hantavirus (n =4/48) and Rotavirus (n =9/48). This is the first record of Hantavirus in neotropical primates. Data indicate that the presence of infection in the study sites could be associated with anthropogenic impact. The control area resulted uninfected.

Key-words: Infectious agents. *Saguinus bicolor*. Amazon. Anthropogenic impact.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAS E METODOS	14
2.1	LOCAL DE ESTUDO	14
2.2	LOCAIS DE AMOSTRAGEM	15
2.2.1	<i>Caracterização dos locais de amostragem</i>	17
2.3	ESPÉCIE DE ESTUDO	17
2.4	CAPTURA E MANEJO DOS SAUINS	19
2.5	COLETA DE AMOSTRAS	20
2.6	ANÁLISES DE LABORATÓRIO	20
2.6.1	<i>Pesquisa de agentes virais</i>	20
2.6.1.1	Deteção molecular de Rotavirus tipo A (RVA)	20
2.6.1.2	Deteção Molecular de Alphavirus, Enterovirus, Flavivirus, Hantavirus, Coronavirus, Virus do Oeste de Nilo e Pannel de vírus respiratórios humanos.	22
2.6.1.3	Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>primers</i>)	22
2.6.1.4	Extração de Ácidos Nucleicos Total	24
2.6.1.5	Síntese de DNA complementar (c-DNA)	24
2.6.1.5	Real-time PCR	24
2.6.1.6	Real-Time PCR primers CDC Atlanta.....	25
2.6.1.7	Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição (RT-PCR)	26
2.6.1.8	Sequenciamento	27
2.6.2	<i>Agentes parasitários</i>	28
2.6.2.1	Deteção de <i>Plasmodium spp.</i>	28
2.6.2.2	Extração de ácido nucleico total do papel filtro.....	28
2.6.2.3	Extração do ácido nucleico total do FTA card - Nested-PCR	29
2.6.2.4	Reação em cadeia polimerase aninhado.....	29
3	RESULTADOS	31
3.1	LOCAIS DE AMOSTRAGEM	31
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM	31
3.3	CAPTURA DOS SAUINS	32
3.4	COLETA DE AMOSTRAS	32
3.5	RESULTADOS DAS ANÁLISES	33
4	DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos do século XX, o incremento da ocorrência de doenças infecciosas emergentes e reemergentes tem sido reportada em diversas partes do mundo (WEISS; MICHAEL., 2004). Em média três ou quatro novas espécies de patógenos são detectados na população humana a cada ano (WOOLHOUSE et al., 2012), sendo que a maioria destes patógenos emergentes ocorrem na interface humano-animal. Os patógenos zoonóticos representam aproximadamente 60% de todos os patógenos conhecidos que causam infecção nos seres humanos (GORTÁZAR et al., 2014) e tem sua origem em populações domésticas e silvestres (TAYLOR et al., 2001).

A mudança da paisagem e as consequentes alterações ecológicas seriam um dos fatores que teria favorecido essa situação (PATZ et al., 2000; MURRAY; DASZAK, 2011; DAZSAK et al., 2001). Por exemplo, pesquisas recentes têm evidenciado que a fragmentação, perda da biodiversidade e a expansão urbana estariam associadas ao risco de incremento da doença de Lyme (SCHMIDT; OSTFELD, 2001). Outro exemplo é o estabelecimento de criadouros de porcos próximos de áreas de floresta tropical na Malásia o que causou a transmissão do vírus Nipah de morcegos frugívoros (*Pteropus spp.*) a porcos e depois a pessoas que criavam os porcos e que derivou no surto em 1998 (CHUA et al., 1999).

A convivência entre os seres humanos e os primatas não humanos se remonta há séculos, porém essa interação tem mudado radicalmente nas últimas décadas (CHAPMAN et al., 2005, WOLFE et al., 1998). Conforme o avanço da perturbação antrópica, as populações de primatas de vida livre tem sido obrigadas a uma coexistência próxima de assentamentos humanos, causando um declínio das suas populações devido à perda de seu hábitat e pela caça.

Do ponto de vista sanitário, a transformação constante da paisagem favorece o contato cada vez mais frequente e próximo de populações primatas e humanas, de forma que existe um incremento no risco da transmissão de doenças entre as duas populações. Essa semelhança na suscetibilidade a determinados patógenos tem feito dos primatas não humanos modelos ideais de laboratório, para entender a dinâmica de determinadas doenças, tratamento e vacinas (WOLFE et al., 1998). Pelo mesmo motivo é fundamental o desenvolvimento de

estudos direcionados a compreender como a mudança da paisagem altera a dinâmica das populações humanas e de primatas, criando processos ecológicos que permitem a transmissão interespecie de agentes patogênicos, e como isto poderia representar um problema de saúde pública.

A cidade de Manaus, capital do estado de Amazonas, vem crescendo a um ritmo acelerado desde a instalação da Zona Franca no ano de 1967. Esse crescimento tem sido realizado sem um adequado planejamento urbano, sem a infraestrutura básica necessária, com proliferação de assentamentos humanos ilegais, o que vem causando uma mudança constante em sua paisagem. Como consequência, sua antiga e abundante vegetação está sendo recortada em fragmentos florestais remanescentes, os quais são intensamente explorados (GORDO, 2012).

Nesse estudo vamos a utilizar como modelo o *Saguinus bicolor*, conhecido localmente como Sauim de Coleira ou Sauim de Manaus. O sauim de coleira é endêmico da região de Manaus, incluindo os municípios de Itacoatiara e Rio Preto da Eva. Uma parte de sua população habita áreas de mata primária, enquanto outra parte encontra-se confinada nos fragmentos florestais urbanos de Manaus, mantendo um estreito contato com populações humanas e domésticas.

O presente projeto propõe utilizar as subpopulações de Sauim de Coleira que habitam os fragmentos florestais urbanos como espécie sentinela para avaliar a ocorrência de viroses emergentes e agentes parasitários na interface humano-primata, com o intuito de compreender a dinâmica de transmissão e compartilhamento destes agentes infecciosos entre as populações humanas e as populações de sauim de coleira.

2 MATERIAS E METODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

O desenho amostral foi desenvolvido para o Município de Manaus. Adicionalmente foram incluídos na amostragem os Municípios de Rio Preto da Eva e Itacoatiara como pontos de controle do estudo.

O município de Manaus, capital do estado do Amazonas, é considerado o centro financeiro, corporativo e econômico da Região Norte do Brasil por abrigar o polo industrial e agropecuário da Zona Franca de Manaus. Encontra-se localizada às margens da confluência do Rio Negro e Solimões. Com uma extensão de 11.401.092 km², Manaus é considerada a cidade mais populosa da Amazônia com população estimada em 2014 de 2.020.301 habitantes (IBGE, 2014).

A cobertura vegetal da região de Manaus é mata tropical úmida, correspondendo a florestas densas com árvores emergentes e alta diversidade (GORDO, 2012). A estação mais chuvosa vai de dezembro a abril, com temperatura média mensal de 23° C e umidade relativa entre 85 e 90%. A estação menos chuvosa vai de julho a setembro, com temperatura média mensal de 28° C e umidade relativa entre 75 e 80% (RIBEIRO, 1976; GORDO, 2012).

O município de Rio Preto da Eva situa-se a 85 km ao norte de Manaus. Possui uma extensão de 5.813.225 km² e abriga uma população de 29.771 habitantes (IBGE, 2014). Rio Preto da Eva possui predominantemente áreas rurais fazendo parte em 60% do polo agropecuário da Zona Franca de Manaus. O município de Itacoatiara, localizado a 180 km a leste da cidade de Manaus, possui uma extensão de 8.892.038 km², com uma população de 95.714 habitantes, sendo sua principal atividade econômica a agropecuária (IBGE, 2014).

2.2 LOCAIS DE AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado em locais onde era notificada e confirmada a presença da espécie, sendo desenvolvido um levantamento prévio para obter dados como: número aproximado de grupos de saúns por local, número aproximado de indivíduos por grupo, área de vida utilizada e lugares de passagem dos animais no local.

A amostragem foi iniciada em 2011 e finalizada em 2014 tendo sido desenvolvida em 21 locais: 12 fragmentos florestais urbanos, quatro áreas protegidas distribuídas no interior da zona urbana de Manaus e, adicionalmente, cinco pontos de controle localizados na periferia da área urbana de Manaus e nos municípios de Rio Preto da Eva e Itacoatiara (Figura 1)

Figura 1 - Locais de amostragem na zona urbana e pontos controle

Fonte: Rohe (2006) adaptado por Gordo (2008)

Os locais amostrados foram: 1) UFAM, 2) Sesi, 3) INPA, 4) CIGS, 5) Nova Cidade, 6) Cidade Nova, 7) Castanheiras, 8) Parque Estadual Sumauma, 9) Francisca Mendes, 10) Escola Agrotécnica, 11) Parque Municipal Nascentes do Mindú, 12) Parque Municipal Mindú, 13) Novo Aleixo, 14) Reserva Adolfo Ducke (Ducke), 15) Hotel Tropical, 16) SUFRAMA, 17) Reserva Indígena Beija Flor-Rio Preto da Eva, 18) Fazenda privada-Rio Preto da Eva, 19) Propriedade particular-Rio Preto da Eva, 20) Fazenda privada-Itacoatiara, 21) Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos. Os primeiros 16 locais foram amostrados na zona Urbana de Manaus (Figura 2).

Figura 2. Locais de amostragem na Zona Urbana de Manaus

Fonte: Romero (2014)

2.2.1 Caracterização dos locais de amostragem

Foi realizada uma caracterização dos locais pesquisados com o intuito de avaliar o impacto antrópico: invasões, queimadas, desmatamento, exploração de frutos, despejo de lixo, e abertura de estradas.

2.3 ESPÉCIE DE ESTUDO

Saguinus bicolor, conhecido localmente como sauim de coleira ou sauim de Manaus (Figura 2), pertence à família Callitrichinae. Esta espécie tem sido catalogada atualmente como “Em Perigo” pela União Internacional para Conservação de Natureza (IUCN, 2014), e como “Criticamente em Perigo” (CR) na ultimo processo Avaliação do Risco de Extinção da Fauna Brasileira (Portarias MMA nº444/2014 e nº 445/2014) em decorrência do declínio da sua população nos últimos 18 anos. O *Saguinus bicolor* é a espécie de primata que possui a distribuição mais restrita da Amazônia, abrangendo parte dos municípios de Manaus, Rio Preto da Eva e Itacoatiara (AYRES et al., 1982; GORDO, 2012). Não obstante, nos últimos anos têm sido documentada uma redução na sua área de vida possivelmente causada por competição com *Saguinus midas* (SUBIRÁ, 1998; ROHE, 2006).

