

Fábio Carmona de Jesus Maués

Perfil Sorológico por Inibição da Hemaglutinação
para Arboviroses em Residentes “Ribeirinhos” da
Região Amazônica e “Rurais” do Sudeste Brasileiro

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

São Paulo
2010

Fábio Carmona de Jesus Maués

Perfil Sorológico por Inibição da Hemaglutinação para Arboviroses em Residentes “Ribeirinhos” da Região Amazônica e “Rurais” do Sudeste Brasileiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Virologia

Orientador: Valderez Gambale

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Maués, Fábio Carmona de Jesus.

Perfil sorológico por inibição da hemaglutinação para arboviroses em residentes “Ribeirinhos” da região Amazônica e “rurais” do sudeste brasileiro. / Fábio Carmona de Jesus Maués. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Valderez Gambale.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia.

Versão do título para o inglês: Serological survey for arboviruses by hemagglutination inhibition in residents of Amazon region and country people in southeastern of Brazil.

Descritores: 1. Arboviroses 2. Inibição da Hemaglutinação 3. São Paulo 4. Rondônia 5. MAC-ELISA 6. Perfil sorológico I. Gambale, Valderez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB0158/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fáblio Carmona de Jesus Maués.

Título da Tese: Perfil sorológico por inibição da hemaglutinação para arboviroses em residentes “Ribeirinhos” da região Amazônica e “Rurais” do sudeste brasileiro.

Orientador(a): Valderez Gambale.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

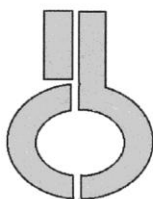
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 07 de julho de 2010.

PARECER 951/CEP

A *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Perfil sorológico das arboviroses em parte da população Ribeirinha da Região Amazônica e Rural do Sudeste Brasileiro*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. VALDEREZ GAMBALE e o aluno FABIO CARMONA DE JESUS MAUÉS

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **06.07.2011.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

**Dedico este trabalho a minha
família, principalmente aos meus
Pais, aos meus Irmãos e minhas
Irmãs, pelo amor incondicional e
imensurável incentivo que
esquentaram meus dias frios**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por colocar obstáculos em minha vida para que eu aprenda cada vez mais.

Ao meu pai, José A. J. Maués, pelos ensinamentos e por ter me ajudado e incentivado de todas as maneiras possíveis que um pai pode ajudar um filho.

À minha mãe, Cléa C. J. Maués, que além da ajuda e incentivo, também trouxe muitos momentos de diversão e alegria durante minha estadia aqui em SP.

Aos meus irmãos e irmãs José S. M. Neto, Mônica C. J. M. Dallabrida, Cláudio C. J. Maués, Mary. C. M. Neves e Paulo C. J. Maués; pelo apoio, companheirismo e incentivo. Pela aprendizagem que tivemos e pelo amor mútuo que temos independente das qualidades e defeitos.

Ao meu Orientador Valderez Gambale, por sua orientação, paciência e compreensão quanto ao meu trabalho, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Dra. Sueli Guerreiro Rodrigues, do Instituto Evandro Chagas, que com sua experiência formidável em pesquisa de arboviroses foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Este agradecimento para ela é muito especial, pois não é a primeira vez que recebo sua atenção e orientação de forma tão amigável e dedicada. Grande parte da minha vida de pesquisador eu devo a ela.

Um agradecimento especial também ao Dr. Luiz Eloy, que na reta final desta tese me acompanhou e me apoiou com a finalização do trabalho, transmitindo muito mais que conhecimento, força e incentivo.

Ao Prof. Dr. Edison Durigon, que foi quem abriu as portas da USP para mim e é o responsável pela minha pós-graduação aqui em SP. Também foi quem cedeu todas as amostras do meu trabalho.

Ao Dr. Prof. Pedro F. C. Vasconcelos, por ter permitido ser feito os testes deste trabalho na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas.

Agradeço ao apoio das pesquisadoras Livia C. Martins, Jannifer O. Chiang, Daniele F. Henriques, Milene Silveira e ao pesquisador Basílio, que foram as pessoas que me ensinaram a fazer e a trabalhar com o teste de inibição da hemaglutinação, e me ajudaram no dia a dia da bancada e com os materiais e reagentes dos numerosos testes deste trabalho. E ao pesquisador Maxuel Felix Lima, que me ajudou no teste de MAC-ELISA.

Ao Prof. Dr. Luiz Marcelo Aranha, que foi quem desenvolveu o trabalho em Machadinho d'Oeste e deu suporte ao trabalho no Rio Machado em Rondônia, e graças a estes trabalhos foram possíveis as coletas das amostras que eu utilizei neste trabalho.

Aos Professores Eliseu Waldman e Eduardo Massad, que me ajudaram com a parte estatística deste trabalho. A orientação de vocês significou muito pra mim.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Aos meus amigos e amigas de república atuais e os que já moraram comigo.

A felicidade não se resume na
ausência de problemas, mas sim na
sua capacidade de lidar com eles.

Albert Einstein

RESUMO

MAUÉS, F. C. J. **Perfil Sorológico por Inibição da Hemaglutinação para Arboviroses em Residentes “Ribeirinhos” da Região Amazônica e “Rurais” do Sudeste Brasileiro.** 2010. 86 f. Tese de Doutorado (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As arboviroses causam doenças graves em humanos e possuem grande importância para a saúde pública global, devido a sua capacidade de causar epidemias, especialmente nas áreas tropicais do planeta, onde encontramos ambiente e condições boas para a reprodução e sobrevivência dos vetores. A maioria dos estudos no Brasil são focados principalmente no isolamento e na soroprevalência de Dengue e Febre Amarela. Existem poucos estudos sobre a detecção e circulação de outros arbovírus que causam doenças em humanos. Neste trabalho, foi feita uma investigação sorológica em residentes da região Amazônica Ocidental e pessoas rurais que moram no sudeste do Brasil, através do teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) para 17 sorotipos diferentes de arbovírus: quatro do gênero *alphavirus* (ALP) (Encefalite Equina do Leste, Encefalite Equina do Oeste, Mayaro e Mucambo), Nove do gênero *flavivirus* (Febre Amarela, Febre Amarela Vacinal, Ilhéus, Encefalite Saint Louis, Rocio, Dengue [DENV] sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), e cinco do gênero *orthobunyavirus* (Caraparu, Catu, Maguari, Oropouche e Tacaiuma). O objetivo é verificar quais desses arbovírus estão circulando nessas áreas. Os resultados no teste de HI foram divididos em quatro áreas: na cidade de Machadinho do Oeste (estado de Rondônia) (N=285) tivemos para o gênero ALP=50 (17,54%), para FLA=270 (94,74%), para ORT=58 (20,35%) e 12 amostras negativas (4,20%). Nas pessoas que moram ao longo do Rio Machado (estado de Rondônia) (N=343) tivemos para o gênero ALP=99 (28,68%), para FLA=229 (66,76%), para ORT=41 (11,95%) e tivemos 93 (27,10%) negativos. Na cidade de Teodoro Sampaio não tivemos nenhum positivo para ALP e ORT, para FLA=55 (70,51%) e tivemos 23 (29,5%) negativos. Na cidade de Jacupiranga tivemos ALP=7 (4,7%), para FLA=50 (33,56%), para ORT=20 (13,42%) e tivemos 84

(56,4%) negativos. Em conclusão, os dados obtidos sugerem a circulação destes vírus nas regiões estudadas, porém vale ressaltar que mais estudos são necessários, utilizando testes mais específicos, para poder confirmar a situação apresentada.

Palavras-chave: Arbovírus. Inibição da Hemaglutinação. MAC-ELISA. São Paulo. Rondônia. Perfil Sorológico.

ABSTRACT

MAUÉS, F. C. J. **Serological survey for Arboviruses by hemagglutination inhibition in Residents of the southwestern Amazon region and country people in Southeastern of Brazil.** 2010. 86 f. Ph. D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The arboviruses cause significant disease in humans and are very important to public health, because of its capacity to cause epidemics, especially in tropical areas, where we find environments conducive to reproduction and survival of the vectors. Mostly of the studies in Brazil were focused on dengue virus and yellow fever virus isolation and antibody prevalence. There are few studies on the detection and the circulation of others arboviruses that cause diseases in humans. In this work we performed a serological investigation, in residents of the southwestern Amazon region and country people who lives in Southeastern of Brazil, by hemagglutination inhibition (HI) for 17 different serotype of arboviruses: four from the genus *Alphavirus* (ALP) (Eastern Equine Encephalomyelitis, Western Equine Encephalomyelitis, Mayaro, and Mucambo), nine from the genus *Flavivirus* (FLA) (Wild and Vaccinal Yellow Fever virus , Ilheus, Saint Louis Encephalitis, Rocio, Dengue [DEN] 1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4), and five from the genus *Orthobunyavirus* (ORT) (Caraparu, Catu, Maguari, Oropouche, and Tacaiuma), to try to ascertain which of these arboviruses are circulating in these areas. The results of HI were divided into four areas: In Machadinho d'Oeste city (Rondônia State) (N=285) we had to the genus ALP=50 (17,54%), to FLA=270 94,74%, to ORT=58 (20,35%) and negatives (NEG)=12 (4,20%). In people who live along the Machado River (Rondônia State) (N=343) we had to ALP=99 (28,86%), to FLA=229 (66,76%), to ORT=41 (11,95%) and NEG=93 (27,10%). In Teodoro Sampaio City (São Paulo State) (N=78) we had none to ALP and to ORT, to FLA=55 (70,51%) and NEG=23 (29,5%). In Jacupiranga City (São Paulo) (N=149) we had to ALP=7 (4,70%), to FLA=50 (33,56%), to ORT=20 (13,42%) and NEG=84 (56,4%). In conclusion, the obtained data suggest

the circulation of these viruses in these regions, however further studies are needed using more specific tests in order to confirm this situation.

Key words: Arboviruses. Hemagglutination Inhibition. MAC-ELISA. Serological Survey. São Paulo, Rondônia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de transmissão dos arbovírus.....	22
Figura 2: Mapa mostrando o Estado de Rondônia e a localização aproximada do Rio Machado, e acima do mapa há uma foto de parte do Rio Machado com a marcação dos pontos de coleta de acordo com o GPS registrado.....	30
Figura 3: Mapa do Território do Vale do Jamari.....	31
Figura 4: Mapa com a localização geográfica da cidade de Jacupiranga.....	31
Figura 5: Mapa com a localização geográfica da cidade de Teodoro Sampaio.....	32
Figura 6: Mapa demonstrando a localização aproximada das cidades de Jacupiranga e Teodoro Sampaio no estado de São Paulo, e as cidades de Machadinho d'Oeste e o Rio Machado no Estado de Rondônia, assim como o número (N) e a porcentagem (%) de amostras em cada uma dessas localidades....	34
Figura 7: Esquema do teste de Inibição da Hemaglutinação.....	39
Figura 8: Esquema do MAC-ELISA.....	41
Figura 9: Número de amostras positivas para arbovírus e negativas no teste de IH. As amostras positivas foram divididas em: <i>Flavivirus</i> (positivos apenas para arbovírus do gênero <i>Flavivirus</i>), <i>Alphavirus</i> (positivos apenas para arbovírus do gênero <i>Alphavirus</i>), <i>Orthobunyavirus</i> (Positivos apenas para arbovírus do gênero <i>Orthobunyavirus</i>), a) positivos para arbovírus do gênero <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> ao mesmo tempo; b) positivos para arbovírus do gênero <i>Flavivirus</i> e <i>Orthobuniavirus</i> ao mesmo tempo; c) positivos para arbovírus do gênero <i>Alphavirus</i> e <i>Orthobunyavirus</i> ao mesmo tempo; d) positivo para os três gêneros (<i>Alphavirus</i> , <i>Flavivirus</i> e <i>Orthobunyavirus</i>) ao mesmo tempo.....	43

Figura 10: Número de amostras com resultados positivos (e em porcentagem) no teste de IH separados nas regiões do Rio Machado, Machadinho d'Oeste, Jacupiranga e Teodoro Sampaio, dividido em: Pos Flav (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Flavivirus*); Pos Alp (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Alphavirus*); Pos Ort (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus*); Flav e Alp (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Flavivirus* e *Alphavirus*); Flav e Orto (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*); Alp e Orto (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*); Alp, Flav e Orto (número de amostras positivas para arbovírus dos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*), Total pos (soma de todas as amostras que foram positivas para pelo menos um arbovírus), Neg (número de amostras negativas para todos os arbovírus testados), T (total de amostras que foram testadas na região).....46

Figura 11: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *alphavirus* no teste de IH.....48

Figura 12: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *orthobunyavirus* no teste de IH.....48

Figura 13: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *flavivirus* no teste de IH.....49

Figura 14: Porcentagem de respostas com pico no teste de IH e respostas monotípicas nas amostras de Teodoro Sampaio.....50

Figura 15: Porcentagem de respostas com pico no teste de IH e respostas monotípicas nas amostras de Jacupiranga.....50

Figura 16: Porcentagem de respostas com pico no teste de IH e respostas monotípicas nas amostras de Machadinho d'Oeste.....51

Figura 17: Porcentagem de respostas com pico no teste de IH e respostas monotípicas nas amostras de Rio Machado.....51

Figura 18: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *flavivirus* em cada umas das regiões estudadas.....51

Figura 19: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *alphavirus* em cada umas das regiões estudadas.....52

Figura 20: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *orthobunyavirus* em cada umas das regiões estudadas.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do teste de IH de acordo com a procedência da amostra (Teodoro Sampaio, Jacupiranga, Machadinho d' Oeste e Rio Machado) e positividade para cada um dos gêneros de Arbovírus.....53

Tabela 2 - Resultados do teste de IH para cada um dos gêneros de arbovírus, de acordo com a idade, distribuído nas três cidades e no Rio Machado.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17D – Cepa vacinal do vírus da Febre Amarela.

ACD – Solução de Ácido, Citrato e Dextrose

BOV 0,4% - Solução de albumina bovina diluída a 0,4% em solução de borato salina
com ph 9,0

CAR – Doença Caraparu

CARV – Vírus Caraparu

CATU – Vírus Catu

DEN – Doença Dengue

DENV – Vírus da Dengue

DENV-1 – Vírus da Dengue Sorotipo 1

DENV-2 – Vírus da Dengue Sorotipo 2

DENV-3 – Vírus da Dengue Sorotipo 3

DENV-4 – Vírus da Dengue Sorotipo 4

DGV – Solução de Dextrose, Gelatina e Veronal

EEE – Doença da Encefalite Equina do Leste

EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste

GV – Vírus Guaroa

HA – Teste de Aglutinação

HT – Resposta Heterotípica no teste de IH

IH – Teste de Inibição da Hemaglutinação

ILH – Doença Ilhéus

ORO – Doença Oropouche

OROV – Vírus Oropouche

ILHV – Vírus Ilhéus

MAC ELISA – Teste Imunoenzimático por Captura de Anticorpos IgM

MAG – Doença Maguari

MAGV – Vírus Maguari

MAY – Doença Mayaro

MAYV – Vírus Mayaro

MT – Resposta monotípica no teste de IH

MUC – Doença Mucambo
MUCV – Vírus Mucambo
ROC – Doença Rocio
ROCV – Vírus Rocio
SLE – Doença da Encefalite Saint Louis
SLEV – Vírus da Encefalite Saint Louis
TCM – Doença Tacaiuma
TCMV – Vírus Tacaiuma
YF – Doença Febre Amarela
YFV – Vírus da Febre Amarela
WEE – Doença da Encefalite Equina do Oeste
WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	38
2 REVISÃO DA LITERATURA	40
2.1 Considerações gerais sobre Arboviroses	40
2.2 Família <i>Flaviviridae</i>	42
2.3 <i>Alphavirus</i>	43
2.4 <i>Orthobunyavirus</i>	44
3 OBJETIVOS	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Desenho do Estudo	47
4.2 Característica das Áreas do Estudo	47
4.3 População Estudada	50
4.4 Definição de Caso Positivo	51
4.3 Característica da Amostra da População Estudada	51
4.4 Variáveis do Estudo	53
4.5 Técnicas Sorológicas	53
4.5.1 <i>Inibição da Hemaglutinação (HI)</i>	54
4.5.2 <i>Ensaio Imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgM anti VDEN e/ou FA (MAC-ELISA)</i>	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Resultados do teste de HI	60
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A - Número de amostras (N) em cada ponto de coleta e os pontos de GPS	86
ANEXO B - Resultado das amostras testada pelo HI. O local, idade e sexo do indivíduo e ponto de GPS da coleta	87

1 INTRODUÇÃO

Os Arbovírus, por definição, são um grupo de vírus que se mantêm na natureza principalmente através de transmissão de artrópodes hematófagos contaminados para vertebrados suscetíveis ou transmissão entre artrópodes por via transovariana (1). A maioria dos arbovírus não causam doenças conhecidas em humanos, porém os vírus patogênicos desse grupo podem provocar diversas patologias, e alguns o fazem de forma severa e/ou epidêmica. As três principais famílias de vírus que contêm arbovírus de importância para saúde pública, devido a capacidade que possuem de provocar doenças em humanos são: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae*. Vale ressaltar que nem todos os vírus pertencentes a estas famílias são do grupo dos arbovírus (2,3).