Figura 2 - Exemplar de *Saguinus bicolor* conhecido localmente como sauim-de-coleira

Fonte: Mónica Romero Solorio (2013)

As principais ameaças que afetam a preservação desta espécie são a destruição e fragmentação da floresta principalmente na área urbana de Manaus e ao longo das estradas que se irradiam a partir do perímetro urbano. Atropelamentos, choques elétricos, tráfico, ataque de animais domésticos, são outras das ameaças concomitantes que os sauins de coleira enfrentam continuamente (GORDO, 2012). Neste âmbito, varias sub-populações de sauim de coleira encontram-se restritas a fragmentos florestais urbanos, sendo comum encontrar grupos sobrevivendo em fragmentos degradados e de tamanho reduzido (2-10 ha) o que implicaria em uma manutenção pouco saudável (GORDO, 2012).

Apesar das condições adversas, algumas populações tem se adaptado à convivência com seres humanos. Em alguns casos, os moradores lhes providenciam alimento e os sauins respondem aceitando. Essa interação social entre moradores e sauins de coleira tem facilitado em muitas ocasiões a captura de alguns grupos.

Nos últimos quinze anos têm sido desenvolvidos diversos estudos ecológicos e genéticos com as populações desta espécie em decorrência de seu status de ameaça. O Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros (CPB) tem coordenado, em conjunto com pesquisadores que trabalham diretamente com a espécie, a implementação do Plano de Ação Nacional (PAN) do *Saguinus bicolor*. Neste PAN tem sido elaboradas diversas diretrizes em prol da conservação desta espécie, sendo uma delas a -“ampliação do conhecimento sobre as condições médico-sanitárias do ambiente com implicações na conservação da espécie”-, objetivo que se encaixa perfeitamente na presente proposta.

2.4 CAPTURA E MANEJO DOS SAUINS

As capturas foram realizadas mensalmente tendo seu início no mês de dezembro do 2011 e finalizando em maio de 2014. Em cada local se instalaram duas plataformas nos lugares de passagem do grupo alvo. Durante um período de 10-15 dias, pedaços de bananas utilizados como iscas foram colocados nas plataformas. Durante esse período, os animais foram monitorados para confirmar a habituação com o alimento e o local. Previamente à captura, as iscas eram deixadas por uma semana sobre e dentro de gaiolas sem porta, fabricadas manualmente, e os indivíduos eram monitorados diariamente para verificar algum tipo de mudança comportamental pela presença de gaiolas.

No dia da captura, a ceva era colocada no interior de armadilhas engatilhadas tipo *Tomahawk*. O número de armadilhas dependia do número de animais que formavam o grupo alvo, numa proporção de 12 armadilhas para 10 indivíduos. Este procedimento vem sendo utilizado com sucesso pelo Projeto Sauim de Coleira (GORDO, 2012) e nas pesquisas de mico-leão dourado desde 1983 (BAKER; DIETZ, KLEIMAN, 1993).

Após a captura, as armadilhas eram cobertas com panos escuros para evitar o aumento de estresse dos animais. Posteriormente os animais eram imobilizados quimicamente com Cloridrato de Quetamina (0,1mg/kg) via endovenosa. O procedimento em todos os animais envolveu identificação, marcação com *microchip* subcutâneo, pesagem, sexagem, biometria e inspeção clínica externa para procurar ferimentos, infecções cutâneas e carrapatos.

As capturas foram desenvolvidas de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética Animal no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e com a autorização SISBIO nº 34227-1.

2.5 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras biológicas coletadas para pesquisa de agentes virais e parasitários foram: swab oral, retal e urogenital, além de sangue (coagulo e soro), quando possível. Adicionalmente, foram coletadas amostras de órgãos: rim, coração, pulmão, intestino delgado, fígado, cérebro, baço e secreções de um indivíduo que tinha sido capturado previamente e que foi encontrado morto por causas desconhecidas.

O sangue foi utilizado para realizar *imprints* em papel filtro Whatman (FTA® classic card) e em papel filtro comum, duas lâminas de esfregaço e duas lâminas de gota espessa. As lâminas, junto com papel filtro (armazenado a -5°C), foram transportados ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP).

Amostras de sangue, swabs oral, retal e urogenital foram coletadas em criotubos de 1,5ml contendo 500 μ L de meio de transporte viral (VTM – do inglês *Viral Transport Medium*) e foram armazenados em nitrogênio líquido para transporte até o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (ICBII-USP).

Amostras de swab retal foram coletadas em criotubos secos e foram conservadas em freezer a -20°C para depois ser transportadas em gelo seco até o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da Universidade de São Paulo (LABMAS-USP).

2.6 ANALISES DE LABORATÓRIO

2.6.1 Pesquisa de agentes virais

2.6.1.1 Detecção molecular de Rotavirus tipo A (RVA)

O diagnóstico de rotavírus A foi feito seguindo as instruções do protocolo padronizado (ASANO, 2009). A extração do ácido nucleico total das amostras de swab retal foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

Foram transferidos 14µL do RNA extraído e levado a 95°C durante 5 minutos para desnaturação do RNA, sendo estes, imersos em gelo e adicionados da combinação de reagentes para a transcrição reversa contendo 1x First Strand Buffer (Invitrogen®), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (ROT1+ROT2) E 400U de M-MLV Reverse Transcriptase® (Invitrogen®) para um volume final de 40L, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a amplificação. Para tanto, 2,5µL do cDNA foram adicionados na combinação de reagentes para PCR contendo 1xPCR Buffer® (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,25µM de cada par de *primers* (ROT1+ROT2) e (ROT1+ROT3), 1,5mM MgCl₂ e 0,5U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) para um volume final de 25µL completado com água-DEPC.

O perfil de ciclagem foi uma desnaturação inicial de 94°C/4min, seguida de 35 ciclos de 94°C/30s (desnaturação), 50°C/30s (hibridação) e 72°C/45s (polimerização), seguindo-se após o ciclo, 72°C/5min para extensão final. Após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídeo e observado sob a luz ultra-violeta.

A segunda amplificação (Hemi-nested PCR) foi feita com 12 repetições, adicionando-se 2,5µL do produto da primeira amplificação à combinação de reagentes de PCR contendo 1xPCR Buffer® (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,25µM do primer ROT1+ROT3, 1,5mM MgCl₂ e 0,5U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen®) e água ultra-pura esterilizada, para alcançar um volume final de 25µL, levando-se ao termociclador para desnaturação inicial de 94°C/4min seguida de 25 ciclos de 94°C/30s (desnaturação) 55°C/30s (hibridação) e 72°C/45s (polimerização), seguindo-se após o ciclo, 72°C/5min para extensão final. Após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídeo e observado sob luz ultra-violeta.

2.6.1.2 Detecção Molecular de Alphavirus, Enterovirus, Flavivirus, Hantavirus, Coronavirus, Virus do Oeste de Nilo e Painel de vírus respiratórios humanos.

Para a triagem e determinação da presença de vírus nas amostras analisadas, foram utilizados protocolos previamente padronizados pela equipe do ICBII/USP, pelo CDC-Atlanta e pelo Dr. Simon Anthony do Centro de Infecção e Imunidade da Universidade Columbia, Nova Iorque-NY.

2.6.1.3 Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*)

Para amplificar e sequenciar as diferentes proteínas virais das amostras, foram utilizados oligonucleotídeos descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição dos oligonucleótidos (*primers*) utilizados nos testes moleculares

Vírus / família viral	Região alvo	Sequencia 5'- 3'	Tamanho do Fragmento	Referência
Alphavirus	Gene NSp1 PCR convencional	sM ₂ W: YAgAgCDTTTTCgCAYSTRgCHW cM ₃ W: ACATRAANKgNgTNgTRTCRAANCCDAYCC	~400pb	Pfeffer et al., 1997
Enterovirus	5'UTR 446 - 640	Reverse: E1: CCTCCggCCCCTgAATg Forward: E1A: ACCggATggCCAATCCAA	~200pb	Prof ^a Dr ^a Dolores Merneht
	Gene VP3/VP1 Nested-PCR	224/FWD (VP3): GCIATGYTIGGIACICAYRT 222/RVS (VP1): CICCIGGIGGIAYRWACAT	992pb	Nix, 2006
		AN89/FWD (VP1): CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG AN88/RVS (VP1): TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	350-450 bp	
Flavivirus	Gene NS5	sFG ₁ : TCAAggAACTCCACACATgAgATgTACT cFG ₂ : gTgTCCCATCCTgCTgTgTCATCAgCATAC	~1000pb	Fulop et al., 1993
	Gene NS5 PCR convencional	Flavi-FWD: TGYRBTTAYAACATGATGGG Flavi-RVS: GTGTCCCAICCNCGNTRTC	270pb	Moureau <i>et al.</i> , 2007
Hantavirus	Gene Real-time PCR	Forward: CCC TGT TGG ATC AAC TGG TTT TG Reverse: GATGACGTTAACAAGAGCACATTACA cORO: TgA ACC CTA TgC ATC T	217pb	Araújo et al., 2011
Coronavirus	Nested PCR	Forward: 5'-GGKTGGGAYTAYCCKAARTG-3' Reverse: 5'-TGYTGTSWRCARAAYTCRTG-3'	440pb	Adaptado de Chu et al., 2011 por Goes LGB (2014) dados ainda não publicados
		Round 2 (Nested) Forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' Reverse: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3'		
Vírus do Oeste do Nilo	One-step Real-Time PCR	SEQ1F: GCGATCTCTCCACCAAAGCT SEQ1R: TGGGTCAGCACGTTTGTCAT sonda SEQ1M1: FAM-CCATGGGAGAAGCTCACA 5 NFQ	68pb	Ometto et al., 2013
Painel de Vírus Respiratórios Humanos	Real-Time PCR primers CDC-Atlanta	Influenza virus A – IA Influenza virus B – IB Vírus Respiratório Sincicial – RSV Metapneumovirus – MPV ParaInfluenza virus 1 – PIV 1 ParaInfluenza virus 2 – PIV 2 ParaInfluenza virus 3 – PIV 3 ParaInfluenza virus 4 – PIV 4 Adenovirus		Sakthivel, et al., 2012.
Adenovirus	PCR	FLTR: TIMGNGGIGGIMGNTGYTAYCC RTR: GTDGCRAAISHICCRTABARIGMRTT	550pb	Wellehan., 2004
	Nested-PCR	Round 2 (Nested) FNR: GTITWYGAYATHGTGYGGHATGTAYGC RNR: CCAICCBDRTRTGTGIARIGTRA	320pb	
Influenza	PCR	FLUAV-MU44: GTCTTCTAACCGAGGTGCAACG FLUAV-M-L287: GCATTTTGGACAAAGCGTCTACG	240pb	Anthony et al., 2012

2.6.1.4 Extração de Ácidos Nucleicos Total

As amostras foram submetidas ao processo de extração de material genético, ácido nucleico total, no equipamento de extração automatizado NucliSens-*EasyMag* BioMerieux, seguindo instruções do fabricante. O material extraído foi ressuspenso em 60 μL de Tampão de Eluição NucliSens (BioMerieux Corporation, França).

2.6.1.5 Síntese de DNA complementar (c-DNA)

A reação de transcrição reversa (RT-PCR), para a obtenção de cDNA randômico, foi realizada com o auxílio do *High Capacity cDNA Archive kit*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), onde 50 μL de RNA extraído são diluídos em mix contendo 10 μL de *Random primers* 10X, 10 μL tampão da RT 10X, 250 U de *MultiScribe RT enzyme*, 4 μL de *dNTP mix* [100mM], 1 U de inibidor de Ribonuclease (RNase OUT® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e água DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar o volume de 100 μL . A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos e 37 °C por 120 minutos no termociclador *MasterCycler personal Eppendorf*® (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). O cDNA foi utilizado para a amplificação e posteriormente armazenado a -70 °C.

2.6.1.5 Real-time PCR

Foi usado o kit SYBR® Green PCR *Master Mix* 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) para a amplificação em tempo real (qPCR) seguindo instruções do fabricante. Para um volume final de 50 μL de reação, serão utilizados 25 μL do SYBR® (Master Mix contendo Taq DNA polimerase, tampão de reação, dNTP Mix e corante SYBR® Green), 1 μL de cada primer (concentração 10pmol), 5 μL do RNA ou cDNA e 18 μL de H₂O DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

As condições de termociclagem do equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) foram descritas nas referências contidas no Quadro 1 com temperatura inicial de 45°C por 10 minutos, seguido de preaquecimento de 95 °C por 10 minutos e 42 ciclos, cada um deles composto de 15 segundos a 95 °C para denaturação do DNA molde, 20 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C e/ou descritos por Spackman et al. (2003) com preaquecimento de 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos com 15 segundos a 95°C e 1 minuto 60°C.

A identificação dos produtos gerados é determinada como positivo após a aplicação da curva de dissociação gerada a partir da análise da Temperatura de *melting* (T_m) pelo incremento da temperatura de 60°C até 90°C, com taxa de transição linear de 0,1°C por segundo.

2.6.1.6 Real-Time PCR primers CDC Atlanta

Com a finalidade de detectar os vírus respiratórios com mais sensibilidade e especificidade, foi realizada a Reação da Cadeia mediada pela Polimerase em Tempo Real com o protocolo utilizado e padronizado pelo Centro de Controle de Doenças Infecciosas (CDC - *Center Disease Control and Prevention – Atlanta/USA*), para diagnóstico molecular de Influenza A e B (FluA, FluB) (Kit Influenza A, B and A/H1N1 Primer and Probe Set Invitrogen - Carlsbad, CA, USA); Parainfluenza 1, 2, 3 e 4-HPIV e Metapneumovírus Humano-hMPV; Vírus Respiratório Sincicial humano-hRSV (FRY et al., 2010) e Adenovírus-hAdV.

Os testes foram realizados com o sistema TaqMan® AgPath-ID One-Step RT-PCR kit *AMBION* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) para a amplificação em tempo real (qPCR) seguindo instruções do fabricante. Para um volume final de 15 µL de reação, foram utilizados 5 µL do (Master Mix® contendo tampão de reação, dNTP Mix e corante ROX®), 0,3 µL de cada *primer* (concentração 25X), 0,3 µL da sonda (concentração 25X), 0,3 µL de enzima (concentração 25X), 5 µL do RNA extraído e 1,21 µL de H₂O DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

As condições de termociclagem do equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) foram: temperatura inicial de 45°C

por 15 minutos, seguido de preaquecimento de 95 °C por 10 minutos e 45 ciclos, cada um deles composto de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 55 °C.

2.6.1.7 Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição (RT-PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados 50 ng de cDNA diluídos em tampão de reação 10 mM tris-HCl (pH 9.0), 50 mM de KCl (PCR *buffer* 10X - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1µM de cada *primer* (polaridade positiva e negativa - 50 pmoles/50µL), 1,25 U de *Taq DNA polimerase*® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e H₂O DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar um volume final de 25 µL.

As amplificações foram realizadas no termociclador *Veriti*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), com preaquecimento a 95 °C por 10 minutos, para denaturação, seguidos de um *touchdown* de dois passos sendo o primeiro de 14 ciclos, cada um deles composto de 30 segundos a 95 °C para denaturação do DNA molde, 30 segundos a 65 °C (com incremento de -1°C a cada ciclo) para emparelhamento dos *primers* e 60 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias, seguidos de 34 ciclos, cada um deles composto de 30 segundos a 95 °C para denaturação do DNA molde, 30 segundos a 50 °C para emparelhamento dos *primers* e 60 segundos a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Ao final dos 49 ciclos, segue-se um aquecimento a 72 °C por 7 minutos de extensão final.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a 1,5% em tampão TBE 1x (89 mM - tris HCl; 89 mM H₃BO₃; 2 mM Na₂ EDTA, pH 8,3 - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Edt Br-Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, Estados Unidos). Uma mistura de 10 µL de produto amplificado e 2 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi aplicada no gel de agarose e submetido então à eletroforese, em cuba horizontal, em tampão TBE 1x (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) durante 45 minutos a 100 volts. A visualização do gel foi realizada sobre transluminador de luz ultravioleta (UV), sendo os resultados comparados aos controles positivos, negativos e aos marcadores de peso molecular (500bp, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), sendo a seguir fotodocumentados.

Para produtos amplificados que apresentarem fragmentos inespecíficos o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit®* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a partir da excisão do fragmento do gel de agarose, seguindo as instruções do fabricante foi utilizado. Para produtos amplificados que apresentaram fragmentos únicos, a purificação do produto de PCR foi realizada com o sistema *ExoSAP-IT®* (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd - USB Corporation, Cleveland, OH, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante.

2.6.1.8 Sequenciamento

Após a amplificação, as fitas de DNA foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o kit comercial *BigDye™ terminator – cycle sequencing read reaction – Applied Biosystems®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

Em um microtubo contendo cerca de 10-30 ng de produto de PCR, foram adicionados 2 µL de Tampão *Save Money 5X* (Tris HCl 200 mM pH 9,0 e 5mM MgCl₂), 3.2 pMol/µL do *primer*, 2 µL do kit *ABI PRISM Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye v3.1®)* Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) e água DEPC® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para completar um volume final de 10 µL. Este procedimento foi efetuado separadamente para cada um dos *primers*.

A mistura homogeneizada foi levada ao termociclador *MasterCycler Gradient Eppendorf®* (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), pré-aquecido a 96 °C por 5 minutos, para desnaturação da fita de DNA, seguido de 25 ciclos, cada um deles composto de 10 segundos a 96 °C para desnaturação do DNA molde, 15 segundos a 50 °C para emparelhamento dos *primers* e 4 minutos a 60 °C para extensão da nova fita de DNA.

O produto obtido foi purificado, visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos terminadores presentes na reação, com o kit *Applied Biosystems Big Dye® X-Terminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante .

O sobrenadante foi então submetido à eletroforese em polímero POP7® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), utilizando sequenciador automático ABI-PRISM modelo 3130xl® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As amostras foram traqueadas automaticamente utilizando *software* do Analisador Automático de DNA *ABI Prism* modelo 3130xl. As sequências de nucleotídeos foram analisadas, com o programa BlastN disponível no site do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências.

2.6.2 Agentes parasitários

2.6.2.1 Detecção de *Plasmodium spp.*

Os *imprints* coletados em papel filtro e FTA Card foram utilizados para o diagnóstico de laboratório de *Plasmodium spp.*

2.6.2.2 Extração de ácido nucleico total do papel filtro

Utilizando uma pinça e tesoura previamente desinfetada com hipoclorito de sódio 2% e DH20, um disco de 2mm de diâmetro foi removido e colocado no interior de um microtubo de 1,5 ml. Em cada microtubo foi adicionado 1 ml de PBS com 0,5% de Saponina para ser depois agitada várias vezes no vórtex e incubadas a 37°C por uma hora e 30 minutos.

Cada microtubo foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 g e o PBS foi retirado deixando apenas o papel filtro. Imediatamente foram adicionados 1 ml de PBS autoclavado em cada microtubo e se incubou a 4°C por 30 minutos. Os microtubos foram centrifugados outra vez por 2 minutos a 10.000 g, retirando o PBS e deixando apenas o papel filtro para adicionar 200 µL do seguinte *mix*: 50 µL de PBS+Chelex 20%+150 µL de DH20 -

previamente aquecido a 100°C. Os tubos foram agitados vigorosamente no vórtex durante 30 segundos e deixados a 100°C durante 10 minutos, sendo agitados mais uma vez durante a incubação e mais uma vez no final.

Posteriormente os microtubos foram centrifugados mais uma vez por 2 minutos a 10.000 g e o sobrenadante transferido para outro microtubo seco. Repete-se o passo de adicionar 200 µL do *mix*, para logo agitar vigorosamente no vórtex durante 30 segundos e deixar a 100°C por 10 minutos agitando durante a incubação e no final e para finalizar centrifugar por uma última vez por 2 minutos a 10.000 e transferir o sobrenadante para o novo tubo evitando transferir o Chelex. Finalmente as amostras foram guardadas a -20°C. Para a reação do PCR foram utilizados 1 µL de cada microtubo (BERECZKY et al., 2005).

2.6.2.3 Extração do ácido nucleico total do FTA Card

A extração do ácido nucleico total dos FTA® cartões foi realizada utilizando-se o protocolo do comerciante.