Os principais arbovírus da família *Togaviridae* que causam patologias em humanos são: o vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), o vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), o vírus Mayaro (MAYV) e o vírus Mucambo (MUCV); todos eles pertencentes ao gênero *Alphavirus*. Na família *Bunyaviridae* são: o vírus Maguari (MAGV), o vírus Tacaiuma (TCMV), o vírus Caraparu (CARV), o vírus Catu (CATU) e o vírus Oropouche (OROV); todos pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus*. Na família *Flaviviridae* são: vírus da Febre Amarela (YFV), vírus Ilheus (ILHV), vírus da Encefalite Saint Louis (SLEV), vírus West Nile (WNV), vírus Rocio (ROCV) e o vírus da Dengue (DENV), todos pertencentes ao gênero *Flavivirus* (2,3). A transmissão desses agentes virais em natureza envolve basicamente artrópodes hematófagos como vetores, tanto em ciclos silvestres endêmicos ou enzoóticos quanto em ciclos urbanos epidêmicos, estando relacionada a diversos fatores ambientais e principalmente a fatores ligados aos vetores e aos hospedeiros vertebrados (4). Em relação às transmissões transovariana e venérea, as mesmas têm sido demonstradas para alguns arbovírus (5,6,7,8,9). Devido a este mecanismo de transmissão vetorial, eles ocorrem principalmente nas regiões intertropicais do planeta, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Nos trópicos, os vetores coexistem com hospedeiros vertebrados em todas as épocas do ano, enquanto que nos países de clima temperado o ciclo é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou no verão (3).

No Brasil, já foram identificados mais de 186 tipos diferentes de arbovírus, sendo que a grande maioria destes foram isolados inicialmente no Instituto Evandro Chagas, em Belém do Pará, através de análise de amostras de humanos, mosquitos e de animais silvestres provenientes de vários estados brasileiros, principalmente da região da floresta amazônica (10). Apesar desta grande diversidade de arboviroses na região norte, a ocorrência de doenças provocadas por arbovírus existe em grande quantidade também nas outras regiões do país, sendo considerado um grave problema de saúde pública por ter a capacidade de provocar epidemias em regiões rurais e/ou urbanas todos os anos, exceto na região sul onde ocorrem poucos casos e a maioria deles são importados de outras regiões.

Diversos estudos analisam os vários fatores que influenciam na ocorrência de arboviroses em certos ambientes, como por exemplo as mudanças do clima, a migração da fauna, a entrada de populações dípteras em novos lugares, as interferências na flora natural com o desmatamento, o deslocamento humano de entrada e saída das áreas florestais de circulação desses vírus, etc. A grande preocupação é em verificar o possível aumento da área de ocorrência das arboviroses e/ou aumento no número de incidência (11,12).

Este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência de anticorpos inibidores de hemaglutinação contra 18 sorotipos diferentes de arbovírus e mais o vírus vacinal da Febre Amarela (17D), em soro de pessoas residentes das cidades de Jacupiranga e Teodoro Sampaio no Estado de São Paulo, e de residentes da cidade de Machadinho d'Oeste e outras que moram as margens do Rio Machado no Estado de Rondônia. Através desta análise queremos verificar nestes indivíduos quais são os arbovírus que eles possivelmente já entraram em contato e desenvolveram anticorpos; comparar os resultados com outros estudos epidemiológicos realizados para estes vírus, embora não encontramos na literatura pesquisada estudo epidemiológico para todos estes arbovírus nestas localidades. Temos por objetivo também verificar a possibilidade de determinados sorotipos de arbovírus estarem circulando em regiões geográficas consideradas livres destes sorotipos virais, indicando assim a possível ampliação da área de circulação destes vírus

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre Arboviroses

O termo “arbovírus” origina-se da abreviação do termo em inglês *arthropod-borne* (traduz “originado de artrópodes”), mais a palavra vírus, e refere-se ao principal mecanismo de transmissão e perpetuação deste grupo de vírus (Figura 1) (3).

Segundo definição da Organização Mundial da Saúde (1), os arbovírus são vírus mantidos em natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos ou, de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, através da via transovariana e, possivelmente, da via venérea; multiplicam-se e produzem viremia nos vertebrados, assim como nos tecidos dos artrópodes e são repassados a novos vertebrados suscetíveis através da picada do inseto, após um período de incubação extrínseca.

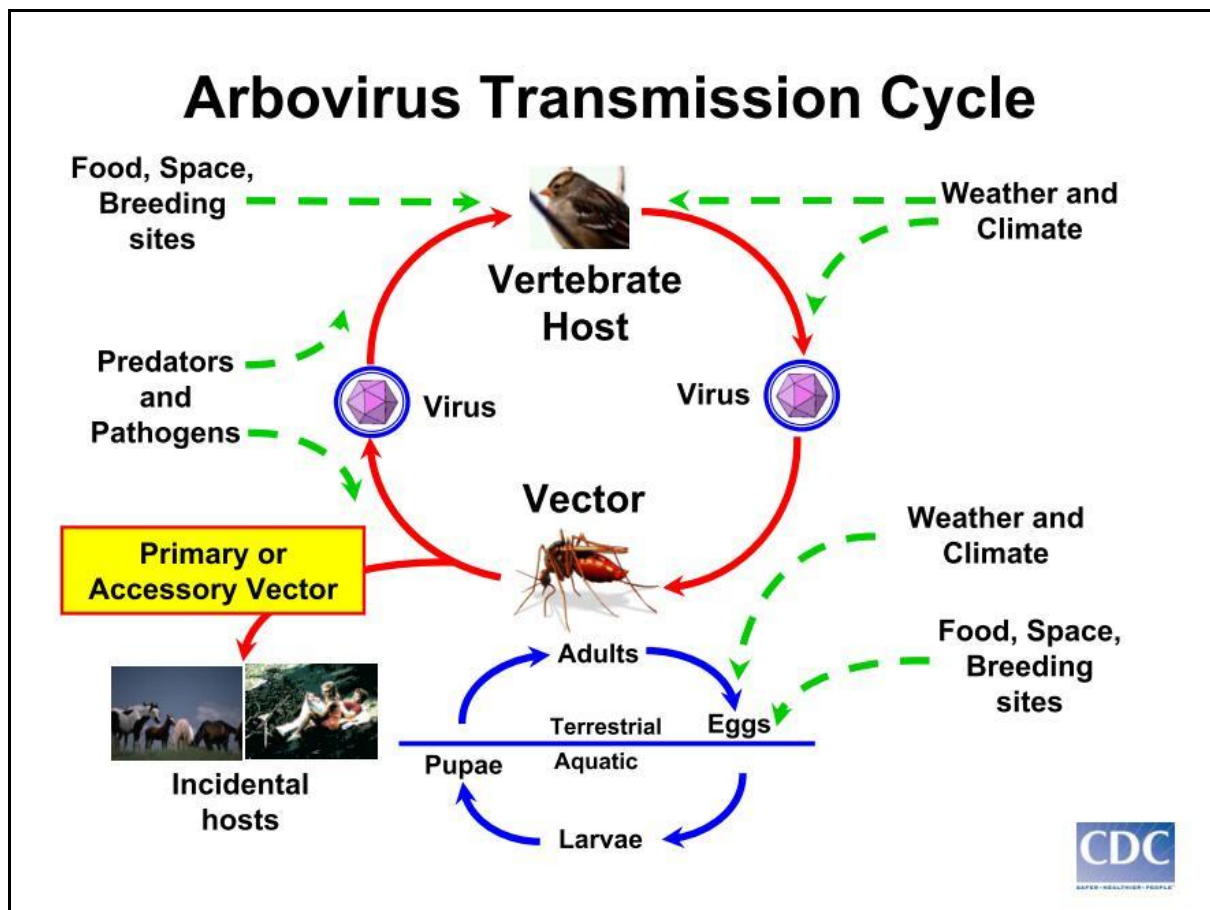


Figura 1: Ciclo de transmissão dos arbovírus (13)

A transmissão desses agentes virais em natureza envolve basicamente artrópodes hematófagos como vetores, tanto em ciclos silvestres endêmicos ou enzoóticos quanto em ciclos urbanos epidêmicos, estando relacionada a diversos fatores ambientais e principalmente a fatores ligados aos vetores e aos hospedeiros vertebrados (4). Em relação às transmissões transovariana e venérea, as mesmas têm sido demonstradas para alguns arbovírus (13,14,15).

De acordo com o *International Catalogue of Arbovirus Including Certain Other Viruses of Vertebrates* (13), os arbovírus encontram-se distribuídos por todos os continentes, exceto na Antártida. Cerca de 534 arbovírus encontram-se registrados, dos quais 135 foram isolados pela primeira vez de artrópodes e vertebrados oriundos da África, 78 da Ásia, 60 da Austrália e ilhas do Pacífico, 35 da Europa, 91 da América do Norte e 135 da América do Sul. Com isto eles constituem o maior grupo conhecido de vírus, e deste montante aproximadamente 100 são conhecidos por infectar seres humanos, 40 infectam animais domésticos e pelo menos 10 podem causar epidemias.

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas. Estas observações são baseadas principalmente nos resultados de testes sorológicos como o de inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento e neutralização. De acordo com esse critério, que foi primeiramente estabelecido por Casals em 1957, quando dois ou mais vírus mostram cruzamento sorológico passam a constituir um grupo antigênico (3,14). Os três primeiros grupos caracterizados foram designados pelas letras A, B e C, e a partir deste os demais grupos descobertos receberam o nome do primeiro vírus isolado em cada um (3).

A maioria dos vírus que fazem parte do grupo dos arbovírus estão taxonomicamente distribuídos em cinco famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae*. Porém vale ressaltar que nem todos os vírus presentes nestas famílias são necessariamente arbovírus (3,13).

A distribuição geográfica das arboviroses é ampla e ocorre em todos os continentes (exceto nos pólos ártico e antártico) e em alguns lugares sob forma endêmica ou epidêmica (3). A natureza da doença produzida no homem varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. As principais síndromes clínicas observadas em infecções por arbovírus são: síndrome febril, síndrome febril

com exantema, doença hemorrágica e encefalite (18,19,20,4,2), sendo que os vírus dengue, febre amarela, Oropouche e Mayaro têm sido considerados os mais importantes arbovírus que acometem humanos na região Amazônica (21,3).

Das famílias de vírus podemos destacar três que contêm alguns dos principais arbovírus associados a patologias em humanos, e são o *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Togaviridae* (2).

2.2 Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é constituída por três gêneros, *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, entretanto, apenas os flavivírus contêm representantes do grupo dos arbovírus. De acordo com os testes de classificação tradicionais, inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (FC) e neutralização (NT); os *Flavivirus* e os *Pestivirus* eram considerados membros da família *Togaviridae*. Posteriormente, com base em estudos genéticos, morfológicos e em características da replicação, esses vírus foram classificados como um grupo distinto (22). O gênero e a família *Flaviviridae* foram nomeados a partir do primeiro vírus humano identificado, o arbovírus causador da Febre Amarela. O termo *Flavus*, em latim, significa amarelo, em referência à icterícia apresentada pelo paciente em decorrência da grave disfunção hepática provocada pelo vírus (22,23).

Os flavivírus possuem envoltório lipoproteico, morfologia esférica e têm entre 40 e 60 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e tem cerca de 11 kilobases de tamanho. A extremidade 5' contém o 7- metilguanossina (*cap*), porém a porção terminal 3' não é poliadenilada ((24,22). O genoma apresenta 10 genes dispostos em uma única *open reading frame* (ORF) que codificam as três proteínas estruturais; a nucleoproteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M), a glicoproteína de superfície (E) e as sete proteínas não estruturais; NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (25).

A menor proteína estrutural é a C (PM 12-14 kDa) e cópias múltiplas desta proteína associam-se para compor o nucleocapsídeo icosaédrico. A proteína E, maior proteína 25 estrutural (PM 53-58 kDa) e a mais abundante do envelope, é

responsável pelas propriedades biológicas principais do vírus como ligação aos receptores celulares, montagem e fusão celular além de possuir os epítomos que definem os sorotipos. A resposta imune contra a proteína E é a de maior duração (25,26).

A proteína pré-M (PM 20-24 kDa) durante o brotamento é clivada originando a proteína M (PM 7-9 kDa) que, após integração com a proteína E no envelope, torna o vírus completo e infeccioso (25,27). As sete proteínas não estruturais são obtidas a partir de três ou quatro clivagens realizadas por uma protease semelhante à tripsina, a qual está presente na porção N-terminal de NS3. As duas outras clivagens são feitas pela peptidase sinal celular. A proteína NS3 também funciona como helicase e protease, além de ser parte do complexo RNA polimerase (25,28). A proteína NS5 tem atividade de polimerase e é responsável pela adição do *cap* ao RNA mensageiro.

2.3 Alphavirus

A família Togaviridae é formada por dois gêneros: *Rubivirus* e *Alphavirus*. Este último agrupa cerca de 27 arbovírus, classificados em sete sorogrupos (29). São vírus envelopados e esféricos, medindo entre 60 e 70 nm de diâmetro, cujo genoma é composto por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e diferentemente do gênero *Flavivirus*, a extremidade 3' do RNA genômico é poliadenilado. As proteínas são codificadas por sete genes, sendo quatro não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e duas ou três estruturais (glicoproteínas E1, E2 e E3, presente somente no vírus da Floresta de Semliki, do envelope e a proteína C do capsídeo) (30,31). Dois terços do genoma viral, a partir da terminação 5', codificam as quatro proteínas não estruturais em uma única poliproteína, a P1234, sintetizada por um mecanismo de leitura até o códon UGA de terminação. A síntese de P1234 parece ativar a NSP4, a qual é clivada primeiro, e o complexo P123/NSP4 sintetiza o RNA de polaridade negativa 26 complementar ao RNA genômico. Fatores do hospedeiro em conjunto com as proteínas não estruturais atuam na replicação viral. A poliproteína P123 é clivada entre a junção 1 e 2 para

compor o complexo P1/P23/NSP4, capaz de sintetizar tanto o RNA fita negativa quanto o RNA genômico 49S. Por fim, ocorre a separação das proteínas NSP2 e NSP3 e o complexo de replicação passa a ser formado pelas proteínas não estruturais completamente processadas.

As NSP's agora são capazes de sintetizar o RNA subgenômico 26S que contém os genes das proteínas estruturais. A síntese do RNA de polaridade negativa cessa, após quatro horas de infecção, enquanto que a produção dos RNA genômico 49S e subgenômico 26S continuam durante o ciclo dos alfavírus na célula. As proteínas estruturais, também, são formadas a partir de uma poliproteína que, após clivagem, dá origem as duas ou três glicoproteínas do envelope, dependendo do vírus, e a proteína C do capsídeo. O mecanismo de síntese de RNA subgenômico garante a eficiência na síntese de vírions, pois a mesma fita pode servir como molde para a produção de várias proteínas estruturais, necessárias para a montagem da progênie viral (32).

2.4 *Orthobunyavirus*

A família Bunyaviridae foi estabelecida em 1975 e, atualmente, é composta por quatro gêneros de vírus que infectam animais; *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*, e um gênero, *Tospovirus* que infectam plantas. A maioria de seus representantes foi isolada ou são transmitidos por artrópodes, à exceção dos hantavírus que fazem parte do grupo dos Robovírus, *Rodent Borne Viruses* (33,34).

Os vírus da família Bunyaviridae são esféricos, medem entre 80 e 120 nm, são envelopados e apresentam espículas na superfície. O genoma é constituído por três segmentos de RNA fita simples, denominados pequeno (S), médio (M) e grande (L). Os segmentos apresentam polaridade negativa, à exceção do segmento S no gênero *Phlebovirus* que é ambisense (33,30). Os segmentos de RNA genômicos apresentam formato circular, pois suas extremidades possuem sequências nucleotídicas complementares nas terminações, as quais pareiam de

forma estável e não covalente. Estas sequências são conservadas entre os representantes de um mesmo gênero, porém não entre gêneros distintos (34).

A proteína L é codificada no segmento de RNA de mesmo nome e tem a função de RNA polimerase dependente de RNA, importante na replicação e transcrição dos segmentos genômicos. O segmento M codifica uma poliproteína precursora que, após clivagem, dá origem as proteínas estruturais G1 e G2 do envelope e a proteína NSm, presente entre as proteínas estruturais somente nos *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* (35). O segmento S codifica a nucleoproteína estrutural N e, em sobreposição de ORFs, a proteína NSs (35).

O material genético, ao ser liberado no citoplasma da célula, é transcrito pela polimerase viral e por fatores do hospedeiro, em cópias complementares de polaridade positiva. Ribossomos livres na célula traduzem os RNAm S e L, enquanto o RNAm M é traduzido no ergastoplasma, onde as proteínas nascentes do envelope sofrem glicosilação primária. Cópias do material genético são sintetizadas, tanto para futuro encapsidamento, como para molde do RNA complementar na síntese de proteínas. Os segmentos de RNA genômicos unem-se à proteína N para formarem nucleocapsídeos individuais de formato helicoidal.