2.6.2.4 Reação em Cadeia de Polimerase aninhada - Nested-PCR

Para a reação de PCR foram utilizados 50 µL de cDNA diluídos em tampão de reação 20 mM tris-HCl, 50 mM de KCl, 2 mM MgCl₂, 125 µM de cada dNTP, 250µM de cada *primer* (rPLU1 e rPLU6R) (SNOUNOU et al., 1993) e 0,4 U de *Taq DNA polimerase*® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). As amplificações foram realizadas seguindo quatro fases: 1) preaquecimento a 95 °C por 5 minutos, 2) desnaturação, a 95°C por 1 minuto 3) aninhamento a 58°C por 2 minutos 4) extensão a 72°C por 2 minutos. As fases 2-4 foram repetidas 25 vezes e a fase 4 é repetida por 5 minutos (SINGH et al., 1999).

Um microlitro do produto da primeira amplificação foi utilizado como *DNA template* para cada um dos 25 mL da segunda amplificação aninhada. A concentração dos 2 *primers* aninhados e outros constituintes foram idênticos à primeira amplificação aninhada. As condições da segunda amplificação aninhada foram idênticas àquelas da primeira, exceto a

temperatura de aninhamento no passo 3, que foi de 64°C para os *primers* gene-específicos (rPLU3 e 4).

Os produtos de PCR da segunda amplificação foram analisados por eletroforese em gel agarose a 1% tingido com 5 x 10⁵ ácido nucleico GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). A visualização do gel foi realizada sobre transluminador de luz ultravioleta (UV), sendo os resultados comparados aos controles positivos, negativos e aos marcadores de peso molecular (500bp, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos), sendo a seguir fotodocumentados (DOS SANTOS et al., 2009).

3 RESULTADOS

3.1 LOCAIS DE CAPTURA

O sucesso de captura foi obtido em nove locais urbanos: 1) UFAM, 2) SESI, 3) INPA, 5) Nova Cidade, 9) Francisca Mendes, 12) Parque Municipal Mindú, 14) Reserva Florestal Adolfo Ducke, 15) Hotel Tropical, 16) SUFRAMA (Figura 3), e um ponto controle: 21) Escola Agrícola Rainha dos Apóstolos, localizada na altura do km 24 da BR-174. Foi incluído o fragmento florestal urbano do Reman devido ao fato de um sauíim atropelado procedente desse local ter sido usado no presente estudo.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE CAPTURA

A caracterização dos locais de amostragem foi baseada utilizando-se os indicadores de: área, invasão, queimada, desmatamento, despejo de lixo, caça, exploração de frutos./madeira, abertura de estrada e circulação de pessoas (Quadro 2).

Quadro 2- Caracterização dos locais de captura baseada em indicadores de perturbação antropica

Local	Área (ha)	Invasão	Queimada	Desmatamento	Despejo de lixo	Caça	Exploração de frutos /madeira	Abertura de estrada	Circulação de pessoas
UFAM	636	x			x	x	x		x
SESI	63	x	x	x	x	x	x		x
INPA	14,7								x
Nova Cidade	7,2	x		x	x		x	x	x
Francisca Mendes	6,3		x				x		
Mindú	35,3				x				x
Ducke	47323,4	x		x		x	x		x
Hotel Tropical	41,6								x
SUFRAMA	19,2								
Ponto controle	--								

3.3 CAPTURA DOS SAUINS

Foram capturados um total de 55 indivíduos (24 fêmeas e 21 machos) pertencentes a 10 subpopulações das áreas amostradas, entre adultos, juvenis e filhotes. Adicionalmente, foram incluídos dois animais que chegaram ao Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por motivo de atropelamento e apreensão, sendo amostrados então um total de 11 localidades.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS

Um total de 392 amostras biológicas (85 swabs orais, 85 swabs retais, 66 de sangue, 52 lâminas de esfregaço, 52 lâminas de gota espessa, 30 *imprints* em papel filtro, 22 *imprints* em papel filtro Whatman (FTA® classic card) procedentes de 48 indivíduos (21 fêmeas e 27 machos). Os filhotes com menos de duas semanas de vida não foram amostrados para reduzir o estresse (Figura 3)

Figura 3 - Processo de captura e coleta de amostras em saúns de coleira

Fonte: Mónica Romero Solorio (2013)

3.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES

Os resultados dos testes moleculares estão organizados na Tabela 1. Os resultados indicaram que os saúns são suscetíveis a Rotavírus A (RVA) e Hantavírus. Das 11 localidades amostradas na zona urbana de Manaus, 8 locais apresentaram indivíduos infectados com RVA ou Hantavírus: 1) UFAM, 2) SESI, 3) INPA, 5) Nova Cidade, 9) Francisca Mendes, 12) Parque Municipal Mindú, 14) Reserva Florestal Adolfo Ducke, 15) Hotel Tropical. Somente o local do Parque Municipal Mindú teve a presença de indivíduos infectados com os dois agentes patogênicos. Não teve nenhum indivíduo positivo para *Plasmodium* spp. e as outras viroses pesquisadas. Nenhum indivíduo procedente do 16) SUFRAMA, 17) Reman e do grupo controle resultou infectado (Figura 4).

Os indivíduos infectados apresentaram uma prevalência de 18,75% (9/48) para Rotavírus A, e de 9,3% (4/48) para Hantavírus. A sequência obtida dos quatro *pools* de amostras que deram positivos a Hantavírus tiveram 91% a 100 % de identidade dos nucleotídeos para Juquitiba (JUQ).

Foi testada a associação entre a presença de animais infectados em relação ao tamanho da área do local de amostragem, e os resultados foram estatisticamente não significativos. Porém, a proporção de animais infectados procedentes de locais com área menor era o dobro quando comparado com os locais de maior área.

Figura 4 - Locais urbanos amostrados com presença de indivíduos infectados com rotavírus e Hantavírus

Fonte: Gordo (2008), Romero (2014)

Tabela 1 - Resultados dos testes moleculares de todos os indivíduos amostrados

	UFAM		SESI		INPA		Nova Cidade		Francisca Mendes		P. M. Mindú		R.F.Ducke		Tropical		Suframa		Reman		controle		J		A		M		F	
	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+
Rotavirus	8	1	3	0	6	0	5	0	5	2	6	3	5	2	5	1	2	0	1	0	6	0	18	3	30	6	27	3	21	6
IA	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
IB	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
RSV	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
MPV	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
PIV 1	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
PIV 2	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
PIV 3	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
PIV 4	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Adenovirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Alphavirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Bocavirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Enterovirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Flavivirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Hantavirus	8	0	3	1	6	1	5	1	5	0	6	1	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	1	28	3	27	3	20	1
Coronavirus	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Raiva	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0
Plasmodium spp.	8	0	3	0	6	0	5	0	5	0	6	0	5	0	5	0	2	0	1	0	6	0	18	0	28	0	27	0	20	0

4 DISCUSSÃO

Os rotavirus estão classificados em sete grupos (A-G), sendo o grupo A o responsável por 90% das infecções gastroentéricas em humanos. A importância dos Rotavirus na saúde pública se deve ao fato desta virose é considerada a causa mais comum de diarreia grave em crianças pequenas em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2008) cerca de 450 mil crianças < de 5 anos morrem anualmente por infecções por rotavirus que poderiam ser prevenidas por vacinação, a grande maioria procede de países em vias de desenvolvimento (WHO, 2014). No Brasil a notificação de casos de rotavirose não é compulsória porém é considerado um importante agente de diarreia aguda em crianças pequenas, constituindo a vacinação em crianças menores de 6 meses como uma medida de controle (BRASIL, 2009).

Anticorpos contra o RVA têm sido detectados em diversas espécies de mamíferos, incluindo primatas não humanos (PETRIC et al., 1981). Pesquisas anteriores realizadas em primatas do Velho Mundo demonstraram a presença de anticorpos contra o RVA, indicando que os primatas eram suscetíveis ao vírus (AWANG; YAP, 1990). Isto foi posteriormente confirmado quando Jiang et al. (2004) detectaram anticorpos IgG para RVA em primatas neotropicais (*Cebus apella*) e do Velho Mundo.

No Brasil, no estado do Paraná e Santa Catarina, foi pesquisada a presença de RVA por técnicas moleculares em fezes obtidas de *Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya* de vida livre procedentes de fragmentos florestais urbanos, porém nenhum animal foi diagnosticado positivo (SOUZA et al., 2012).

Nenhum dos indivíduos amostrados apresentou sintomatologia compatível com gastroenterite, as fezes tinham consistência normal, sem presença de fezes diarreicas, o que poderia sugerir que a presença de RVA possa ser assintomática e não estar condicionada à presença de diarreia. Wang et al. (2007), em um estudo prévio, observaram que o RVA esteve presente em apenas 20% das fezes diarreicas coletadas de primatas.

A presença do RVA nos sauins de coleira poderia indicar que existiu a transmissão da virose e que esta possivelmente teria sido influenciada pela interação entre os sauins de

coleira e os moradores que habitam na borda dos fragmentos, permitindo a circulação e a exposição à virose entre os moradores e os saúns. Esta situação poderia representar tanto um problema de saúde pública para as populações humanas como de a saúde animal para a espécie.

Primates de vida livre têm sido infectados naturalmente com o vírus de Influenza A; estudos realizados em primatas utilizados em performances nas ruas e que habitam templos e lugares com muita circulação de pessoas, apresentaram anticorpos ao vírus (JONES-ENGEL et al., 2001; KARLSSON et al., 2012). Não se tem relatos da presença de influenza B em primatas humanos.

Não se teve nenhum resultado positivo à presença de Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) em saúns de coleira porém, em estudos prévios, a transmissão desta virose de humanos a chimpanzés resultou em surtos de doença respiratória e mortalidade na Ásia e na Europa (KONDGEN et al., 2008). O Metapneumovírus (HMPV) tem sido associado ao vírus HRSV na ocorrência de surtos envolvendo doenças respiratórias em chimpanzés (CLARKE et al., 1994; KÖNDGEN et al., 2008). Entretanto, não se tem relatos da presença do HMPV em primatas neotropicais.

No presente estudo não se detectou nenhum indivíduo positivo para Parainfluenza 1,2,3 e 4. Anticorpos contra Parainfluenza 1, 2 e 3 foram detectados na espécie *Macaca tonkeana* na Ásia. Parainfluenza 1 foi diagnosticada tanto nos primatas utilizados como animais de estimação, quanto nos de vida livre, e Parainfluenza 2 e 3 foram diagnosticadas apenas nos animais de vida livre. Todos os animais, incluindo os de vida livre, tiveram um contato próximo com populações humanas (JONES-ENGEL et al., 2001).

A presença de Adenovírus foi reportada tanto em primatas neotropicais como do Velho Mundo (KIM et al., 1967; SHROYER et al., 1979; MWENDA et al., 2005; ROY et al., 2009). O presente estudo não detectou a sua presença em nenhum dos animais amostrados porém, Hall et al. (2012) encontraram uma nova cepa de Adenovírus em *Saguinus oedipus* e, um ano antes, Wevers et al. (2011) diagnosticou Adenovírus em *Saguinus labiatus*. Isto poderia indicar que possivelmente os saúns de coleira poderiam ter susceptibilidade ao vírus pela similaridade taxonômica (WOOLHOUSE, 2012).

Nenhum dos indivíduos foi diagnosticado como positivo à presença de Alphavirus. Entre os Alphavirus de importância para o presente estudo destacam-se o vírus do Chikungunya (CHIKV) e o vírus do Mayaro (MAYV), devido a que os primatas atuam na

manutenção destes em seu ciclo silvestre. O MAYV é importante para o presente estudo porque é um arbovirus de relevância na saúde pública devido à crescente incidência de casos humanos na região amazônica por conta de alterações no meio ambiente (VASCONCELOS et al., 2001). Da mesma forma, o CHIKV é responsável por uma virose emergente, originada na África nos anos 50 e que teve um incremento de sua incidência nos últimos anos no território africano e que chegou nas Américas nos últimos anos.

No Brasil, até o 18 de outubro de 2014, foram reportados 1750 casos suspeitos de febre Chikungunya, dos quais 682 (39%) foram confirmados (BRASIL, 2014). O MAYV foi detectado na cidade de Manaus nos anos 2007-2008 como parte de um programa de vigilância em doenças febris agudas (MOURÃO et al., 2012).

Apesar de não ter indivíduos positivos à presença de Alphavirus, o sauíim de coleira é uma espécie que possui uma grande susceptibilidade por três motivos: 1) a convivência com os vectores das famílias culicídeos; 2) o grande aporte de turistas provenientes de várias partes do mundo na cidade de Manaus; 3) as contínuas alterações do meio ambiente que facilitam a transmissão dessas arboviroses. Além disso, em um estudo desenvolvido na Guiana Francesa, foi diagnosticada a seroprevalência de MAYV em *Saguinus midas*, calitriquídeo do mesmo gênero (DE THOISY et al., 2003), o que poderia indicar a possível susceptibilidade da espécie a essa virose.

Não se teve nenhum indivíduo positivo para Enterovirus. Os Enterovirus são vírus comuns nas populações humanas. Em um estudo desenvolvido na África em primatas de vida livre e cativeiro, foi descoberto que vários dos Enterovirus que afetam os humanos estavam presentes nos primatas, evidenciando que o contato próximo entre humanos e primatas facilitaria a transmissão interespecie; também foram detectadas novas espécies do vírus (SADEUH-MBA et al., 2014). A presença de Enterovirus em primatas com sintomas de diarreia foi previamente reportado (WANG et al., 2007).

O gênero Flavivírus compreende diversas espécies de vírus, sendo o da Dengue e o da Febre Amarela (FA) de especial atenção nos primatas devido a seu papel na manutenção destes. No entanto, é desconhecido o papel que os primatas podem ter na manutenção dos outros vírus que compõem o gênero dos Flavivírus (CONTIGIANI et al., 2000). O vírus amarelo é um arbovírus que tem reemergido na África e América do Sul nas duas últimas décadas. No Brasil, o ciclo urbano de FA não tem sido reportado desde 1942 (MONATH, 1997; BRYAN; BARRET, 2003).

Entre os primatas neotropicais o gênero *Alouatta* tem apresentado suscetibilidade ao vírus da FA cursando com mortalidade. Um surto recente, nos anos 2008-2009 no Rio Grande do Sul, causou a morte de 2013 primatas da espécie *Alouatta caraya* e *A. guariba clamitans*. Pesquisas revelaram que de 297 animais amostrados, 68% foram positivos ao diagnóstico de vírus amarelógeno (ALMEIDA et al., 2012). *Sapajus* spp., incluindo *S. Libidinosus*, são outras espécies que apresentaram suscetibilidade para os Flavivirus (BATISTA et al., 2013; LAROQUE et al., 2014). Porém, não se têm registros da presença de Flavivirus em saguis do gênero *Saguinus*.

O vírus da Dengue possui o mesmo vetor que o da FA: *Aedes aegypti*. O estado do Amazonas foi reinvasado pelo *A. aegypti* em 1996 (FIGUEIREDO et al., 2004) e os casos registrados no período de 1998-2013 totalizam 153.102 (BRASIL, 2014). A cidade de Manaus apresentou uma redução nos casos de dengue de 89.8% em 2014, em relação ao ano de 2013 (SEMSA, 2014). O fato de não ter nenhum sauí infectado pode estar em concordância com a ausência de primatas neotropicais que atuem como reservatórios do vírus (VASILAKIS et al., 2011).

Os resultados evidenciam que os saúins de coleira são suscetíveis à infecção por Hantavírus e que existiu a circulação deste em quatro subpopulações da espécie localizadas na área urbana de Manaus. Nas Américas este vírus é responsável pela Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH). A transmissão ocorre por meio de secreções (urina, fezes e saliva) de roedores infectados. No Brasil o Hantavírus foi diagnosticado pela primeira vez em 1993 e, até o momento, foram identificadas oito variantes em roedores silvestres: Araraquara (ARAV), Juquitiba (JUQV), Castelo dos Sonhos (CASV), Anajatuba (ANAJV), Laguna Negra (LNV), Rio Mearim, Rio Mamoré e Jabora. Destas variantes as cinco primeiras causam infecção no ser humano.

Os roedores silvestres são os reservatórios conhecidos do vírus e informações referentes à sua incidência em outras espécies são escassas. Nas Américas os roedores silvestres da subfamília Sigmodontinae são os implicados como reservatórios. No Brasil, o *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon sp* são considerados os reservatórios do vírus (SUZUKI et al., 2004). Mas um estudo feito em região de Mata Atlântica conseguiu isolar o vírus em três espécies de marsupiais: *Monodelphis ihering*, *Micoreus paraguayanus* e *Didelphis aurita* (ARAUJO et al., 2012). Na região do Amazonas, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, desenvolveu um estudo de campo epidemiológico no município de Itacoatiara, localizado a 80 km do município de Manaus, coletando roedores

silvestres após um surto de hantavirose, e detectou presença de anticorpos IgG em quatro *Oligoryzomys microtis* (DOS SANTOS et al., 2006).

No estado do Amazonas foram reportados, desde o período de 1993-2013, um total de seis casos de SCPH, dos quais dois indivíduos vieram a óbito (BRASIL, 2014). A primeira evidência de circulação de Hantavírus no estado do Amazonas foi no ano de 1991 quando, Vasconcelos et al. (1991) utilizando antígenos do vírus Seoul, detectaram a presença de anticorpos em pacientes que tinham falecido por febre hemorrágica no município de Manaus. O segundo caso foi no ano de 2004, no município de Itacoatiara, com detecção de sorologia positiva em três pessoas. Posteriormente, foi desenvolvida uma amostragem piloto em 1731 participantes em diversos municípios do estado, sendo detectada sorologia positiva em 10 indivíduos (DOS SANTOS MC et al., 2006; GIMAQUE et al., 2012).

Os Hantavírus caracterizam-se por serem vírus espécie-específicos, onde cada espécie de roedor está associada a uma determinada cepa do vírus (SUZUKI ET AL., 2004). No entanto, tem sido demonstrado que sob determinadas circunstâncias pode ocorrer transmissão interespecie (JONSSON ET AL., 2010). Estudos prévios mostram a presença de Hantavírus em outras espécies como morcegos, gatos, cães domésticos, raposa-vermelha e artiodáctilos (XU et al., 1987; KIM et al., 1994, NOWOTNY, 1994; MALECKI et al., 1998; ESCUTENAIRE et al., 2000B; AHLM et al., 2000; LEIGHTON et al., 2001; DOBLY et al., 2012;; DE ARAUJO et al., 2012).

A presença de infecção natural em primatas em cativeiro foi diagnosticada pela primeira vez na Alemanha, onde foram detectados anticorpos contra o vírus para as variantes Pumala (PUUV) e Tula (TULV) (MERTENS et al., 2011). Um caso de possível infecção com hantavírus em um orangotango em cativeiro em Borneo relatou a presença de anticorpos contra o vírus (CHEN et al., 2011). Não existem relatos da presença de Hantavírus em primatas neotropicais de vida livre.

Os quatro saúns de coleira positivos procedem de quatro subpopulações de quatro distintos locais: SESI, INPA, Parque do Mindu e Nova Cidade. Todas estas áreas estão localizadas em bairros populosos e apresentam um histórico de perturbação antrópica alto, com presença de desmatamento, fragmentação, invasões, abertura de estradas e despejo de lixo. Em um experimento desenvolvido no Panamá, foi avaliado como o efeito da perda de diversidade de pequenos mamíferos, associada à fragmentação do habitat, modificava a dinâmica da infecção de hantavirose, sugerindo que locais com maior diversidade reduziam a

taxa de contato entre hospedeiros infectados e suscetíveis (SUZAN et al., 2008).

Possivelmente, no presente estudo, os reservatórios do Hantavírus ocupam o mesmo local que os sauins de coleira porém, a mudança da paisagem e as ações antrópicas nos locais, podem ter influenciado na modificação do comportamento dos reservatórios do vírus e dos sauins de coleira, favorecendo a sobreposição de áreas de vida e compartilhamento de nicho e recursos (Figura 5). Desta forma os sauins podem ter entrado em contato com os reservatórios, ficando expostos ao vírus e facilitando/permitindo a transmissão interespécie (PATZ et al., 2004; JONSSON et al., 2010; DASZAK; MURRAY., 2013).

Figura 5 - Plataforma utilizada para cevar os sauins de coleira também era frequentada pelos marsupiais pelo alimento

Fonte: Gordo e Romero (2012)

A variante de Hantavírus encontrada nos sauins guarda similaridade com a variante JUQV. Esta tem sido identificada em *Oligoryzomys nigripes* e humanos na região da Mata Atlântica (SUZUKI et al., 2004; JONSSON et al., 2011). Sendo os primatas próximos filogeneticamente dos humanos, seria interessante entender a dinâmica evolutiva do JUQV para poder determinar como essa variante chegou a ser encontrada nos sauins de coleira na região amazônica.

Durante a amostragem, nenhum dos animais evidenciou sintomatologia compatível com hantavirose; todos os animais encontravam-se em aparente bom estado de saúde. Em monitoramentos posteriores, nada anormal foi observado: os grupos se mantiveram nos locais e com bom estado reprodutivo. A ausência de sintomatologia associada à presença de

hantavirose foi também observada nos primatas soropositivos da Alemanha (MERTENS et al., 2011).