Após a montagem, o brotamento ocorre na membrana do Aparelho de Golgi e as partículas maduras são liberadas da célula pela fusão das vesículas citoplasmáticas com a membrana plasmática (34). O vírion maduro carrega consigo a polimerase (L), duas outras proteínas não estruturais, NSs e a NSm, envolvidas na replicação viral (30,2) e, pelo menos, um nucleocapsídeo de cada segmento (34).

3 OBJETIVOS

- Verificar a presença de anticorpos totais reagentes contra arbovírus representantes das famílias *Orthobuniaviridae* (CATU, CARV, MAGV, OROV, TCMV); *Flaviviridae* (YFV, ILHV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, ROCV e SLEV); e *Alphaviridae* (EEEV, MAYV, MUCV e WEEV), além do vírus vacinal da Febre Amarela (17D), em soros que foram coletados de pessoas residentes em Teodoro Sampaio e Jacupiranga no Estado de São Paulo, e em Machadinho d'Oeste e ribeirinhos do Rio Machado, no interior do Estado de Rondônia.
- Verificar o possível contato de pessoas dessas regiões com algum dos arbovírus estudados que não seja comum no local de residência do indivíduo.
- Analisar a ocorrência de maior variedade de anticorpos contra arbovírus de acordo com o sexo e a idade, assim como maior título do soro no teste de IH.
- Caracterização epidemiológica.
- Investigar sorologicamente utilizando da técnica de MAC-ELISA se alguma das amostras seria de alguém com infecção recente para Dengue, Febre Amarela ou vírus 17D, através da detecção de anticorpos IgM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo descritivo.

4.2 Característica das Áreas do Estudo

Neste trabalho foi feita análise de amostras provenientes de quatro áreas: Rio Machado e Machadinho d'Oeste no Estado de Rondônia, e Jacupiranga e Teodoro Sampaio no Estado de São Paulo.

O Rio Machado tem ligação com a margem direita do Rio Madeira e atravessa parte do estado de Rondônia, pelo território geopolítico Madeira Mamoré (Figura 2). Encontra-se em área de Floresta Amazônica Ocidental Brasileira. Possui clima distinto em inverno (estação chuvosa) e verão (estação seca). Estas estações são importantes para sobrevivência da população que mora nesta região pois em época de seca parte do rio fica intrafegável e com isto os moradores tem muita dificuldade de se locomover para as cidades maiores.

A cidade de Machadinho d'Oeste possui uma área territorial de 8.509Km² e está localizado no território geopolítico do Vale do Jamari (Figura 3). Também está incluído dentro da Floresta Amazônica Ocidental Brasileira e, por ser relativamente próximo ao Rio Machado, também possui um clima caracterizado apenas por inverno e verão, situação que é comum às cidades que localizam-se na região intertropical do planeta.

A cidade de Jacupiranga possui uma área de aproximadamente 725,4 km² e está localizado no território geopolítico do Vale do Ribeira (Figura 4), sendo

cortado pelos rios Jacupiranga, Guaraú e Canha. Tem o clima quente e úmido e a temperatura média anual é de 22 °C.

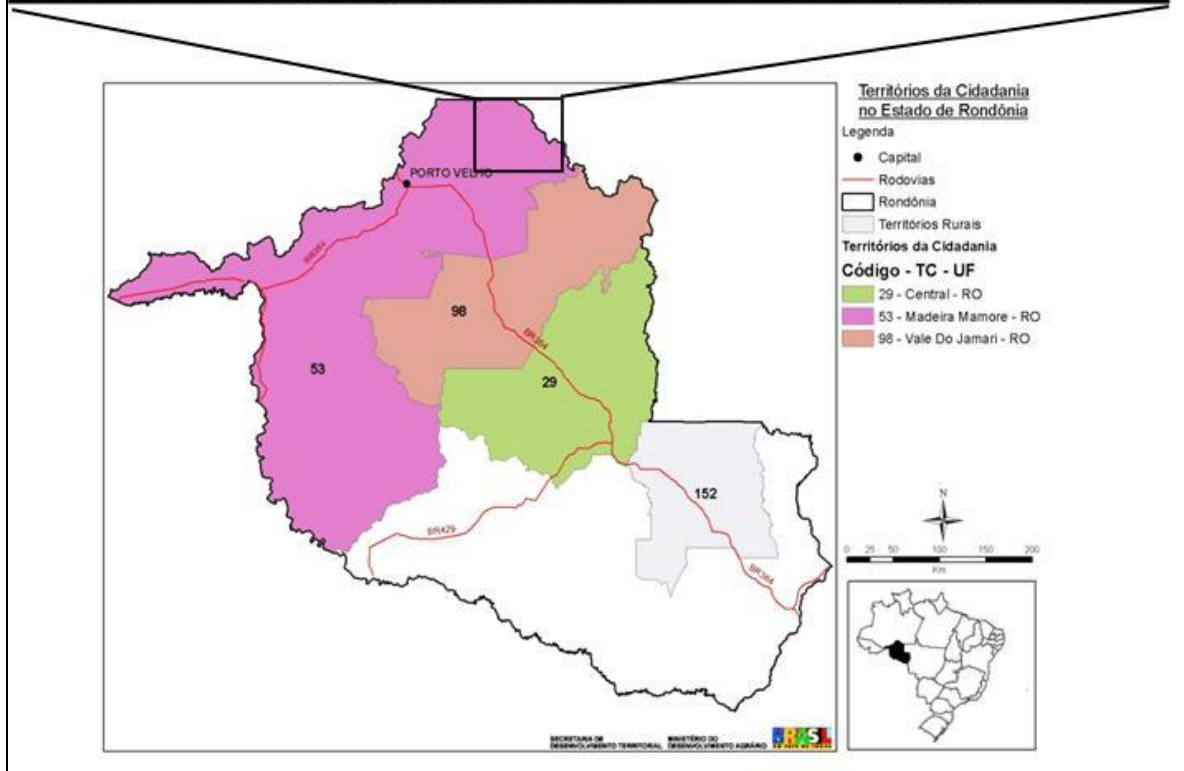


Figura 2: Mapa mostrando o Estado de Rondônia e a localização aproximada do Rio Machado (37), e acima do mapa há uma foto de parte do Rio Machado (38) com a marcação dos pontos de coleta de acordo com o GPS registrado.

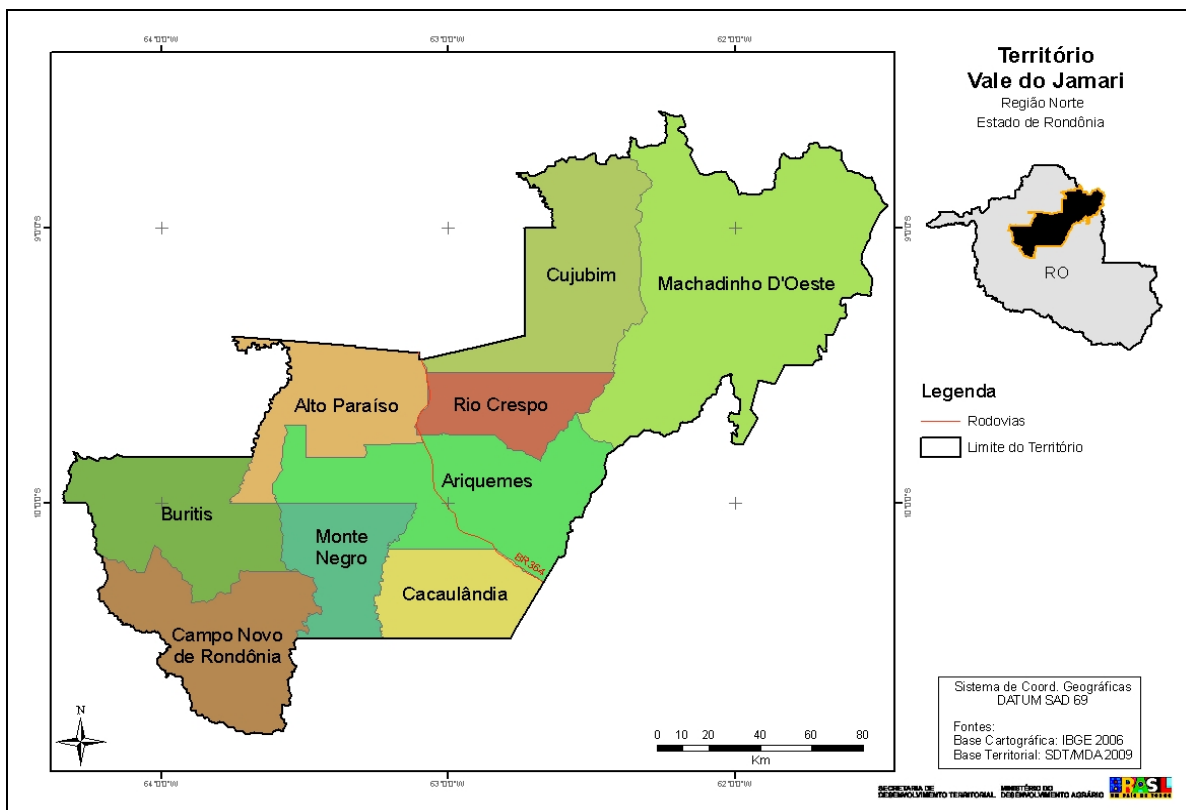


Figura 3: Mapa do Território do Vale do Jamari (38).



Figura 4: Mapa com a localização geográfica da cidade de Jacupiranga (38)

A cidade de Teodoro Sampaio tem uma área territorial de 1.557 Km², localizada em área de mata atlântica e possui uma vasta rede hidrográfica (Figura 5)



Figura 5: Mapa com a localização geográfica da cidade de Teodoro Sampaio (41).

4.3 População Estudada.

O Rio Machado possui ao longo das suas margens locais onde pessoas constroem casas para morar (ribeirinhos), na maioria das vezes de maneira precária utilizando madeira e outros materiais de fácil acesso. Existe uma estimativa de que pelo menos 806 pessoas moram nesta região, porém esta população migra com frequência para outras localidades (42).

Machadinho d'Oeste tem sua população estimada em 33.159 habitantes, Parte significativa das pessoas da cidade trabalham em ambiente de mata fechada, como seringueiros e cortadores de madeira (em madeireiras) (37).

A cidade de Jacupiranga possui uma população estimada em 16.322 habitantes. A principal atividade econômica da região é o cultivo da banana (39).

A população de Teodoro Sampaio é estimada em 21.202 habitantes (39).

4.4 Definição de Caso Positivo

Neste trabalho foi considerado resultado positivo as amostras de soro que apresentaram título de anticorpos de 1:20 ou mais no teste de HI.

Para determinar se o indivíduo entrou em contato com o arbovírus, o mesmo deveria apresentar resposta monotípica no teste de HI, isto é, ser positivo para apenas um arbovírus e negativo para os outros arbovírus do mesmo gênero. Também foram considerados sinais de resposta contra um arbovírus específico, quando a amostra apresentava no teste de HI um título de anticorpos para apenas um arbovírus quatro vezes maior que o título de anticorpos dos outros arbovírus.

Para determinar contato recente com DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV e 17D, foi considerado positivo quando a amostra de soro apresentou título de anticorpos IgM com absorvância superior a 0.200 mm no teste de MAC-ELISA.

4.3 Característica da Amostra da População Estudada

Para o desenvolvimento deste trabalho epidemiológico, foi utilizada uma amostragem de conveniência, contendo oitocentos e cinquenta e cinco (n=855) amostras de soro humano que fazem parte da coleção do Departamento de Virologia do ICB - 2 (soroteca) pertencente ao professor Edison Luiz Durigon. Deste total, 628 amostras são provenientes do Estado de Rondônia (Rio Machado (N=343) e cidade de Machadinho d'Oeste (N=285) e 227 são do Estado de São Paulo (cidade de Jacupiranga (N=149) e cidade de Teodoro Sampaio (N=78) (Figura 6).

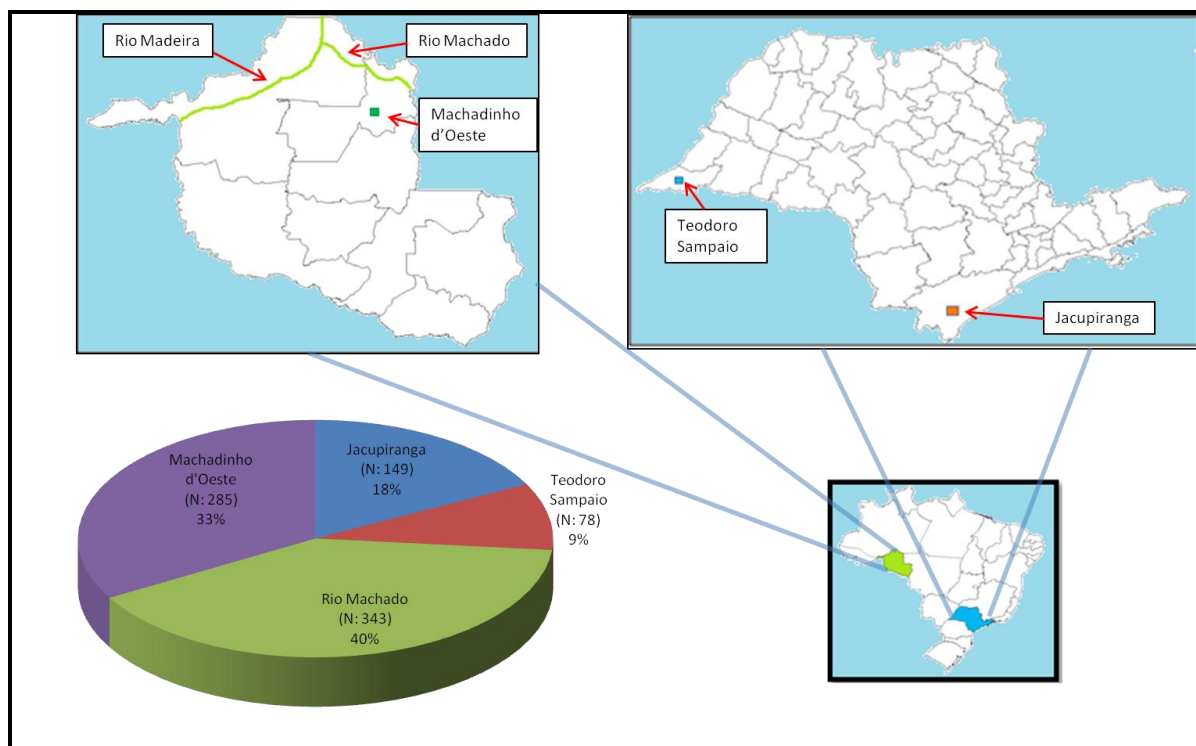


Figura 6: Mapa demonstrando a localização aproximada das cidades de Jacupiranga e Teodoro Sampaio no estado de São Paulo, e as cidades de Machadinho d'Oeste e o Rio Machado no Estado de Rondônia, assim como o número (N) e a porcentagem (%) de amostras em cada uma dessas localidades.

Em Rondônia, N=343 amostras foram coletadas em Agosto e Setembro de 2003 de pessoas que residem ao longo das margens (“ribeirinhas”) do Rio Machado, situado a 250 km pela margem direita do Rio Madeira; em área de Floresta da Amazônia Ocidental Brasileira (Figura 2). Ao todo foram 33 pontos de coletas distantes uns dos outros em pontos isolados ao longo do rio (ANEXO A). O banco de dados destas amostras continha informações como nome, idade e sexo.

Em Machadinho d'Oeste, localizado no território do Vale do Jamari (Figura 3) foram coletadas em 2005 N=285 amostras (ANEXO A). O banco de dados deste trabalho continha informações como nome, idade, sexo e resultados de testes bioquímicos feito nos soros coletados.

Das 227 amostras escolhidas que são provenientes do Estado de São Paulo, 149 soros foram coletados de residente da cidade de Jacupiranga, localizada no Vale do Ribeira (Figura 2) em Julho de 2007. As coletas foram feitas em sete locais distantes uns dos outros, com média de 21 amostras coletadas em cada um (ANEXO A).

Outras 78 amostras foram coletadas em Maio de 2008 e são de parte da população residente da cidade de Teodoro Sampaio, localizada no Pontal do Paranapanema, no estado de São Paulo (Figura 4). As coletas foram feitas em 4

pontos geograficamente distantes uns dos outros e com média de 19 amostras coletadas em cada um (ANEXO A).

A coleta de sangue total de todas as amostras de Rondônia e de São Paulo foram feitas através de venopuntura da veia cefálica ou braquial, após assepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e depois centrifugado para retirada do soro. Em seguida foi realizado a separação, que foram acondicionados em criotubos e congelados. Nas coletas no Rio Machado, em Jacupiranga e em Teodoro Sampaio as amostras foram armazenadas em recipiente com nitrogênio líquido (-192 °C) e depois guardados em Freezer à -70 °C. Na coleta em Machadinho do Oeste as amostras foram armazenados diretamente em Freezer – 20 °C e posteriormente armazenadas em Freezer -70 °C para análises futuras.

4.4 Variáveis do Estudo

Neste trabalho foram consideradas as variáveis de idade, sexo e local onde cada indivíduo moravam.