O presente resultado evidencia que primatas neotropicais poderiam ser também suscetíveis ao vírus, mais ainda estão sofrendo algum tipo de perturbação antrópica. Pesquisas mais aprofundadas poderiam confirmar se essas espécies podem atuar como reservatórios do vírus. Por enquanto, o presente estudo só pode afirmar que a espécie teve contato com este.

Coronavírus não foi detectado nos sauins de coleira amostrados. Esta virose foi diagnosticada por Wang et al. (2007) em primatas de cativeiro do Velho Mundo, não havendo relatos da presença deste vírus em primatas neotropicais.

Os resultados revelaram que não foi detectada a presença de *Plasmodium* spp. nos sauins amostrados do presente estudo. A detecção de *P. brasilianum* e *P. simium* em primatas, e a similaridade dessas espécies com *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente implicadas na infecção de malária nos humanos, têm motivado o desenvolvimento de pesquisas com primatas pelo fato de serem considerados potenciais reservatórios (FAUNDER et al., 2000; DUARTE et al., 2008; TAZI; AYALA, 2011).

No Brasil, pesquisas da infecção natural por *Plasmodium* spp. em regiões de Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia, têm demonstrado a presença do agente em diversas espécies, sendo mais afetados *Callicebus*, *Alouatta* e *Phitecia*. Deve-se salientar que a maioria dos primatas infectados naturalmente por *Plasmodium* nesses estudos estiveram sujeitos à pressão antrópica. (FERREIRA NETO; DEANE; DE ALMEIDA, 1972; DEANE; FERREIRA NETO, 1973; DE ARRUDA, 1985; DUARTE et al., 2008; BUENO et al., 2013). Em Manaus a reintrodução da malária ocorreu em 1998, após 13 anos sem registro de autoctonia. Desde então, sua incidência tem aumentado progressivamente; este aumento estaria associado à expansão urbana e à falta de planejamento na urbanização da cidade (GONÇALVES; ALECRIM, 2004; SARAIVA et al., 2009).

A modificação do meio ambiente por efeito antrópico favorece a proliferação do *Anopheles darlingi*, principal vetor de malária no Brasil, uma vez que este tem preferência por locais situados próximos de áreas de desmatamento, ou seja, locais limítrofes entre o ecossistema original e o modificado (DEANE; CAUSEY; DEANE, 1948). A ausência de espécies de *Plasmodium* spp. nos sauins de coleira do presente estudo indica que os sauins amostrados não tiveram contato com a parasita.

Segundo o Código Ambiental Municipal de Manaus, os fragmentos florestais urbanos são espaços territorialmente protegidos, sendo que quando esses espaços albergam espécies em extinção, como o sauim de coleira, passam a ser Áreas de Preservação Permanente (APP), e atividades como caça, desmatamento, invasão e queimadas são consideradas infrações gravíssimas (Lei Municipal Ordinária nº 605/2011 de Manaus). Na caracterização dos locais de amostragem, foi evidente que a maioria dos fragmentos florestais urbanos sofreu algumas ou todas as atividades antrópicas mencionadas anteriormente.

Os primatas são evolutivamente as espécies mais próximas aos humanos e sua fisiologia, sistema imune e resposta clínica a infecções são similares. Em vida livre, a aproximação entre populações de primatas e humanos tem facilitado o compartilhamento de diversos agentes infecciosos. Os seres humanos são suscetíveis à exposição de diversos agentes como Herpesvírus B e diversos Retrovírus simianos (CHAPMAN et al., 2005), enquanto os primatas são suscetíveis ao vírus da rubéola, influenza, Adenovírus e outros vírus respiratórios (ENGEL ET AL., 2001; KARLSSON et al., 2012).

Esta situação se agrava quando a paisagem é alterada por efeitos antrópicos, facilitando o surgimento de novas epidemias e doenças reemergentes e favorecendo a transmissão interespecie de diversos agentes patogênicos (WEISS; MCMICHAEL, 2004; PATZ et al., 2009; DASZAK; MURRAY, 2013; GORTAZAR et al., 2014).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos apontaram que os sauins de coleira são suscetíveis a Rotavirus do grupo A e Hantavirus. Os animais positivos procederam de fragmentos florestais urbanos caracterizados pelo constante impacto antrópico. A sobreposição de áreas de vida e o compartilhamento de nicho e recursos poderiam ter facilitado a transmissão dos agentes infecciosos.

É necessária a continuidade de estudos mais aprofundados utilizando os sauins de coleira como espécies sentinela para poder elucidar a dinâmica da transmissão de agentes infecciosos e avaliar o efeito da fragmentação nesta transmissão.

A cidade de Manaus precisa exercer um adequado planejamento urbano no sentido de preservar os fragmentos florestais urbanos e evitar o impacto antrópico nestes locais. Isto, além de conservar a qualidade dos fragmentos para as espécies silvestres que os ocupam, poderia reduzir a prevalência de patógenos e limitar o risco de exposição humana.

REFERÊNCIAS

- ALHM, C.; WALLIN, K.; LUNDKVIST, A.; ELGH, F.; JUTO, P.; MERZA, M.; TÄRNVIK, A. Serologic evidence of Puumala virus infection in wild moose in northern Sweden. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 62, n. 1, p. 106-111, 2000.
- ANTHONY, S. J.; ST LEGER, J. A.; PUGLIARES, K.; IP, H. S.; CHAN, J. M.; CARPENTER, Z. W.; NAVARRETE-MACIAS, I.; SANCHEZ-LEON, M.; SALIKI, J. T.; PEDERSEN, J.; KARESH, W.; DASZAK, P.; RABADAN, R.; ROWLES, T.; LIPKIN, W. I. Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals. *Mbio*, v. 3, n. 4, 2012. Disponível em: < <http://mbio.asm.org/content/3/4/e00166-12> >. Acesso em: 10 Set. 2014.
- ASSANO, K. M. **Detecção simultânea de Coronavírus bovino e Rotavírus do grupo A em amostras fecais de bovinos utilizando uma multiplex hemi-nested RT-PCR**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- AWANG, A.; YAP, K. Group A rotavirus infection in animals from an animal house and in wild-caught monkey. **Journal of Diarrhoeal Disease Research**, v. 8, n. 3, p. 82-86, 1990.
- AYRES, J. M.; MITTERMEIER, R. A.; CONSTABLE, I. D. Brazilian tamarins on the way to extinction?. **Oryx**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 329-333, 1982.
- BAKER, A.; DIETZ, J. M.; KLEIMAN, D. G. Behavioural evidence for monopolization of paternity in multi-male groups of Golden lion tamarins. **Animal Behaviour**, Elsevier, v. 46, n. 6, p. 1091-1103, 1993.
- BATISTA, P. M.; ANDREOTTI, R.; DE ALMEIDA, P. S.; MARQUES, A. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; VASCONCELO, P. F. D. C. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World Primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684-690, 2013.
- BERECZKY, S.; MARTENSON, A.; GIL, P.; FÄRNET, A Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 3, p. 249-251, 2005.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica (SE) 41 e febre de chikungunya até a Se 42 de 2014. **Boletim epidemiológico**, v. 45, n. 26, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/27/BE-2014-45--26---Dengue-SE41-e-CHIKV-SE42.pdf>. Acesso em: 14 Ago. 2014.
- BRASIL. Doenças diarreicas agudas. In: _____. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília, DF, 2009. Caderno 5. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf>. Acesso em: 09 Ago. 2014.
- BRASIL. **Hantavirose, situação epidemiológica, dados**. Brasília, DF, 2014. Disponível

em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/ANEXO-HANTA-I.pdf>>.
Acesso em: 10 ago. 2014.

BRASIL. Dengue, situação epidemiológica, dados. Brasília, DF, 2014. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/31/Dengue-classica-at--2013.pdf>>.
Acesso em: 10 ago. 2014.

BUENO, M. G.; ROHE, F.; KIRCHGATTER, K.; DI SANTI, S. M. F.; GUIMARÃES, L. O.; WITTE, C. L.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; TONIOLO, C. R. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Survey of Plasmodium spp. in Free-Ranging Neotropical Primates from the Brazilian Amazon Region impacted by Anthropogenic Actions. **EcoHealth**, v.10, n. 1 p. 48-53, 2013.

BRYANT, J.E.; BARRETT, A.D.T. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.39, n. 2, p.103-118, 2003.

CLARKE, C. J.; WATT, N. J.; MEREDITH, A.; MCINTYRE, N.; BURNS, S. M. Respiratory syncytial virus-associated bronchopneumonia in a young chimpanzee. **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, n. 2 p. 207-212, 1994.

CONTIGIANI, M. S.; FERNÁNDEZ, C.; SPISANTI, L. I.; DIAZ, G. E. Prevalência de anticuerpos para flavivirus en el primate *Alouatta caraya* autóctono de la Argentina. **Medicina**, . Buenos Aires, v. 60, n. 3, p. 348-350, 2000.

CHAPMAN, C.; GILLESPIE, T.; GOLDBERG, T. Primates and the Ecology of their Infectious Diseases: How will Anthropogenic Change Affect Host-Parasite Interactions?. **Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 134-144, 2005.

CHEN, C. C.; PEI, K. C. C.; YANG, C. M.; KUO, M. D.; WONG, S. T.; KUO, S. C.; LIN, F. G. A possible case of hantavírus infection in a Borneo orangutan and its conservation implication. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n. 1, p. 2-5, 2011.

CHUA, K. B.; GOH, K. J.; KAMARULZAMAN, A.; TAN, P. S.; KSIAZEK, T. G.; ZAKI, S. R.; PAUL, G.; LAM, S. K.; TAN, C. T. Fatal encephalitis due to Nipah vírus among pig-farmers in Malaysia. **The Lancet**, v. 354, n. 9186, p. 1257-1259, 1999.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 78, n. 2, p. 103-116, 2001.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A. Malária de macacos no Estado de Goiás, Brasil: encontro de guaribas, *Alouatta caraya*, infetados com *Plasmodium brasilianum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 107-111, 1973.

DE ALMEIDA M. A.; DOS SANTOS, E.; CARDOSO, J. C.; DA FONSECA, D. F.; NOLL, C. A.; SILVEIRA, V. R.; MAEDA, A. Y.; DE SOUZA, R. P.; KANAMURA, C.; BRASIL, R. A. Yellow Fever Outbreak Affecting *Alouatta* Populations in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State). **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 1, p. 68-76, 2012.