4.5 Técnicas Sorológicas

Neste trabalho todos os soros humanos separados foram testados primeiro pela técnica de Inibição da Hemaglutinação (IH), para verificação do título de anticorpos totais presentes contra os 17 sorotipos de arbovírus diferentes que causam doença em humanos no Brasil mais a cepa vacinal da Febre Amarela (vírus 17D). Após esse teste, aqueles que apresentavam título alto para um dos quatro sorotipos diferentes do vírus da Dengue e/ou título alto para Febre Amarela ou 17D foram testados também pela técnica de ELISA por captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA). Ambos os testes de todas as amostras foram feitas no laboratório de

sorologia da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC), na cidade de Belém do Estado do Pará.

4.5.1 Inibição da Hemaglutinação (HI)

As amostras de soro obtidas foram testadas por HI contra antígenos de 18 sorotipos de arbovírus, representantes das famílias *Orthobuniaviridae* (CATU, CARV, MAGV, OROV, TCMV); *Flaviviridae* (YFV, ILHV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, ROCV e SLEV); e *Alphaviridae* (EEEV, MAYV, MUCV e WEEV), além do vírus vacinal da YF (17D).

A primeira etapa da técnica de HI é o tratamento dos soros que serão testados. Esta etapa é muito importante, pois tem como objetivo retirar os inibidores não específicos que podem impedir a hemaglutinação, causando assim resultados falsos positivos. Neste tratamento foi adicionando 50 µl do soro, que será testado, em um tubo de ensaio em proporção de 13x100mm. Acrescentou-se ao tubo 0,45ml de NaCl à 0,85% homogeneizando-o. Depois foram adicionados 6ml de acetona PA (100%) com temperatura aproximada de 4 graus Celsius (4 °C) e agitou-se para que os grumos formados ficassem suspensos no tubo. Após a agitação, o tubo foi vedado e colocado dentro de uma geladeira a 4 °C por cinco minutos. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 2000 rotações por minuto (2000rpm), desprezado a acetona do tubo e em seguida adicionado mais 6 ml de acetona PA de temperatura de 4 °C, fazendo novamente a agitação e vedação. O tubo foi colocado na geladeira 4 °C por 1 hora e em seguida centrifugado por 5 minutos à 2000rpm. O sobrenadante foi desprezado com cuidado para não deixar cair os grumos formados, e o tubo foi colocado em uma bomba de vácuo durante uma hora para que toda a acetona fosse evaporada. Após esta etapa foi adicionado ao tubo 0,5ml de solução de borato de salina com o seu potencial hidrogeniônico igual a nove (ph 9,0), com objetivo de hidratar as proteínas do soro dentro do tubo, incluindo os anticorpos, durante 30 minutos.

Assim como foi feito o tratamento do soro, também foi feito o tratamento das hemácias que foram utilizadas nos testes. Os animais coletados eram gansos

domésticos (*Anser cinereus*), brancos e machos. O sangue era sempre do tipo O Rh negativo, pois deveria ter o mínimo possível de antígenos presente nas hemácias. O sangue foi coletado assepticamente da veia jugular ou da asa do ganso em quantidade necessária para prover glóbulos por uma ou duas semanas de testes. A agulha utilizada foi a número 20 acoplada a uma seringa contendo 1,5ml de solução ácido, citrato e dextrose (ACD) para cada 8,5ml de sangue a ser coletado. Em seguida o sangue coletado foi centrifugado por 15 minutos a 2000rpm, depois foi desprezado o sobrenadante e então os glóbulos foram lavados 4 vezes com uma solução de dextrose, gelatina e veronal (DGV). Para fazer esta lavagem foi colocado em um tubo certo volume de hemácias e depois foram adicionadas três vezes este mesmo volume de DGV, então foi centrifugado por 8 minutos a 2000rpm e desprezado o sobrenadante. Na parte final do tratamento as hemácias foram suspensas 1:5 em DGV.

Antes de serem utilizadas em cada teste as hemácias tratadas eram lavadas com NaCl a 0,85% para retirar a hemoglobina da solução existente devido a lise de alguns glóbulos. A lavagem foi feita adicionando, em um tubo de ensaio de 50 ml, o sangue de ganso coletado e a solução de NaCl em volumes iguais, depois o tubo foi agitado até a solução ficar homogênea, com cuidado para não hemolisar as hemácias, após isto o tubo era centrifugado a 2300rpm por 8 minutos e então o sobrenadante formado foi retirado com uma pipeta, deixando as hemácias no fundo do tubo. Este procedimento foi repetido várias vezes até que o sobrenadante formado após a etapa de centrifugação se apresente transparente. Uma solução de albumina bovina diluída a 0,4% em solução de borato salina com ph 9,0 (BOV 0,4%) foi utilizada para diluir o concentrado de hemácias de ganso a uma proporção de 1:6, e então adicionávamos 0,6ml destas hemácias diluídas no tubo com o soro tratado e deixávamos em temperatura ambiente por 20 minutos. Esta etapa tem o objetivo de adsorver o soro com os glóbulos de ganso que serão utilizados ao longo do teste de IH, para retirar aglutininas naturais não específicas que podem causar resultados falso-negativos. Após este tempo foi feita a centrifugação por 15 minutos a 2000rpm e depois o sobrenadante formado foi transferido com uma pipeta para outro tubo de ensaio, com cuidado para não transferir as hemácias também. A amostra então estava pronta para fazer o teste de HI. Nos casos em que o teste não

foi feito no mesmo dia, as amostras de soro tratadas eram guardados em freezer -20 °C.

Antes e durante cada teste de HI devemos fazer uma análise da capacidade dos vírus, que serão utilizados no teste, de provocar aglutinação em hemácias de ganso. Esta análise é feita através da demonstração da atividade hemaglutinante destes vírus pelo Teste de Hemaglutinação (HA). Este procedimento foi feito utilizando placas de 96 orifícios com fundo em “U”. Foi colocado em cada orifício da segunda até a sexta coluna 25µl de BOV 0,4%, deixando a primeira coluna da placa vazia. Depois foi colocado 25µl de cada um dos antígenos do teste na primeira (vazia) e na segunda (com BOV 0,4%) coluna da placa, e com o pipetador multicanal agitamos os antígenos com o BOV 0,4% para depois fazer a passagem de 25µl desta mistura para o orifício a diante, fazendo diluições seriadas até a sexta coluna. Após fazer todas as diluições, o volume restante no pipetador multicanal foi descartado e depois foi adicionado 25µl de BOV 0,4% em toda placa. Em seguida foi colocado 50µl de hemácias tratadas de ganso diluídas em ph ótimo correspondente de cada antígeno na placa, e utilizamos um agitador mecânico para balançar a mesma durante 20 segundos. As placas foram cobertas para não evaporar a reação e foram incubadas por 30 minutos, sendo que parte dos antígenos a incubação era à temperatura ambiente e outra parte era incubada à 37 °C. Após esse período era feito a leitura das placas, observando e escrevendo o padrão hemaglutinante observado: “+” (hemaglutinação completa, com formação de película delgada de hemácias, uniformemente ajustada a curvatura do orifício), “O” (não hemaglutinação, com formação de botão devido a sedimentação das hemácias para o fundo do orifício). O título dos antígenos ótimo para a utilização nos testes deveria ser de 4 unidades hemaglutinantes conforme a técnica descrita por Shope (14).

Após a titulação dos antígenos, era então feito o teste de IH. A primeira etapa era a triagem das amostras. Nesta etapa foi colocado em uma placa de 96 orifícios devidamente identificada 25µl do soro tratado e em seguida 25µl do antígeno titulado. Então a placa foi vedada e encubada em geladeira à 4°C por duas horas ou “*over night*”. Após esta incubação foi feito a revelação do teste adicionando 50µl de hemácias tratadas de ganso diluídas em ph ótimo correspondente de cada antígeno na placa. Um agitador mecânico balançava a placa por 20 segundos para

depois fazer a incubação igual a feita no teste de HA. Na leitura dos resultados nas placas, era considerado positivo quando ocorria inibição da hemaglutinação provocada pelos antígenos devido a presença de anticorpos específicos presentes no soro testado, que era observado devido a formação de um botão de hemácias no fundo da placa de 96 orifícios devido a sedimentação dos eritrócitos presentes (Figura 7). Positivo durante a triagem indica título de anticorpos na proporção 1:20.

Cada amostra foi testada para todos os antígenos e, quando positivo, ele era então titulado. Nesta etapa foi colocado 25µl da amostra na primeira e na segunda coluna de uma placa de 96 orifícios devidamente identificada, depois foi adicionado 25µl de BOV 0,4% na segunda coluna em diante até a sexta coluna na placa. Em seguida foi utilizado um pipetador de multicanal para homogeneizar a amostra com o BOV 0,4% na segunda coluna e fazer diluições seriadas semelhante a feita no teste de HA, para que no fim as amostras fiquem com as seguintes diluições: na primeira coluna da placa de 1:40, na segunda de 1:80, na terceira de 1:160, a quarta de 1:320, na quinta de 1:640, e sexta coluna de 1:1280 ou mais. Após as diluições, foram adicionados 25µl do antígeno. Cada arbovírus era testado preferencialmente em placas separadas. Estas eram vedadas e guardadas em geladeira 4 °C por 2 horas ou “*over night*” para a reação antígeno anticorpo. Em seguida foi adicionado 50µl de hemácias de ganso para a revelação do teste. A leitura dos resultados é semelhante ao da triagem, com a diferença que é anotado até qual diluição os anticorpos presentes no soro foram capaz de provocar IH.

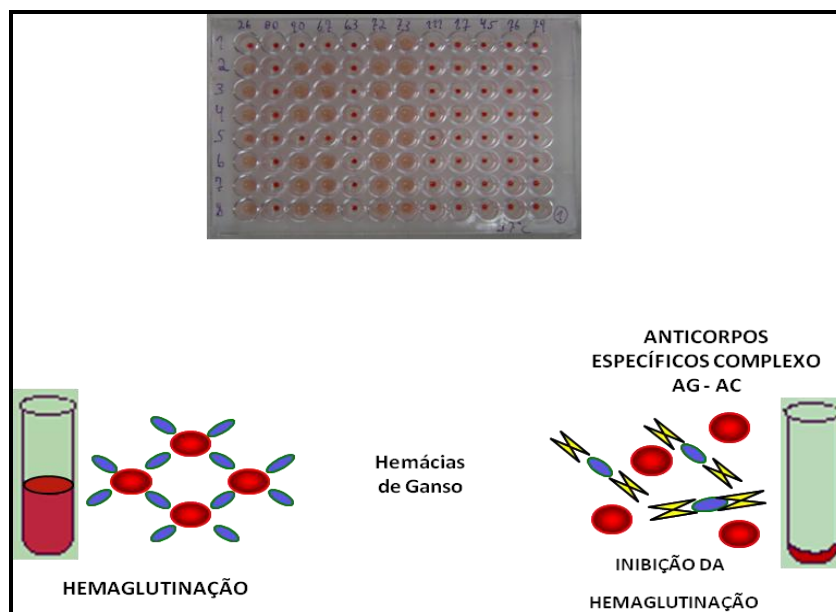


Figura 7: Esquema do teste de Inibição da Hemaglutinação

O título do HI é definido como a maior diluição do soro que causou completa ou quase completa inibição da hemaglutinação com 4 unidades de antígenos.

4.5.2 Ensaio Imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgM anti VDEN e/ou FA (MAC-ELISA).

O ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é o procedimento sorológico mais útil disponível para determinar infecções recentes por VDEN. Este teste geralmente substitui outras técnicas devido a sua sensibilidade, possibilidade de automação e capacidade de acomodar um grande número de amostras (3). Esta metodologia utilizada é a descrita na citação (15) (Figura 8).

Preparação da placa de ELISA: Primeiro deve-se preparar a placa de ELISA fazendo cinco lavagens da placa com PBS pH 7,4. Após a secagem é feito a sensibilização, adicionando em cada orifício da placa 100 µl de anticorpos anti IgM humana diluída em tampão de carbonato pH 9,6. Para que ocorra uma ótima fixação destes anticorpos na parede do orifício, a placa deve ser incubada *overnight* à 4° C. A lavagem da placa deve ser repetida 5 vezes com PBS pH 7,4 para retirar os anticorpos que não ficarão aderidos na parede do orifício.

Para evitar que haja espaços vazios entre os anticorpos fixados na parede da placa (Bloqueio da placa), deve-se encher os orifícios com albumina bovina a 4% em PBS pH 7,4 e incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente (TA, aproximadamente a 28 °C), para que estas proteínas se fixem nestes espaços (Bloqueio da placa). Após a incubação, deve-se lavar a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 para retirar as proteínas não fixadas.

Colocar 50 µl dos soros a testar e controles diluídos 1:40 em SEN a 20% em PBS pH 7,4. Depois incubar durante 2 horas em temperatura ambiente, para que os anticorpos IgM presentes no soro sejam capturados pelos anticorpos anti-IgM fixados na placa. Após a incubação, deve-se lavar a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 para que fique apenas os anticorpos capturados.

Colocar 50 µl do antígeno do DENV diluído em SEN a 20% em PBS pH 7,4 em cada orifício. Depois deve incubar *overnight* a 4 °C para propiciar a reação do antígeno com o anticorpo IgM específico para DENV. Após a incubação, deve-se lavar a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 para a retirada de antígeno que não reagiu.

Colocar 25 µl de HRP *conjugated 6B6C-1 monoclonal antibody / Jackson immuno research* (conjugado), diluído em SEN a 20% em PBS pH 7,4 em cada orifício. Este conjugado é formado por anticorpos monoclonais anti-flavivírus marcados com peroxidase, e que se ligam ao complexo antígeno-anticorpo que por ventura estejam aderido na placa. Para que ocorra uma ótima fixação do conjugado, deve-se incubar a placa durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, deve-se lavar a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 para que seja retirado o conjugado que não esteja fixado na placa. Colocar 100µl de substrato ABTS em cada orifício e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Fazer a leitura em espectrofotômetro (Multiskan) com filtro 405 nm. Soros com densidade óptica maior ou igual a 0,200 é considerado positivo para dengue.

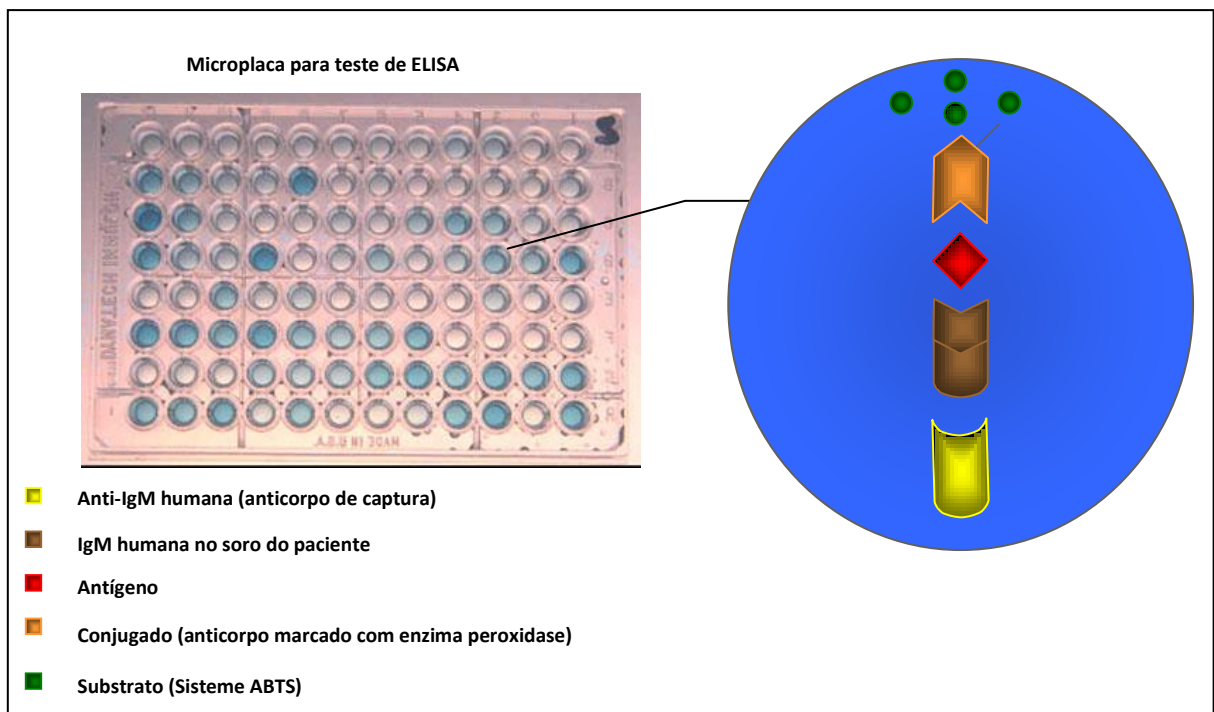


Figura 8: Esquema do MAC-ELISA (13)

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do teste de HI

Os primeiros testes realizados foram do HI, e os resultados totais obtidos foram de 642 (75,09%) amostras positivas para pelo menos uma das arbovirose testadas, e 213 (24,91%) amostras negativas. Do total de amostras positivas, 407 (47,48%) foram positivas apenas para pelo menos um dos arbovírus do gênero *flavivirus* que foram utilizados no teste (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, 17D, ILHV, SLEV e ROCV); outras 18 (2,10%) foram positivas apenas para pelo menos um dos arbovírus do gênero *Alphavirus* que foram utilizados no teste (EEEV, WEEV, MAY e MUC); outras 18 (2,10%) amostras foram positivas apenas para pelo menos um dos arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* que foram utilizados no teste (ORO, MAG, TAC, CAR e CATU); outras 98 (11,45%) amostras foram positivas para pelo menos um arbovírus do gênero *Alphavirus* e um do gênero *Flavivirus* ao mesmo tempo; outras 62 (7,25%) amostras foram positivas para pelo menos um arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* e um do gênero *Flavivirus* ao mesmo tempo; outras três (0,35%) amostras foram positivas para pelo menos um arbovírus do gênero *Alphavirus* e um do gênero *Orthobunyavirus* ao mesmo tempo; e por fim 37 (4,33%) amostras foram positivas para pelo menos um arbovírus de cada um dos três gêneros que foram utilizados no teste ao mesmo tempo (Figura 11).