DE ARAUJO, J.; THOMAZELLI, L. M.; HENRIQUES, D. A.; LAUTENSCHLAGER, D.; OMETTO, T.; DUTRA, L. M.; AIRES, C. C.; FAVORITO, S.; DURIGON, E. L. Detection of hantavírus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **BioMed Central**, v. 5, n.

690, p. 1-5, 2012.

GONÇALVES, M. J. F.; ALECRIM, W. D. Non-planned Urbanization as contributing Factor for Malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. **Revista de Salud Pública**, v. 6, n. 2, p. 156-166, 2004.

DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 827-965, 1948.

DE ARRUDA, M. E. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de tucuruí, Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 30, p. 367-369, 1985.

DE THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 10, p. 1326-1329, 2003.

DOBLY, A.; COCHEZ, C.; GOOSENS, E.; DE BOSSCHERE, H.; HANSEN, P.; ROELS, S.; HEYMAN, P. Sero-epidemiological study of the presence of hantaviruses in domestic dogs and cats from Belgium. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 2, p. 221-224, 2012.

DOS SANTOS, M. C.; LACERDA, M. V. G.; BENEDETTI, S. M.; ALBUQUERQUE, B. C.; DE AGUIAR FILHO, A. A. B. V.; ELKHOURY, M. D. R.; VASCONCELOS, P. F. D. C.; MEDEIROS, D. B. D. A.; MOURÃO, M. P. G. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 7, p. 1165-1167, 2006.

DOS SANTOS, L. C.; CUROTTO, S. M. R.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; BIONDO, A. W.; KIRCHGATTER, K. Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1, p. 148-151, 2009.

DUARTE, A. M. R. C.; MALAFRONT, R. S.; CERUTTI JR., C.; CURADO, I.; PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI T.; SUMMA, M. E. L.; NEVES, D. V. D. A.; OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: are reservoir for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

ESCUTENAIRE, S.; PASTORET, P. P.; SJÖLANDER, K. B.; HEYMAN, P.; BROCHIER, B.; LUNDKVIST, A. Evidence of Puumala hantavirus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Belgium. **Veterinary Record**. UK, v. 147, n. 13, p. 365-366, 2000b.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, E. S. (Ed.). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. v. 2, p. 1747-1785.

FAUNDER, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malária. **Parasitology**, v. 120, pt. 1 p. 11-21, 2000.

FERREIRA NETO, J. A.; DEANE, L. M.; DE ALMEIDA, F. B. Malaria simiana no Estado do Acre, Brasil: Encontro de macacos Zogue-zogue, *Callicebus moloch cupreus*, infetados com *Plasmodium brasilianum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 14,

n. 4, p. 231-234, 1972.

FIGUEIREDO, R. M. P.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L.; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.

FULOP, L.; BARRET, A. D.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D., TITBALL, R. W. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179-188, 1993.

GIMAQUE, J. B. L.; BASTOS, M. D. S.; BRAGA, W. S. M.; DE OLIVEIRA, C. M. C.; CASTILHO, M. D. C.; DE FIGUEIREDO, R. M. P.; GALUSSO, E. D. S.; ITAPIREMA, E. F.; DE FIGUEIREDO, L. T. M.; MOURÃO, M. P. G. Serological evidence of hantavírus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.107, n.1, p. 135-137, 2012.

GORDO, M. **Ecologia e conservação do sauí-de-coleira, saguinus bicolor (Primates; Callitrichidae)**. 2012. p. 7-27. Tese (Doutorado em Zoologia) – Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, Pará, 2012.

GORTAZAR, C.; REPERANT, L. A.; KUIKEN, T.; DE LA FUENTE, J.; BOADELLA, M.; MARTINEZ-LOPEZ, B.; RUIZ-FONS, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; DROSTEN, C.; MEDLEY, G.; OSTFELD, R.; PETERSON, T.; VERCAUTEREN, K. C.; MENGE, C.; ARTOIS, M.; SCHULTSZ, C.; DELAHAY, R.; SERRA-COBO, J.; POULIN, R.; KECK, F.; AGUIRRE, A. A.; HENTTONEN, H.; DOBSON, A.; KUTZ, S.; LUBROTH, J.; MYSTERUD, A. Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. **PLoS Pathogens**. Columbia University, v. 10, n. 6, 2014. Disponível em: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1004129#ppat-1004129-g002>>. Acesso em: 03 nov. 2014

GROEN, J.; GERDING, M.; KOEMAN, J. P.; ROHOLL, P. J.; VAN AMERONGEN, G.; JORDANS H. G.; NIESTERS, H. G.; OSTERHAUS, A. D. A macaque model for hantavírus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 172, n. 1, p. 38-44, 1995.

HALL, N. H.; ARCHER, L. L.; CHILDRESS, A. L.; JAMES, F. X.; WELLEHAN, J. R. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 359-363, 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA. **Cidades@**: Amazonas, Itacoatiara. 2014. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/33D>>. Acesso em: 03 jun.2014

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA. **Cidades@**: Amazonas, Manaus. 2014. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/232HE>>. Acesso em: 03 jun. 2014

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA. **Cidades@**: Amazonas, Rio Preto da Eva. 2014. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/JZN>>. Acesso em: 03 jun. 2014.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2014. Disponível em:

<<http://www.iucnredlist.org/details/40644/0>>. Acesso em: 01 abr. 2014.

JIANG, B.; MCCLURE, H. M.; FANKHAUSER, R. L.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. **Journal of Medical Primatology**, v. 33, n. 1, p. 30-33, 2004.

JONES-ENGEL, L.; ENGEL, G. A.; SCHILLACI, M. A.; BABO, R.; FROEHLICH, J. Detection of antibodies to selected human pathogens among wild and pet macaques (*Macaca tonkeana*) in Sulawesi, Indonesia. **American Journal of Primatology**, v. 54, n. 3, p. 171-178, 2001.

JONSSON, C. B.; FIGUEREIDO, L. T.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 412-441, 2010.

KARLSSON, E. A.; ENGEL, G. A.; FEEROZ, M. M.; SAN, S.; ROMPIS, A.; LEE, B. P. Y.; SHAW, E.; OH, G.; SCHILLACI, M. A.; GRANT, R.; HEIDRICH, J.; SCHULTZ-CHERRY, S.; JONES-ENGEL, L. Influenza Virus Infection in Nonhuman Primates. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 10, p. 1672-1675, 2012.

KIM, C. S.; SUELTFUSS, E. S.; KALTER, S. S. Isolation and characterization of simian adenoviruses isolated in association with an outbreak of pneumoenteritis in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). **Journal of Infectious Diseases**, v. 117, n. 4, p. 292-300, 1967.

KIM, G. R.; LEE, Y. T.; PARK, C. A new natural reservoir of Hantavirus: isolation of Hantaviruses from lung tissues of bats. **Archives of Virology**, v. 134, n. 1-2, p. 85-95, 1994.

KÖNDGEN, S.; KÜLH, H.; N'GORAN, P. K.; WALSH, P. D.; SCHENK, S.; ERNST, N.; BIEK, R.; FORMENTY, P.; MÄTZ-RENSING, K.; SCHWEIGER, B.; JUNGLEN, S.; ELLERBROCK, H.; NITSCHKE, A.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I.; PAULI, G.; BOESCH, C.; LEENDERTZ, F. H. Pandemic human viroses cause decline of endangered great apes. **Current Biology**, v. 18, n. 4, p. 1-5, 2008.

LAROQUE, P. O.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; FERREIRA, D. R. A.; CHIANG, J. O.; CORDEIRO, M. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; SILVA, J. C. R. Levantamento soropidemiológico para arbovírus em macaco-prego-galego (*Cebus flavius*) de vida livre no Estado de Paraíba e em macaco-prego (*Cebus libidinosus*) de cativeiro do Nordeste do Brasil. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 34, n. 5, p. 462-468, 2014.

LEIGHTON, F. A.; ARTSOB, H. A.; CHU, M. C.; OLSON, J. G. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. **Canadian Journal of Public Health**, Canada, v.92, n.1 p.67-71, 2001.

Lei nº 605/01 – Código Ambiental do município de Manaus. Disponível em: <<http://www.mpam.mp.br/index.php/component/content/article/59-municipal/4840-lei-nd-60501-codigo-ambiental-do-municipio-de-manau>>. Acesso em 07 ag. 2014.

LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F. Simian rotavirus SA11 strains. **Journal of Virology**, v.66, n.3, p. 1832, 1992.

MALECKI, T.M.; JILLSON, G.P.; THILSTED, J.P.; ELROD, J.; TORREZMARTINEZ, N.; HJELLE, B. Serologic survey for Hantavirus infection in domestic animals and coyotes from

New Mexico and northeastern Arizona. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Illinois, v.212, n. 7, p.970-973, 1998.

MERTENS, M.; ESSBAUER, S.S.; RANG, A.; SCHRÖDER, J.; SPLETTSTOESSER, W.D.; KRETZSCHMAR, C.; KRÜGER, D.H.; GROSCHUP, M.H.; MÄTZ-RENSING, K.; ULRICH, R.G. Non-human primates in outdoor enclosures: Risk for infection with rodent-borne hantaviruses. **Veterinary Microbiology**. v. 147, n. 3-4, p. 420-425, 2011.

MONATH, T.P. Epidemiology of yellow fever: current status and speculations on future trends. Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases. In: **Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases** (Saluzzo, J.F. Ed.). Amsterdam, p. 143-165, 1997.

MOURÃO, M.P.G.; BASTOS, M.S.; FIGUEIREDO, R.P.; GIMAQUE, J.B.L.; GALUSSO, E.S.; KRAMER, V.M.; OLIVEIRA, C.M.C.; NAVECA, F.G.; FIGUEIREDO, L.T.M. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.12, n.1, p. 42-46, 2012.

MOUREAU, G.; TEMMAM, J.P.; GONZALES, R.N.; GRARD, G.; DE LAMBALLERIE, X. A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.7, n.4, p.467-478, 2007.

MURRAY, K.; DASZAK, P. Human ecology in pathogenic landscapes: two hypotheses how land use change drives viral emergence. **Current Opinion in Virology**. v. 3, n. 1, p. 79-83, 2013.

MWENDA, J.M.; NYACHIEO, A.; LANGAT, D.K.; STEELE, D.A. Serological detection of adenoviruses in non-human primates maintained in a colony in Kenya. **East African Medical Journal**. South Africa, v.82, n. 7, p. 371-375, 2005.