Para que ocorra uma melhor discussão dos resultados, eles serão separados em 4 regiões: Região da cidade de Teodoro Sampaio, Região da cidade de Jacupiranga, Região do Rio Machado e Região da cidade de Machadinho d' Oeste.

As amostras provenientes do Rio Machado (N=343), no Estado de Rondônia, totalizaram 93 (27,11%) amostras negativas e 230 (67,05%) amostras positivas para arbovírus, sendo que destes 20 (5,83%) amostras foram positivas para EEEV, 40 (11,66%) para WEEV, 58 (16,11%) para MAYV, 46 (13,41%) para MUCV, 11 (3,21%) para MAGV, 13 (3,79%) para TCMV, 16 (4,66%) para CARV, 10 (2,91%) para OROV, 7 (2,04%) para CATU, 137 (39,94%) para YFV, 111 (32,36%)

para 17D, 204 (59,48%) para ILHV, 152 (44,31%) para SLEV, 99 (28,86%) para ROCV, 80 (23,32%) para DENV-1, 94 (27,40%) para DENV-2, 99 (28,86%) para DENV-3 e 123 (35,86%) amostras positivas para DENV-4.

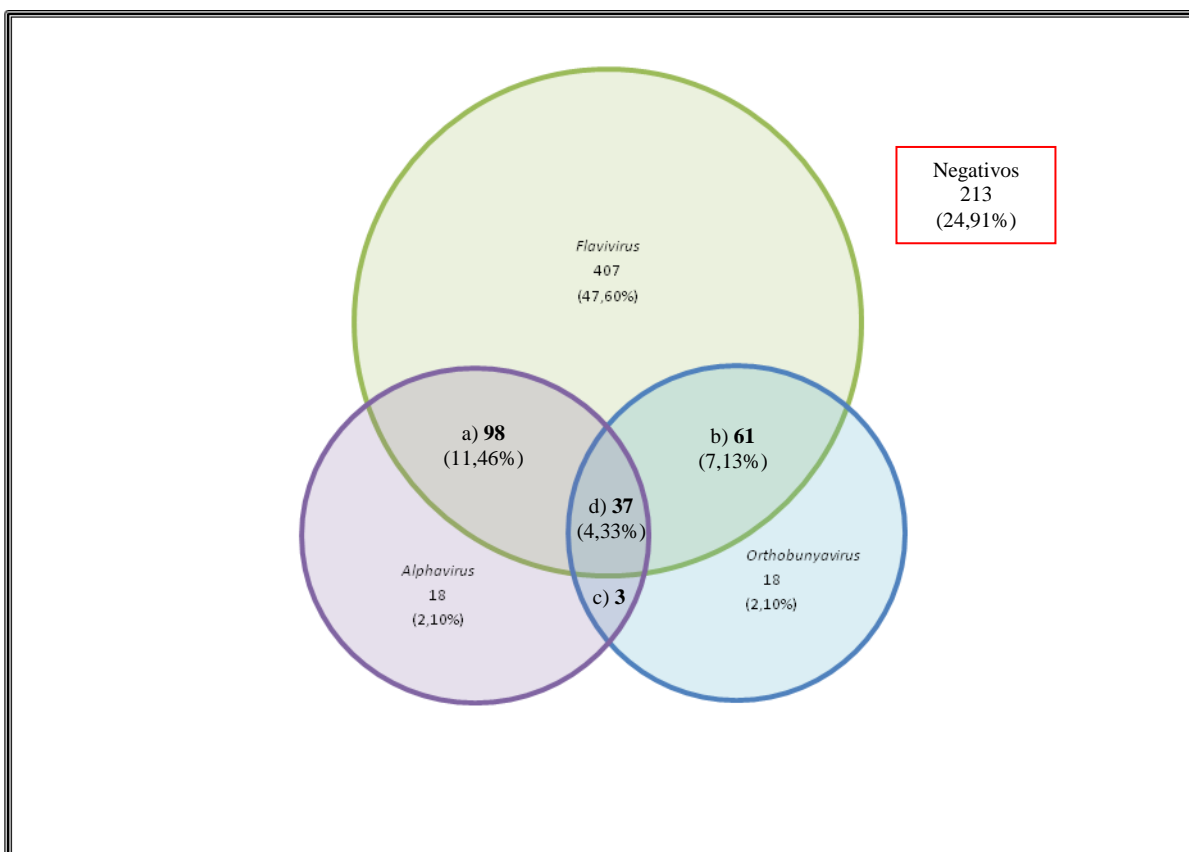


Figura 9: Número de amostras positivas para arbovírus e negativas no teste de HI. As amostras positivas foram divididas em: *Flavivirus* (positivos apenas para arbovírus do gênero *Flavivirus*), *Alphavirus* (positivos apenas para arbovírus do gênero *Alphavirus*), *Orthobunyavirus* (positivos apenas para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus*), a) positivos para arbovírus do gênero *Alphavirus* e *Flavivirus* ao mesmo tempo; b) positivos para arbovírus do gênero *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* ao mesmo tempo; c) positivos para arbovírus do gênero *Alphavirus* e *Orthobunyavirus* ao mesmo tempo; d) positivo para os três gêneros (*Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*) ao mesmo tempo.

As amostras provenientes da cidade de Machadinho d'Oeste (N=285), no Estado de Rondônia, totalizaram 12 (4,21%) amostras negativas e 273 (95,79%) amostras positivas para arbovírus, sendo que destas amostras 4 (1,40%) foram positivos para EEEV, 30 (10,53%) para WEEV, 23 (8,07%) para MAYV, 7 (2,46%) para MUCV, 10 (3,51%) para MAGV, 7 (2,46%) para CARV, 39 (13,68%) para OROV, 171 (60,00%) para ILHV, 104 (36,49%) para SLEV, 174 (61,05%) para ROCV, 121 (42,46%) para YFV, 226 (79,30%) para 17D, 155 (54,39%) para DENV-1, 170 (59,65%) para DENV-2, 208 (72,98%) para DENV-3 e 186 (65,26%) amostras positivas para DENV-4.

As amostras provenientes da cidade de Jacupiranga (N=149), no Estado de São Paulo, totalizaram 84 (56,38%) amostras negativas e 65 (43,62%) positivas para arbovírus, sendo que destas amostras 3 (2,01%) foram positivos para EEEV, uma (0,67%) amostra apenas foi positiva para WEEV e uma outra para MAYV, 5 (3,36%) para MUCV, 5 (3,36%) para MAGV, (6,04%) para TCMV, 16 (10,74%) para CARV, 2 (1,34%) para OROV; 8 (5,37%) para CATU, 37 (24,83%) para ILHV, 31 (20,80%) para SLEV, 5 (3,36%) para ROC, 12 (8,05%) para YFV, 10 (6,71%) para 17D, 14 (9,40%) para DENV-1, 7 (4,70%) para DENV-2, 21 (14,09%) para DENV-3 e 14 (9,40%) amostras foram positivas para DENV-4.

As amostras provenientes da cidade de Teodoro Sampaio (N=78), no Estado de São Paulo, totalizaram 23 (29,49%) amostras negativas e 55 (70,51%) amostras positivas para arbovírus, sendo que destas amostras 19 (24,35%) foram positivas para ILHV, 17 (21,79%) para SLEV, 16 (20,51%) para ROCV, 41 (52,56%) para YFV, 43 (55,13%) para 17D, 15 (19,23%) para DENV-1, 11 (14,10%) para DENV-2, 25 (32,05%) para DENV-3 e 14 (17,95%) amostras foram positivas para DENV-4.

Uma planilha com todos os resultados dos testes de IH acima citados estão em anexo nesta tese (ANEXO C), e podem ser observados todas as amostras que foram testadas, o título de anticorpos presente no soro contra cada um dos arbovírus testados, a idade e o sexo de cada indivíduo.

Para observar a ocorrência dos gêneros de arbovírus testados em cada localidade, as amostras foram divididas em oito grupos:

- 1) Positivos para *flavivirus* (Pos Flav): Aqui foram agrupadas as amostras que foram HI positivos apenas para os vírus do gênero *flavivirus*. As amostras que foram positivas para qualquer vírus do gênero *orthobunyavirus* ou *alphavirus* foram excluídas deste grupo, mesmo que tenham sido positivas também para *flavivirus*. Neste grupo, Teodoro Sampaio teve 55 (70,50%) positivos, Jacupiranga teve 41 (27,50%), Machadinho d'Oeste teve 182 (63,90%) e Rio Machado teve 130 (37,90%) de positivos.
- 2) Positivos para *alphavirus* (Pos Alp): Aqui foram agrupadas as amostras que foram HI positivas apenas para os vírus do gênero *alphavirus*. As amostras que foram positivas para qualquer vírus do gênero *flavivirus* ou *orthobunyavirus* foram excluídas deste grupo, mesmo que tenham sido positivas também para

alphavirus. Neste grupo, Jacupiranga teve 2 (1,40%) positivos, Machadinho d'Oeste teve 1 (0,30%) e Rio Machado teve 15 (4,40%) positivos.

- 3) Positivos para *orthobunyavirus* (Pos Ortho): Aqui foram agrupadas as amostras que foram HI positivas apenas para os vírus do gênero *orthobunyavirus*. As amostras que foram positivas para qualquer vírus do gênero *flavivirus* ou *alphavirus* foram excluídas deste grupo, mesmo que tenham sido positivas também para *orthobunyavirus*. Neste grupo, Jacupiranga teve 13 (8,70%) positivos, Machadinho d'Oeste teve 1 (0,30%) e Rio Machado teve 4 (1,20%) positivos.
- 4) Positivos para *flavivirus* e *alphavirus* ao mesmo tempo (Flav e Alp): Aqui foram agrupadas apenas as amostras que foram positivas para pelo menos um vírus do gênero *flavivirus* e também do gênero *alphavirus* ao mesmo tempo. Neste grupo, Jacupiranga teve 2 (1,30%) positivos, Machadinho d'Oeste teve 32 (11,20%) e Rio Machado teve 64 (18,70%) positivos.
- 5) Positivos para *flavivirus* e *orthobunyavirus* ao mesmo tempo (Flav e Orto): Aqui foram agrupadas apenas as amostras que foram positivas para pelo menos um vírus do gênero *flavivirus* e também do gênero *orthobunyavirus* ao mesmo tempo. Neste grupo, Jacupiranga teve 4 (2,70%) positivos, Machadinho d'Oeste teve 40 (14,00%) e Rio Machado teve 17 (5,00%) positivos.
- 6) Positivos para *alphavirus* e *orthobunyavirus* ao mesmo tempo (Alp e Orto): Aqui foram agrupadas as amostras que foram positivas para pelo menos um vírus do gênero *alphavirus* e *orthobunyavirus* ao mesmo tempo. Neste grupo, Machadinho d'Oeste teve um (0,30%) positivo e Rio Machado teve dois (0,60%) positivos.
- 7) Positivos para os três gêneros ao mesmo tempo (Alp Flav Ort): Aqui foram agrupadas as amostras que foram positivas para pelo menos um vírus de cada um dos três gêneros pesquisados ao mesmo tempo. Neste grupo, Jacupiranga teve 3 (2,0%) positivos, Machadinho d'Oeste teve 16 (5,50%) positivos e Rio Machado teve 18 (5,20%) positivos.
- 8) Negativos (Neg): Aqui foram agrupadas apenas as amostras que foram negativas para todos os vírus testados no HI. A quantidade e a porcentagem de amostras negativas para arbovírus em cada uma das localidades já foram citadas anteriormente.

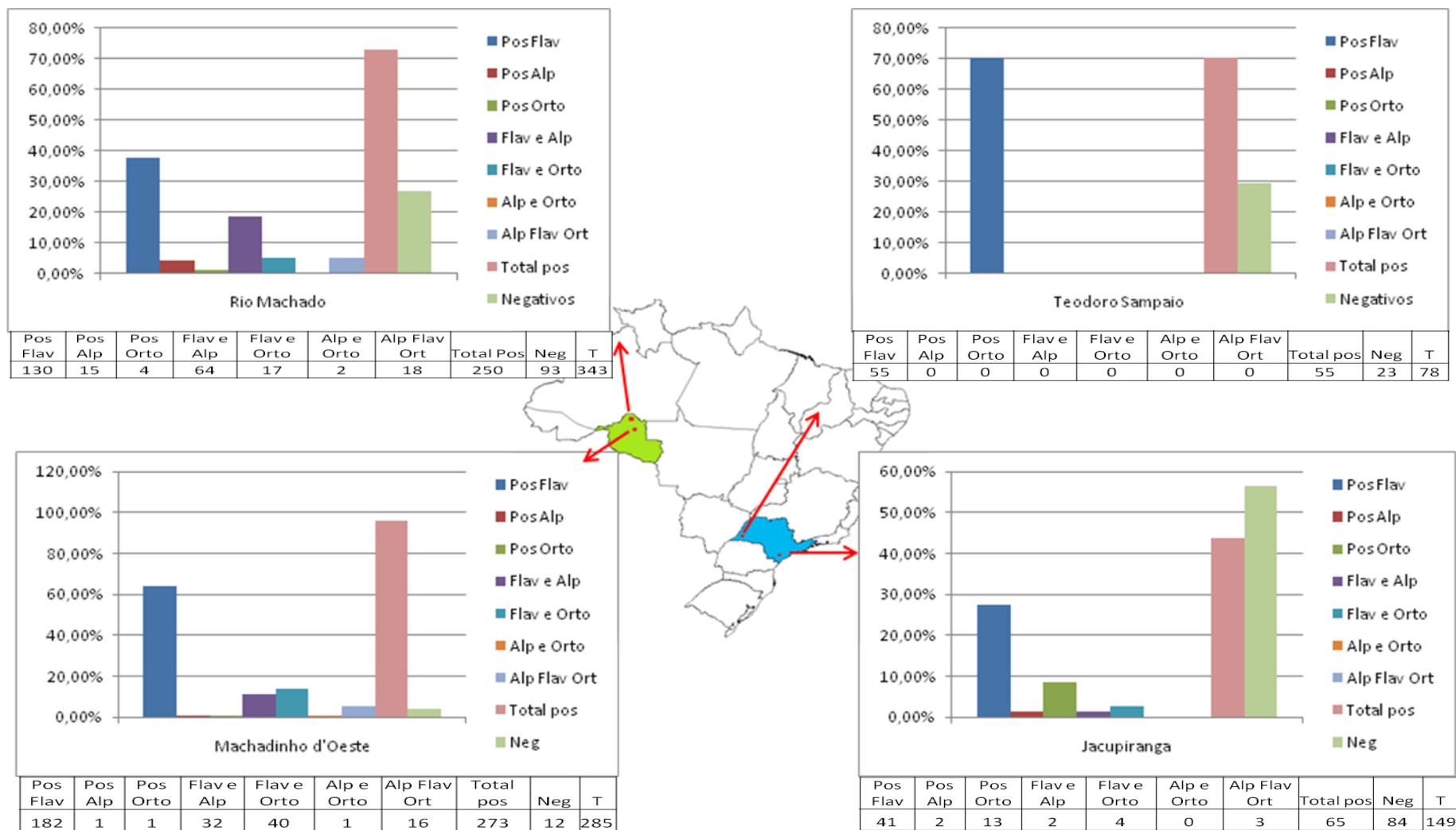


Figura 10: Número de amostras com resultados positivos (e em porcentagem) no teste de HI separados nas regiões do Rio Machado, Machadinho d'Oeste, Jacupiranga e Teodoro Sampaio, dividido em: Pos Flav (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Flavivirus*); Pos Alp (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Alphavirus*); Pos Orto (número de amostras positivas apenas para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus*); Flav e Alp (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Flavivirus* e *Alphavirus*); Flav e Orto (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*); Alp e Orto (número de amostras positivas para arbovírus do gênero *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*); Alp, Flav e Orto (número de amostras positivas para arbovírus dos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*), Total pos (soma de todas as amostras que foram positivas para pelo menos um arbovírus), Neg (número de amostras negativas para todos os arbovírus testados), T (total de amostras que foram testadas na região).

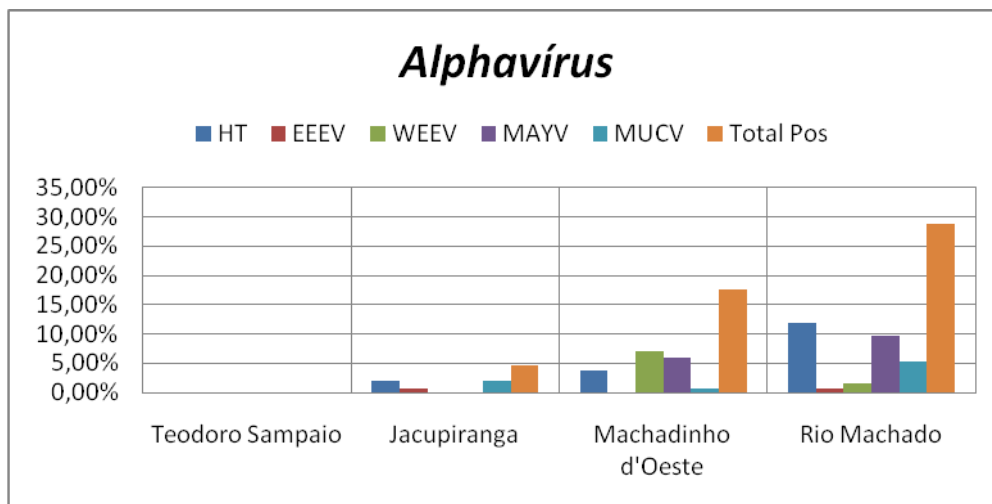
A quantidade e a porcentagem de amostras em cada um dos grupos citados anteriormente é melhor visualizado na figura 12, assim como sua distribuição em cada umas das localidades estudadas.

Com o objetivo de fazer uma análise mais precisa dos resultados, foram quantificadas as amostras que foram positivo para mais de um arbovírus de um mesmo gênero, isto é, que apresentaram resposta heterotípica (HT) no teste de HI, e também as amostras que apresentaram respostas monotípicas (MT), isto é, quantas delas foram positivas para apenas um arbovírus de cada gênero, seja *Alphavirus* (Figura 13), *Orthobunyavirus* (Figura 14) ou *Flavivirus* (Figura 15).

As amostras procedentes de Teodoro Sampaio, quando testados no HI para arbovírus do gênero *Flavivirus*, apresentaram 43 (55,13%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas MT: 5 (6,41%) para YFV; 6 (7,69%) para 17D e 1 (1,28%) para ILHV. Quando as amostras foram testadas para arbovírus dos gêneros *Orthobunyavirus* e *Alphavirus* tiveram apenas resultados negativos.

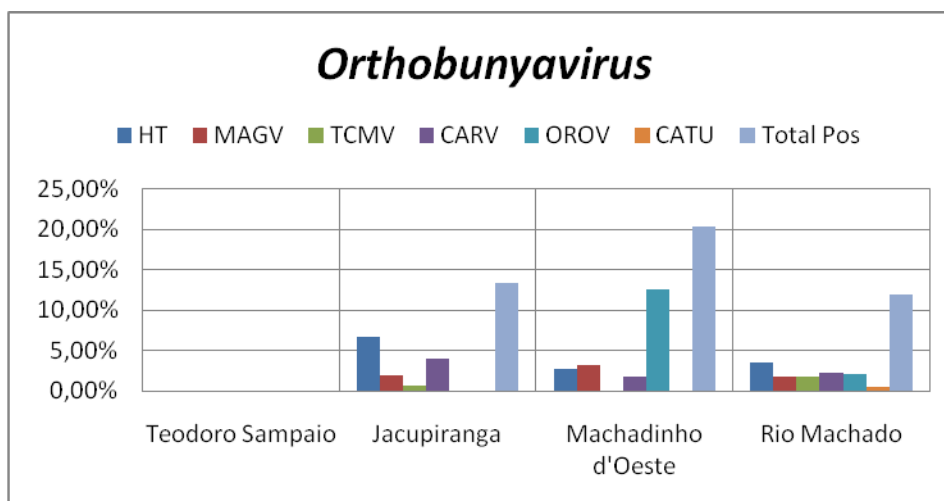
As amostras procedentes de Jacupiranga, quando testados no HI para arbovírus do gênero *Flavivirus*, apresentaram 35 (23,49%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas MT: 5 (3,36%) para DENV-3; 3 (2,01%) para DENV-1 e 7 (4,70%) para ILHV. Quando testados para arbovírus do gênero *Alphavirus* apresentaram 3 (2,01%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas MT: 1 (0,67%) para EEEV e 3 (2,01%) para MUCV. Quando testados para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* apresentaram 10 (6,71%) resultados HT e as seguintes quantidade de respostas MT: 3 (2,01%) para MAGV; 1 (0,67%) para TCMV e 6 (4,03%) para CARV.

As amostras procedentes de Machadinho d'Oeste, quando testados no HI para arbovírus do gênero *Flavivirus*, apresentaram 258 (90,53%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas MT: 1 (0,35%) para YFV; 2 (0,7%) para DENV4; 1 (0,35%) para DENV-3; 1 (0,35%) para DENV-1; 2 (0,70%) para ILHV e 5 (1,75%) para SLEV. Quando testados para arbovírus do gênero *Alphavirus* apresentara.11 (3,86%) resultados HT e as seguintes quantidade de respostas MT: 20 (7,02%) para WEEV; 17 (5,96%) para MAYV e 2 (0,70%) para MUCV. Quando testados para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* apresentaram 8 (2,81%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas MT: 9 (3,16%) para MAGV; 5 (1,75%) para CARV e 36 (12,63%) para Oropouche.



	Teodoro Sampaio	Jacupiranga	Machadinho d'Oeste	Rio Machado
HT	0	3	11	41
EEEV	0	1	0	2
WEEV	0	0	20	5
MAYV	0	0	17	33
MUCV	0	3	2	18
Total Pos	0	7	50	99
Total neg	78	142	235	244

Figura 11: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *alphavirus* no teste de HI.



	Teodoro Sampaio	Jacupiranga	Machadinho d'Oeste	Rio Machado
HT	0	10	8	12
MAGV	0	3	9	6
TCMV	0	1	0	6
CARV	0	6	5	8
OROV	0	0	36	7
CATU	0	0	0	2
Total Pos	0	20	58	41
Total neg	78	129	227	302

Figura 12: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *orthobunyavirus* no teste de HI.

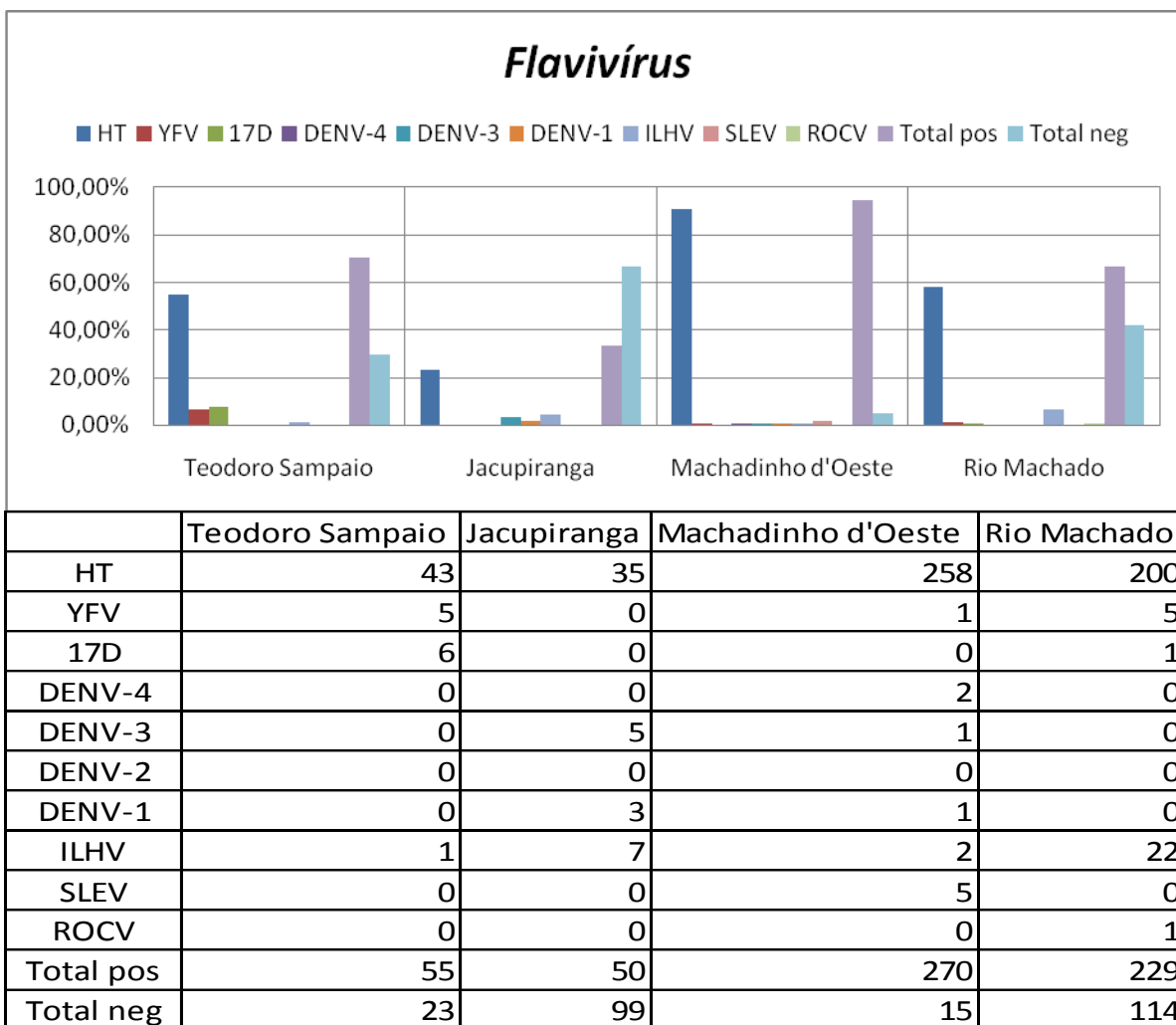


Figura 13: Número e porcentagem de amostras que apresentaram respostas HT e MT para *flavivirus* no teste de HI.

As amostras procedentes dos ribeirinhos do Rio Machado, quando testados para arbovírus do gênero *Flavivirus* apresentaram 200 resultados HT e as seguintes quantidades de respostas monotípicas: 5 (1,46%) para YFV; 1 (0,29%) para 17D; 22 (6,41%) para ILHV e 1 (0,29%) para ROCV. Quando testados para arbovírus do gênero *Alphavirus* apresentaram 41 (11,95%) resultados HT e as seguintes quantidades de respostas monotípicas: 2 (0,58%) para EEEV; 5 (1,46%) para WEEV; 33 (9,62%) para MAYV e 18 (5,25%) para MUCV. Quando testados para arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* apresentaram 12 (3,5%) resultados HT e as seguintes respostas monotípicas: 6 (1,75%) para MAGV; 6 (1,75%) para TCMV; 8 (2,33%) para CARV, 7 (2,04%) para OROV e 2 (0,58%) para CATU.

O título de cada uma das amostras do teste de HI foram estudadas para verificar a ocorrência de resultados com pico em apenas um arbovírus com diferença de quatro vezes maior em relação aos demais arbovírus do mesmo gênero, o que

pode ser considerado um achado indicativo de contato com o vírus. Estes resultados foram distribuídos de acordo com a localidade das amostras, sendo estas Teodoro Sampaio (Figura 16), Jacupiranga (Figura 17), Machadinho d'Oeste (Figura 18) e Rio Machado (Figura 19).

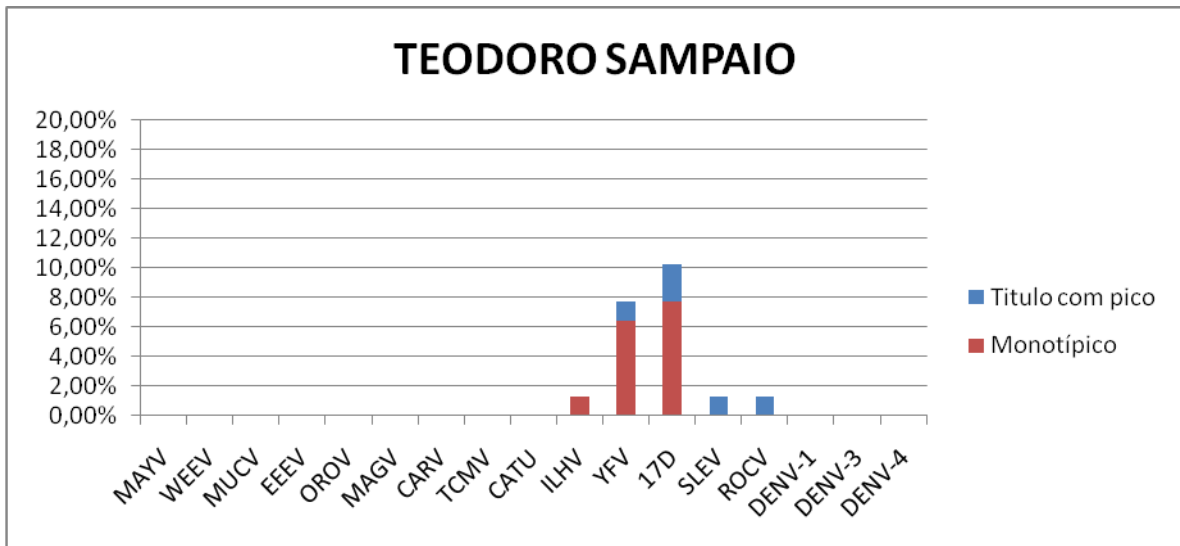


Figura 14: Porcentagem de respostas com pico no teste de HI e respostas monotípicas nas amostras de Teodoro Sampaio

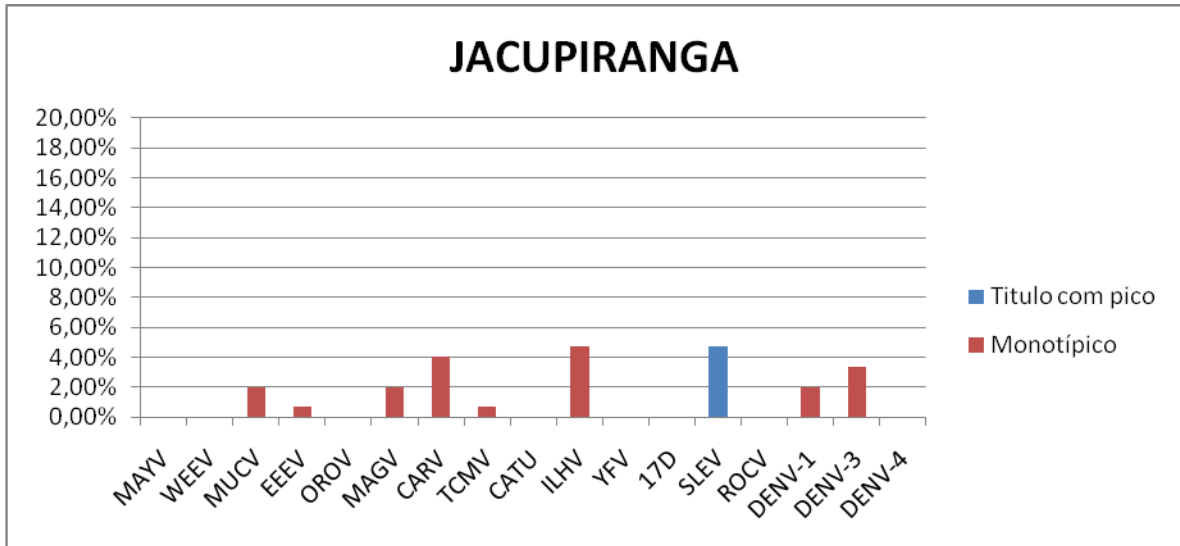


Figura 15: Porcentagem de respostas com pico no teste de HI e respostas monotípicas nas amostras de Jacupiranga

Também foi calculado a porcentagem que cada um dos títulos de anticorpos no teste de HI (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e maior ou igual a 1:1280) ocorreram em cada uma das regiões estudadas, sendo esses dados separados entre os gêneros *flavivirus* (Figura 20), *alphavirus* (Figura 21) e *orthobunyavirus* (Figura 22).