NIX, W.A.; OBERSTE, M.S.; PALLANSCH, M.A. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n.8, p.2698-2704, 2006.

NOWOTNY, N. The domestic cat: a possible transmitter of viroes from rodents to man. **The Lancet**. v. 343, n.8902, p. 921, 1994.

OMETTO T.; DURIGON E.L.; DE ARAUJO, J.; APRELON, R.; DE AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MELO, R.M.; LEVI, J.E.; DE AZEVEDO JÚNIOR, S.M.; PETRY, M.V.; NETO, I.S.; SERAFINI, P.; VILLALOBOS, E.; CUNHA, E.M.; LARA, C.; NAVA, A.F.; NARDI, M.S.; HURTADO, R.; RODRIGUES, R.; SHERER, A.L.; SHERER, J.F.; GERALDI, M.P.; DE SEIXAS, M.M.; PETERKA, C.; BANDEIRA, D.S.; PRADEL, J.; VACHIER, N.; LABRUNA, M.B.; DE CAMARGO, L.M.; LANCIOTTI, R.; LEFRANÇOIS, T. West Nile virus surveillance. Brazil, 2008-2011. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 107, n.11, p. 723-730, 2013.

PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. Rotavirus – Synopses. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v.4, n.4, p. 562-570, 1998.

PATZ, J.A.; DASZAK, P.; TABOR G.M.; AGUIRRE, A.A.; PEARL, M.; EPSTEIN, J.;

WOLFE, N.D.; KILPATRICK, A.M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.; BRADLEY, D.J.; AND MEMBERS OF THE WORKING GROUP ON LAND USE CHANGE AND DISEASE EMERGENCE. Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. **Environmental Health Perspectives**. v. 112, n. 10, p. 1092-1098, 2004.

PETRIC, M.; MIDDLETON, P.J.; RAPLEY, W.A.; MEHREN, K.G.; GRANT, C. A **Survey of Zoo Mammals for Antibody to Rotavirus**. Canadian Journal of Comparative Medicine. Canada, v. 45, n. 3, p. 327-329, 1981.

PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R.M.; KAADEN, O.R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Illinois, v.57, n.7, p. 709-718, 1997.

RIBEIRO, M.N.G. Aspectos climatológicos de Manaus. **Acta Amazônica**. v. 6, n. 2, p. 229-233, 1976.

RÖHE, F. **Área de contato entre as distribuições geográficas de *Saguinus midas* e *Saguinus bicolor*: a importância de interações e fatores ecológicos**. 2006 p. 57-61. 82fls. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – INPA/UFAM, Manaus, 2006.

ROY, S.; VANDENBERGHE, L.H.; KRYAZHIMSKIY, S.; GRANT, R.; CALCEDO, R.; YUAN, X.; KEOUGH, M.; SANDHU, A.; WANG, Q.; MEDINA-JASZEK, A.; PLOTKIN, J.B.; WILSON, J.M. Isolation and Characterization of Adenoviruses Persistently Shed from the Gastrointestinal Tract of Non-Human Primates. **PLOS Pathogens**. v.5, n.7. p. 1-9, 2009. Disponível em: <
<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000503>>. Acesso em: 10 ag. 2014.

SADEU-MBA, S.A.; BESSAUD, M.; JOFFRET, M-L.; ZANGA, M-C.E.; BALANANT, J.; NGOLE, E.M.; NJOUOM, R.; REYNES, J-M.; DELPEYROUX, F.; ROUSSET, D. Characterization of Enteroviruses from Non-Human Primates in Cameroon Revealed Virus Types Widespread in Humans along with Candidate New Types and Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.7, p.1-12, 2014. Disponível em: <
<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0003052>>. Acesso em 10 Ag. 2014.

SAKTHIVEL, S.K.; WHITAKER, B.; LU, X.; OLIVEIRA, D.B.; STOCKMAN, L.J.; KAMILI, S.; OBERSTE, M.S.; ERDMAN, D.D. Comparisons of fast-track diagnostics respiratory pathogens multiplex real-time RT-PCR assay with in-house singleplex assays for comprehensive detection of human respiratory viruses. **Journal of Virological Methods**, v.185, n.2, p.259-266, 2012.

SARAIVA, M.G.G.; AMORIM, R.D.S.; MOURA, M.A.S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; BARBOSA, M.G.V. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.5, p.515-522, 2009.

SCHMIDT, K.; OSTFELD, R.; Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. **Ecology**, Washington, v.82, n. 3, p. 609-619, 2001.

SEMSA. Manaus registra 89.8% de redução nos casos de dengue. 2014. Reportagem de: Eurivânia Galúcio. Disponível em: < <http://semsa.manaus.am.gov.br/manaus-registra-898-de-reducao-nos-casos-de-dengue/>>. Acesso em: 07 set. 2014.

SHROYER, E.L.; KELLEY, S.T.; TAYLOR, P.C.; VANDERLOO, P.; LESTER, T.L. Three serologic types of adenovirus infections of owl monkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v.40, n.4, p.532-536, 1979.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X.P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; ROSARIO, V.E.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Journal of Molecular and Biochemical Parasitology**, v.62, n.2, p. 315-320, 1993.

SOUZA, F.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; LORENZETTI, E.; HEADLEY, S.A.; PASSOS, F.; SILVESTRE, T.; ZAGO, L.; MOTTIN, V.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R.; SVOBODA, W.; GOMES, E. The evaluation of enteric viroses in asymptomatic free-ranging non-human primates (*Alouatta guariba clamitans*, *Alouatta caraya*, *Callithrix spp.*, *Callithrix penicillata*, and *Leontopithecus caissara*) in southern Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v.41, n. 5, p. 304-308, 2012.

SPACKMAN, E.; SENNE, D.A.; BULAGA, L.L.; MYERS, T.J.; PERDUE, M.L.; GARBER, L.P.; LOHMAN, K.; DAUM, L.T.; SUAREZ, D.L. Developments of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza vírus. **Avian Diseases**, v. 47, n.3, p. 1079-1082, 2005.

SIGH, B.; BOBOGARE, A.; COX-SINGH, J.; SNOUNOU, G., ABDULLAH, M.S.; RAHMAN, H.A. A genus and species-specific nested polymerase chain reaction malária detection assay for epidemiologic studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n. 4, p. 687-692, 1999.

SUBIRA, R. **Avaliação da situação atual das populações selvagens do sauí-de-coleira, *Saguinus bicolor bicolor* (Spix, 1823)**. 1998. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, DF, 1998.

SUZÁN, G.; MARCÉ, E.; GIERMAKOWSKI, J.T.; ARMIÉN, B.; PASCALE, J.; MILLS, J.; CEBALLOS, G.; GÓMEZ, A.; AGUIRRE, A.A.; SALAZAR-BRAVO, J.; ARMIÉN A.; PARMENTER, R.; YATES, T. The Effect of Habitat Fragmentation and Species Diversity Loss on Hantavirus Prevalence in Panama. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, New York, v. 1149, n. X, p. 80-83, 2008.

SUZUKI, A.; BISORDI, I.; LEVIS, S.; GARCIA, J.; PEREIRA, L.E.; SOUZA, R.P.; SUGAHARA, T.K.N.; PINI, N.; ENRIA, D.; SOUZA, L.T.M. Identifying Rodent Hantavirus Reservoirs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 12, p. 2127-2134, 2004.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences**, London, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

TAZI, L.; AYALA, F.J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v *P. simium* and *P. malariae* v *P. brasilianum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.1 p. 209-211, 2011.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Evidence of circulating hantaviruses in Brazilian Amazonia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo. v. 44, n.2-3, p. 162-163, 1992.

VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; RODRIGUES, A.P.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, Brasil, v.17, Suplemento, p. 155-164, 2001.

VASILAKIS, N.; CARDOSA, J.; HANLEY, K.A.; HOLMES, E.C.; WEAVER, S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature**, v.9, n. 7, p. 532-541, 2011.

WANG, Y.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C. GLASS, R.I.; JIAN, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **Journal of Medical Primatology**, v. 36, n. 2, p. 101-107, 2007.

WEISS, R.A; MCMICHAEL, A.J. Social and Environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nature Medicine Supplement**, v.10, n. 12, p. S70-S76, 2014.

WELLEHAN J.F.; JOHNSON, A.J.; HARRACH, B.; BENKÖÖ, M.; PESSIER, A.P.; JOHNSON, C.M.; GARNER, M.M.; CHILDRESS, A.; JACOBSON, E.R. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. **Journal of Virology**, v.78, n.23, p.13366-13369, 2004.

WEVERS, D.; METZGER, S.; BABWETEERA, F.; BIEBERBACH, M.; BOESCH, C.; CAMERON, K.; COAUCY-HYMAN, E.; CRANFIELD, M.; GRAY, M.; HARRIS, L.A.; HEAD, J.; JEFFERY, K.; KNAUF, S.; LANKESTER, F.; LEENDERTZ, S.A.J.; LONSDORF, E.; MUGISHA, L.; NITSCH, A.; REED, P.; ROBBINS, M.; TRAVIS, D.A.; ZOMMERS, Z.; LEENDERTZ, F.H.; EHLERS, B. Novel Adenoviruses in Wild Primates: a High Level of Genetic Diversity and Evidence of Zoonotic Transmission. **Journal of Virology**, v.85, n. 20, p. 10774-10784, 2011.

WHO, 2014. Immunizations, Vaccines and Biologicals. Rotavirus. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/>>. Acesso em 25 ago. 2014.

WOLFE, N.D.; ESCALANTE, A.A.; KARESH, W.B.; KILBOURN, A.; SPIELMAN, A.; LAL, A.A. Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: The Missing Link?. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.4, n.2, p. 149- 158, 1998.

WOOLHOUSE, M.; SCOTT, F.; HUDSON, Z.; HOWEY, R.; CHASE-TOPPING, M. Human viroses: Discovery and emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences**, London, v. 367 n. 1604, p. 2864-2871, 2012.

XU, Z.Y.; TANG, Y.W.; KAN, L.Y.; TSAI, T.F.; Cats – source of protection or infection? A case-control study of hemorrhagic fever with renal syndrome. **American Journal of Epidemiology**, v. 126, n. 5, p. 942-948, 1987.

YANAGIHARA, R.; AMYX, H.L.; LEE, P.W.; ASHER, D.M.; GIBBS, C.J.; GAJDUSEK,

D.C. Experimental hantavírus infection in nonhuman primates. **Archives of Virology**, v. 101, n. 1-2, p. 125-130, 1988.