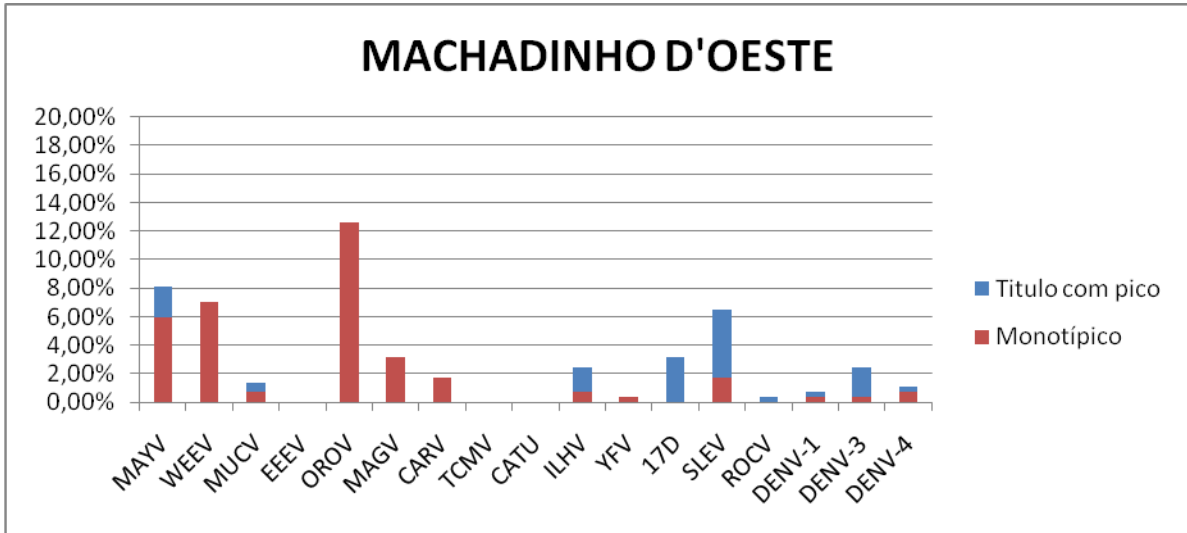


Figura 16: Porcentagem de respostas com pico no teste de HI e respostas monotípicas nas amostras de Machadinho d'Oeste

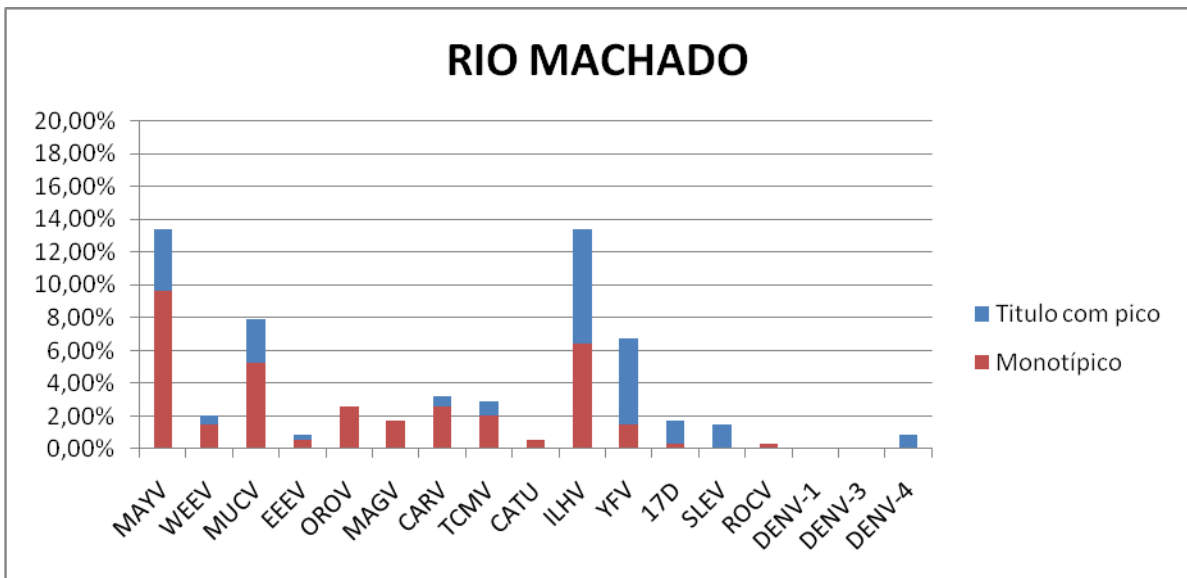


Figura 17: Porcentagem de respostas com pico no teste de HI e respostas monotípicas nas amostras de Rio Machado.

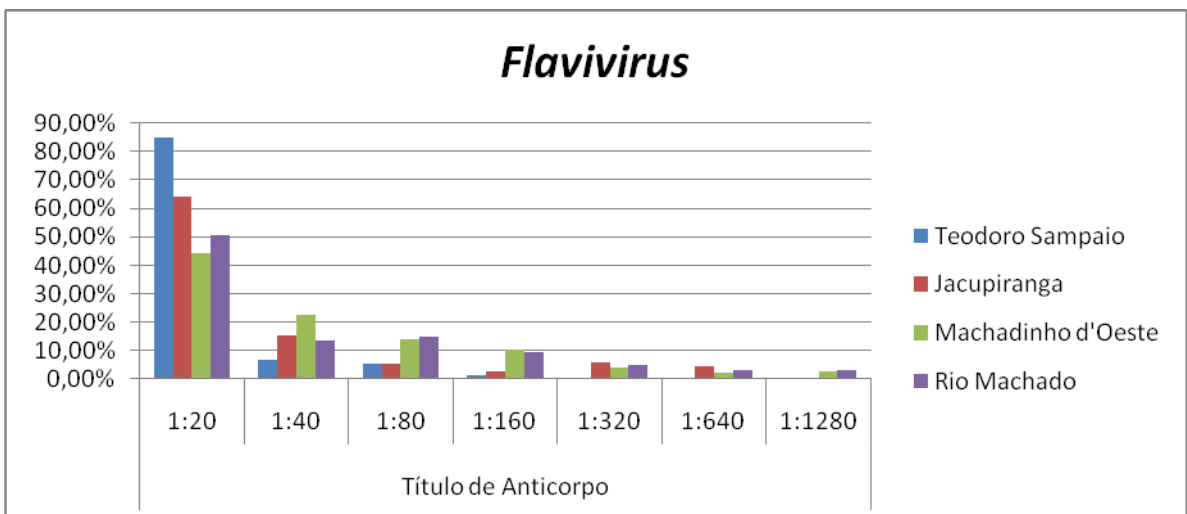


Figura 18: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *flavivirus* em cada umas das regiões estudadas

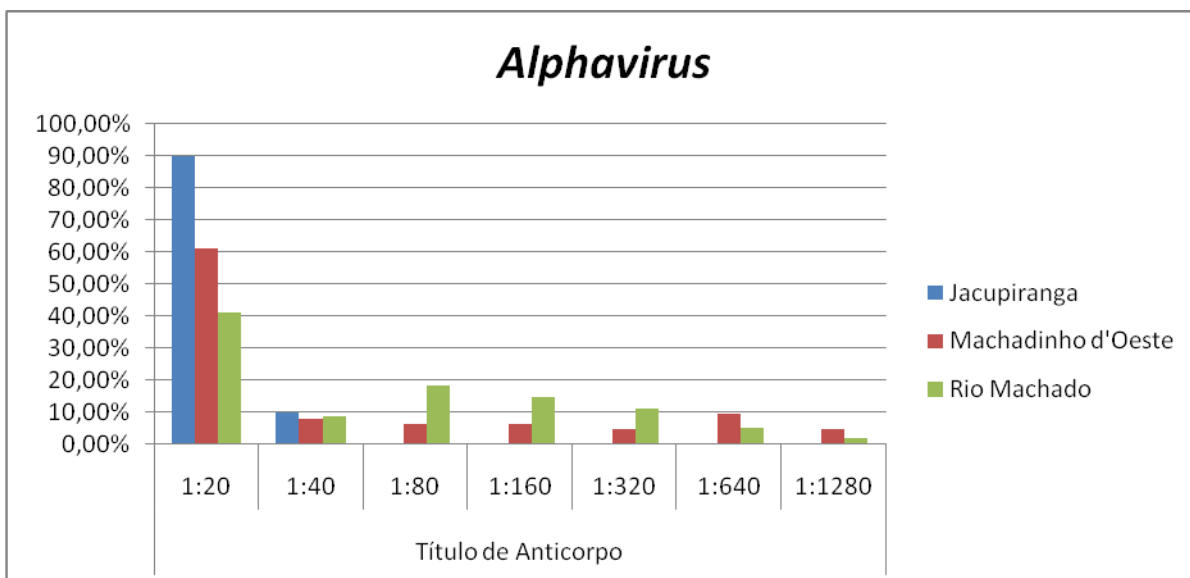


Figura 19: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *alphavirus* em cada umas das regiões estudadas

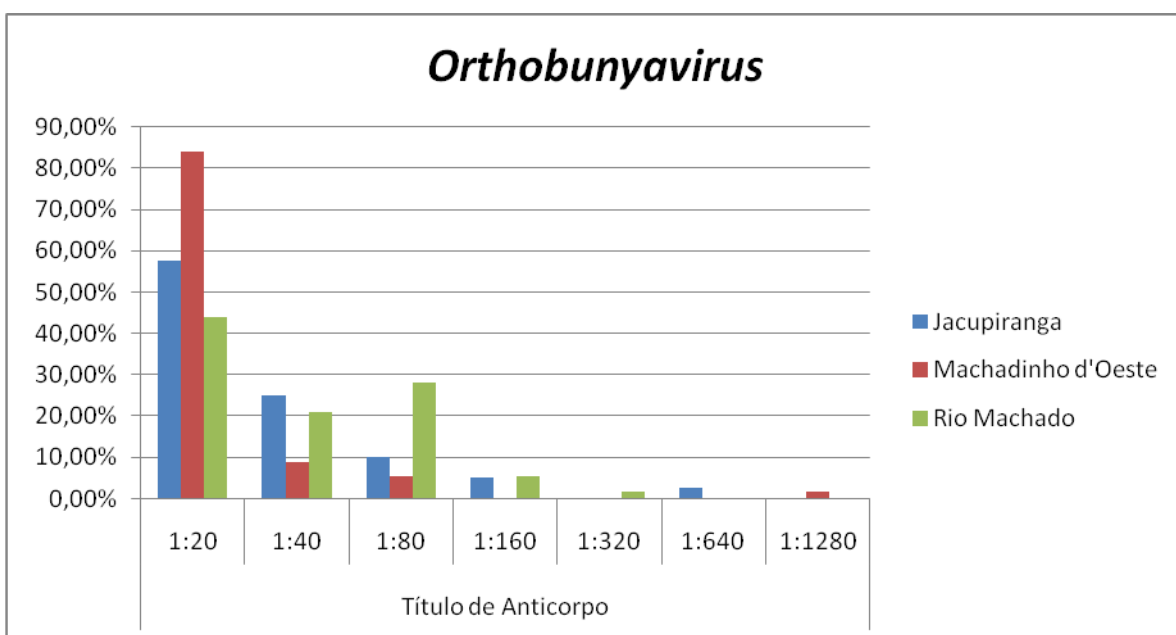


Figura 20: Porcentagem de resultados de cada um dos títulos sorológicos no teste de HI para *orthobunyavirus* em cada umas das regiões estudadas

Foram organizados os resultados do teste de HI conforme o sexo das pessoas de cada amostra (Tabela 1). Também foram organizados as amostras conforme a idade, sendo que neste trabalho a distribuição etária considerou apenas três grupos importantes: <16 (criança e jovem, que ainda não possui idade consideradamente ativa para trabalho); 16-49 (jovem adulto, pessoa em idade ativa profissionalmente); 50 e mais (idoso, pessoa com idade avançada e que começa a diminuir a quantidade de atividades fora de casa) (Tabela 2).

Tabela 1 - Resultados do teste de HI de acordo com a procedência da amostra (Teodoro Sampaio, Jacupiranga, Machadinho d' Oeste e Rio Machado) e positividade para cada um dos gêneros de Arbovírus.

Local	GV	Alpha	Flavi	Ortho	Alphavirus + Flavivirus	Flavivirus + Orthobunya	Alphavirus + Orthobunya	Alpha+ Flavi+ Ortho	Total Pos	Neg	Total de Amostras
	Sexo										
Teodoro Sampaio	H	0	24 (80%)	0	0	0	0	0	24 (80%)	6 (20%)	30 (38,5%)
	M	0	31 (64,5%)	0	0	0	0	0	31 (64,58%)	17 (35,4%)	48 (61,5%)
	T	0	55 (70,5%)	0	0	0	0	0	55 (70,5%)	23 (29,5%)	78
Jacupiranga	H	1 (1,75%)	12 (21,1%)	8 (14,0%)	2 (3,51%)	1 (1,75%)	0	2 (1,3%)	26 (45,61%)	31 (54,4%)	57 (38,3%)
	M	1 (1,09%)	29 (31,5%)	5 (5,43%)	0	3 (3,26%)	0	1 (0,7%)	39 (42,39%)	53 (57,6%)	92 (61,7%)
	T	2 (1,4%)	41 (27,5%)	13 (8,7%)	2 (1,3%)	4 (2,7%)	0	3 (2,0%)	65 (43,6%)	84 (56,4%)	149
Machadinho d' Oeste	H	0	74 (59,7%)	1 (0,81%)	17 (13,71%)	16 (12,9%)	0	11 (8,87%)	119 (95,97%)	5 (4,03%)	124 (43,5%)
	M	1 (0,62%)	108 (67,1%)	0	15 (9,32%)	24 (14,91%)	1 (0,62%)	5 (3,11%)	154 (95,65%)	7 (4,35%)	161 (56,5%)
	T	1 (0,3%)	182 (63,9%)	1 (0,3%)	32 (11,2%)	40 (14,0%)	1 (0,3%)	16 (5,6%)	273 (95,8%)	12 (4,2%)	285
Rio Machado	H	5 (2,87%)	71 (51,4%)	1 (0,57%)	36 (20,69%)	12 (6,90%)	2 (1,15%)	11 (6,32%)	138 (79,31%)	36 (20,7%)	174 (50,7%)
	M	10 (5,92%)	59 (34,9%)	3 (1,77%)	28 (16,57%)	5 (2,96%)	0	7 (4,14%)	112 (66,27%)	57 (33,7%)	169 (49,3%)
	T	15 (4,4%)	130 (37,9%)	4 (1,2%)	64 (18,7%)	17 (5,0%)	2 (0,6%)	18 (5,2%)	250 (72,9%)	93 (27,1%)	343

Abreviaturas: H (homem), M (mulher), T (total), GV (Gênero Viral), AI (Positivo apenas para o gênero *Alphavirus*), FI (Positivo apenas para o gênero *Flavivirus*), Or (Positivo apenas para o gênero *Orthobunyavirus*); AI+FI (Positivo para os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* simultaneamente); FI+Or (Positivo para os gêneros *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); AI+Or (Positivo para os gêneros *Alphavirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); AI+FI+Or (Positivo para os gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); Neg (Negativo).

Tabela 2 - Resultados do teste de HI para cada um dos gêneros de arbovírus, de acordo com a idade, distribuído nas três cidades e no Rio Machado.

Região	Idade	Alpha	Flavi	Ortho	Flavivirus + Alphavirus	Flavivirus + Ortobunya	Alphavirus + Ortobunya	Alpha+ Flav+ Ortho	Total Pos	Neg	Total
Teodoro Sampaio	<16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16-49	0	40 (70,18%)	0	0	0	0	0	40 (70,18%)	17 (29,82%)	57 (73,1%)
	50 e +	0	15 (71,43%)	0	0	0	0	0	15 (71,43%)	6 (28,57%)	21 (26,9%)
Jacupiranga	<16	0	1 (33,33%)	0	0	0	0	0	1 (33,33%)	2 (66,67%)	3 (2,0%)
	16-49	0	30 (31,25%)	10 (10,42%)	1 (1,04%)	3 (3,12%)	0	2 (2,08%)	46 (47,92%)	50 (52,08%)	96 (64,4%)
	50 e +	2 (4%)	10 (20%)	3 (6%)	1 (2%)	1 (2%)	0	1 (2%)	18 (36%)	32 (64%)	50 (33,5%)
Machadinho d'Oeste	<16	1 (1,09%)	69 (75%)	1 (1,09%)	11 (11,96%)	3 (3,26%)	0	2 (2,17%)	87 (94,56%)	5 (5,43%)	92 (32,3%)
	16-49	0	96 (63,58%)	0	16 (10,60%)	24 (15,89%)	1 (0,66%)	9 (5,96%)	146 (96,69%)	5 (3,31%)	151 (53,0%)
	50 e +	0	17 (40,48%)	0	5 (11,9%)	13 (30,95%)	0	5 (11,9%)	40 (95,24%)	2 (4,76%)	42 (14,7%)
Rio Machado	<16	5 (3,4%)	57 (38,78%)	3 (2,04%)	9 (6,12%)	4 (2,72%)	2 (1,36%)	1 (0,68%)	81 (55,1%)	66 (44,9%)	147 (42,9%)
	16-49	8 (5,33%)	56 (37,33%)	1 (0,67%)	36 (24%)	12 (8%)	0	10 (6,67%)	123 (82%)	27 (18%)	150 (43,7%)
	50 e +	2 (4,35%)	17 (36,96%)	0	19 (41,3%)	1 (2,17%)	0	7 (15,22%)	46 (100%)	0	46 (13,4%)

Abreviaturas: GV (Gênero Viral), AI (Positivo apenas para o gênero *Alphavirus*), FI (Positivo apenas para o gênero *Flavivirus*), Or (Positivo apenas para o gênero *Orthobunyavirus*); AI+FI (Positivo para os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* simultaneamente); FI+Or (Positivo para os gêneros *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); AI+Or (Positivo para os gêneros *Alphavirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); AI+FI+Or (Positivo para os gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* simultaneamente); Neg (Negativo).

Todas as amostras que foram positivas para pelo menos um dos quatro sorotipos diferentes da DENV ou para YFV ou 17D, foram submetidas ao teste de MAC-ELISA para verificar a possível infecção assintomática recente por um desses vírus. Todos os resultados dessas amostras apresentaram densidade óptica abaixo do limite considerado positivo, sendo assim todas foram negativas na detecção de anticorpos IgM.

6 DISCUSSÃO

O teste de HI é considerado por alguns autores como um dos testes mais recomendados para a sorologia básica dos arbovírus, sendo ideal para estudos sorológicos, uma vez que os anticorpos HI persistem por um longo período de tempo. Porém estes mesmo autores também recomendam que ele não seja o único método de teste sorológico a ser feito para chegar a uma conclusão diagnóstica, e que deve sim ser feito juntamente outras técnicas sorológicas mais específicas, como por exemplo o teste de neutralização, fixação do complemento ou ELISA, para poder obter um resultado mais confiável e correto (3,46,2,47). Um dos principais problemas enfrentados por quem utiliza o teste de IH para um trabalho sorológico é que, por ser um teste sensível e detectar anticorpos de memória que circulam no sangue mesmo depois de um contato antigo com o antígeno, ele pode positivar frente a vírus diferentes do verdadeiro que a pessoa entrou em contato, desde que o soro testado possua anticorpos sensíveis a proteínas que sejam comum a todos esses vírus.

A população do interior norte de Rondônia, por morar em área de floresta amazônica, entra em contato frequente com diversas arboviroses e, quando moram em ambiente que não é protegido contra vetores ou trabalham em meio à mata, corre grande risco de entrarem em contato com os arbovírus diariamente, tendo assim seu sistema imune desafiado frequentemente. Isto explica a diversidade de arboviroses os quais as amostras provenientes de Machadinho d'Oeste e dos ribeirinhos do Rio Machado foram positivos e, além disto, a quantidade de amostras com título alto de anticorpos (1:320, 1:640 e 1:1280) que eles apresentaram foram estatisticamente superiores a quantidade apresentada em Teodoro Sampaio e Jacupiranga, indicando assim uma diferença já esperada entre essas duas populações, devido a região sudeste apresentar uma menor ocorrência de arboviroses em comparação com a região norte do Brasil. Outra indicativa do contato frequente dos residentes de Rondônia é que, mesmo com várias amostras apresentando título alto no teste de HI, todas as amostras foram negativas para detecção de anticorpos IgM no teste de MAC-ELISA.

Vale ressaltar que a maioria das amostras foram positivas para mais de um arbovírus, o que reflete o alto número de resultados positivos. Outro detalhe é que devido ao cruzamento natural que ocorre entre respostas sorológicas contra arbovírus do mesmo grupo sorológico dificulta a afirmação a respeito do real contato do indivíduo com o arbovírus ao qual ele foi positivo.

Quando olhamos os resultados de maneira geral, observamos uma quantidade bem maior de positividade para arbovírus do gênero *flavivirus* do que os outros dois gêneros testados, e esta diferença foi observada em todas as quatro áreas estudadas, sugerindo assim que os arbovírus do gênero *flavivirus* possuem uma circulação maior que a dos outros dois gêneros nos locais estudados. Esta prevalência maior dos *flavivirus* já é observada no Brasil por outros autores (2,10,15,16), o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Todas as amostras de Teodoro Sampaio foram negativas para os arbovírus testados do gênero *alphavirus* e *orthobunyavirus* (figura 12), sugerindo assim a não circulação de vírus desse gênero na cidade. Apesar de Teodoro Sampaio localizar-se em uma área de transição entre zona endêmica e não endêmica de YF, portanto, zona de transição de ocorrência de arbovirose, não foram encontrados na literatura consultada trabalhos de isolamento de *alphavirus* e *orthobunyavirus* nesta região.

De maneira geral, não houve diferença significativa dos resultados positivos entre homens e mulheres, sendo que a maior diferença ocorreu em Teodoro Sampaio, apresentando proporcionalmente maior positividade em homens. Porém este dado não mostra a realidade, pois a maior parte das amostras foram de mulheres.

Quando observamos os positivos de acordo com a idade, observamos que em Teodoro Sampaio, Jacupiranga e Machadinho d'Oeste os resultados foram proporcionalmente semelhante entre as idades, apenas nos ribeirinhos do Rio Machado é que a quantidade de positivos aumentou de acordo com a idade, o que indica que, devido a localização da moradia e tendo casas que facilmente os vetores conseguem entrar, mesmo os idosos que se locomovem menos que as pessoas de menos idade, acabam entrando em contato com o vírus em sua própria residência.

O teste de HI, por ser sensível, apresenta um maior risco de apresentar resultados falso-positivos. Porém esta sensibilidade diminui bastante a probabilidade

de ocorrência de resultados falso-negativo, e com isso podemos ter mais segurança na não circulação em humanos de alguns arbovírus em certas regiões do país, e isto é muito importante principalmente em zonas de transição entre área endêmica e área não endêmica de alguns arbovírus como é o caso de Teodoro Sampaio, que fica em uma área de transição para YF, e não possui casos confirmados de arboviroses dos gêneros *alphavirus* e *orthobunyavirus*.

Esta preocupação quanto ao aumento da área de ocorrência de arboviroses se baseia não somente devido aos fatores humanos, os quais já são bem conhecidos como por exemplo a facilidade de deslocamento de grande quantidade de pessoas em curto tempo para lugares distantes onde circulem diversas arboviroses, a entrada de trabalhadores em mata fechada, o grande aumento populacional mundial, etc. (39,40,41). Esta preocupação se baseia também por fatores ambientais e ecológicos, como por exemplo o aquecimento global, o desmatamento e as queimadas de florestas, o processo de urbanização de áreas de mata e o crescimento de pequenas cidades no interior dos estados do país. Alguns autores fazem análises quanto a influencia de fatores ambientais e ecológicos no aumento da área de ocorrência das doenças e muitos observam que os patógenos transmitidos por vetores como artrópodes em geral, que é o caso das arboviroses e da malária, por exemplo, são beneficiados e tendem a aumentar sua região de endemismo devido principalmente a proliferação dos seus vetores em novos locais que antes eram inadequados à sua sobrevivência (42,43,44,45,46,47).

É importante fazer este tipo de trabalho, principalmente em regiões de transição entre área endêmica e não endêmica de arboviroses, pois normalmente o sistema de saúde dá atenção somente para arbovírus que ocorrem com maior frequência como Dengue e Febre Amarela. Mas com uma vigilância simples com o teste de HI em uma região de transição podemos detectar precocemente a introdução de um arbovírus que normalmente não circula nas regiões, auxiliando assim na montagem do mapa epidemiológico do país, e corroborando para uma melhor ação do governo em medidas preventivas de doenças.

7 CONCLUSÃO

1. O teste de HI apresentou-se satisfatório para uma investigação sorológica para arboviroses em uma população utilizando amostras com pouca quantidade de soro para teste.
2. Foi observado sorologicamente que em todas as regiões estudadas as pessoas entram mais em contato com vírus do gênero *flavivirus* do que com arbovírus de outros gêneros, dentre os vírus que foram testados.
3. Na amostragem testada de moradores de Teodoro Sampaio observamos sorologicamente que as pessoas não entraram em contato com nenhum arbovírus do gênero *alphavirus* e *orthobunyavirus*, sugerindo a não circulação desses vírus na região.
4. As amostras provenientes de Machadinho d'Oeste e dos "ribeirinhos" do Rio Machado apresentaram uma quantidade maior de resultados no teste de HI com títulos altos em relação com os resultados das amostras de Teodoro Sampaio e Jacupiranga, sugerindo que nestas localidades em Rondônia as pessoas entram em contato mais frequente com esse arbovírus em relação as cidades estudadas em São Paulo.
5. Os resultados negativo em todos os testes de MAC-ELISA indicam que nenhuma das pessoas que participaram do trabalho apresentavam resposta sorológica primária recente.
6. A grande quantidade de amostras de Rondônia com título de anticorpos alto no teste de HI, em pessoas sem sinais ou sintomas de arboviroses, sugere resposta imune secundária, sendo possível que este alto título de anticorpos se mantenha nesta população devido ao frequente desafio desse arbovírus.
7. Nas amostras testadas no HI neste trabalho os homens foram apresentaram mais respostas positivas que as mulheres nos ribeirinhos do Rio Machado. Já

nas outras regiões as mulheres apresentaram mais respostas positivas que os homens.

REFERÊNCIAS*

- 1 WHO. Viral Haemorrhagic Fever. **Technical Report**, Geneva, n. 126, 1985.
- 2 VASCONCELOS, P. F. C. et al. Arboviruses Pathogenic for Man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. cap. 2, p. 72-99.
- 3 TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q., et al. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup, 1997. cap. 13, p. 207-225.
- 4 CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and Taxonomic Relationships between arboviruses of Florida, U.S.A., and Brasil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. cap. 1, p. 32-41.
5. BAQAR, S. et al. Vertical Transmission of West Nile Virus by Culex and Aedes Species Mosquitoes. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, p. 757-762, jun. 1993.
- 6 TESH, R. B.; BEATY, B. J.; AITKEN, T. H. G. Transovarial Transmission of Yellow Fever Virus in Stegomyia Mosquitoes. **The American Journal of tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 29 Janeiro 1980. 125-132.
- 7 HARDY, J. L. et al. Experimental Transovarial Transmission of St. Louis Encephalitis Virus by Culex and Aedes Mosquitoes. **The American Journal of tropical Medicine and Hygiene**, Standfor, p. 166-175, jan. 1984.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 8 KHIN, M. M.; THAN, K. A. Transovarial Transmission of Dengue 2 Virus by *Aedes Aegypti* in Nature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, p. 590-594, mar. 1983.
- 9 THOMPSON, W. H.; BEATY, B. J. Venereal Transmission of La Crosse (California Encephalitis) Arbovirus in *Aedes Triseriatus* Mosquitoes. **Science**, p. 530-531, abr. 1977.
- 10 TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. et al. Arboviruses Isolated in the Evandro Chagas Institute, Including some Described for the first time in the Brazilian Amazon Region, Their Known Hosts, and Their Pathology for man. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. cap. 1, p. 18-31.
- 11 TAKASAKI, T. et al. Arbovirus Infections: the Challenges of Controlling a Ever Present Enemy. **Journal of Disaster Research**, p. 322-323, maio 2009.
- 12 BARCELLOS, C. et al. Mudanças Climáticas e Ambientais e as Doenças Infecciosas: Cenário de Incertezas para o Brasil. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, Brasília, p. 285-304, jul. 2009..
- 13 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Arbovirus transmission cycle. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/schemat.htm>>. Acesso em: 1 set. 2010.
- 14 COZ, J. et al. Transovarian Transmission of a Flavivirus, the Koutango Virus, in *Aedes Aegypti*. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D**, França, v. 1, n. 283, p. 109-110, Jul 1976.
- 15 HAYLES, L. B.; LVERSEN, J. O. Cache Valley Virus: Experimental Infection in *Culiseta Inornata*. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 3, n. 26, p.

287-290, 1980.

- 16 GONZALEZ, J. P. et al. Sexual and Transovarian Transmission of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in Hyalomma Truncatum Ticks. **Research in Virology**, France, n. 143, p. 23-28, 1992.
- 17 KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses including Certain Other Viruses of Vertebrates. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, San Antonio, n. 3, p. 1141, 1985.
- 18 CASALS, J. Viruses: The Versatile Parasites; the Arthropod-Borne Group of Animal Viruses. **Transactions New York Academic Science**, New York, v. 19, p. 219-235, 1957.
- 19 CAUSEY, O. R. et al. The Isolation of Arthropod-born Viruses Including Members of two Hitherto Undescribed Serological Groups, in Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 10, p. 227, 1961.
- 20 PINHEIRO, F. P. et al. Arboviroses: Aspectos Clínicos-epidemiológicos. In: _____. **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação SESP, 1986. p. 375-408.
- 21 PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Arboviral Zoonoses of Central and South America. In: _____. **Handbook of Zoonoses**. (S.I.): CRC press, 1994. p. 214-217.
- 22 PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ateneu, 1996. p. 169-180.
- 23 LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N. **Virology**. 4 edição. ed. New York: Lippincott Williams &

- Wilkins, v. 2, 2001. cap. 32, p. 810-851.
- 24 TUBOI, S. H. et al. Clinical and Epidemiological Characteristics of Yellow Fever in Brazil: analysis of reported cases 1998. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, n. 101, p. 169-175, 2007.
- 25 SHI, P. Y. et al. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. **Biochemistry**, v. 35, p. 42220-4230, 1996.
- 26 BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: FIELDS, N. **Virology**. 2. ed. New York: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 33, p. 852-921.
- 27 RICE, C.; STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. Structure of the flavivirus genome. **The Togaviridae and Flaviviridae**, New York, 1986. 279-327.
- 28 ANTUNANO, F. J. L.; MOTA, J. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 7, n. 5, p. 285-292, 2000.
- 29 FRANCKI, R. I. B. et al. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy Viruses. **Archives of Virology Supplementum 2**, New York, 1991. p. 450.
- 30 BRONZONI, R. V. M. et al. Multiplex nested PCR for brazilian alphavirus diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 98, n. 8, p. 456-461, 2004.
- 31 MURRAY, P. R. et al. In: _____. **Microbiologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 762.
- 32 STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. **Microbiol. Rev.**, p. 491-562, 1994.

- 33 TOMAR, S. et al. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsp4 possesses terminal adenylyltransferase activity. **J. Virol.**, v. v. 80, n. 20, p. p. 9962-9969, 2006.
- 34 FIGUEIREDO, L. T. M. Vírus brasileiros da família bunyaviridae. **Simpósio de virologia médica**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 154-158, 1999.
- 35 SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: The viruses and their replication. In: _____. **Virology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 48, p. 1293-1309.
- 36 NUNES, M. R. T. et al. Molecular epidemiology of group C viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolated in the Americas. **J. Virol.**, v. 79, n. 16, p. 10561-10570, 2005.
- 37 SISTEMA DE INFORMAÇÕES TERRITORIAIS. Dados geográficos. Disponível em: <http://sit.mda.gov.br/images/mapas/tc/uf_011_tcs_rondonia_jan_2009.jpg>. Acesso em: 8 jul. 2010.
- 38 GOOGLE EARTH. Mapa Disponível em: <<http://earth.google.com/intl/pt/>>. Acesso em: 25 mar. 2010.
- 39 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Mapa do Vale do Jamari. Disponível em: <http://sit.mda.gov.br/images/mapas/tc/tr_098_vale_do_jamari_ro_abr_2009.jpg>. Acesso em: 1 set. 2010.
- 40 WIKIPÉDIA. Ficheiro: São Paulo Municip Jacupiranga. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SaoPaulo_Municip_Jacupiranga.svg>. Acesso em: 1 set. 2010.

- 41 WIKIPÉDIA. Mapa. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:SaoPaulo_Municip_TeodoroSampaio.svg>.
Acesso em: 2 set. 2010.
- 42 HINKE, T. Z. **Perfil nosológico da população ribeirinha do baixo Rio Machado em Rondônia/Amazônia Ocidental-Brasil**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 55.
- 43 PREFEITURA MUNICIPAL DE D'OESTE. População. Disponível em:
<<http://www.portalpublico.com.br/pmmachadinhodoeste/index.php?exibir=secoes&ID=39>>. Acesso em: 02 set. 2010.
- 44 PREFEITURA MUNICIPAL DE JACUPIRANGA. População. Disponível em:
<<http://www.jacupiranga.sp.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 05 set. 2010.
- 45 SHOPE, R. E. The use of a Microhemagglutination-inhibition Test to Follow Antibody Response After Arthropod-borne Virus Infection in a Community of Forest Animals. **An Microbiol**, Rio de Janeiro, p. 167-171, nov. 1963.
- 46 KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. J. Detecting artificial antidengue IgM Immuno Complexes using an Enzymelinked immunosorbent Assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, San Francisco, p. 153-159, 1987.
- 47 TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. **Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo**. 2. ed. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998.
- 48 GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, p. 330-342, feb. 2002.
- 49 NUNES, M. R. T. et al. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influencia da rodovia Couiabá-Santarem (BR 163), Estado do Pará, Brasil. **Cad. Saúde**

- Pública**, Rio de Janeiro, p. 2583-2602, dez 2009.
- 50 TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p. 99-102, 2001.
- 51 BARCELLOS, C. et al. Climatic and environmental changes and their effect on infectious diseases: scenarios and uncertainties for Brazil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 18, p. 285-304, set. 2009.
- 52 CORDELLIER, R.; DEGALLIER, N. Environment, Arbovirus transmission and control of epidemics. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 249-253, set. 1992.
- 53 GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Royal Society of Tropical Medicine and hygiene**, v. 103, p. 109-121, 2009.
- 54 GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, p. 13-24, 2001.
- 55 LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-9, may 2010.
- 56 VASCONCELOS, P. F. C. et al. Gestão imprópria do ecossistema natural na Amazônia brasileira resulta na emergência e reemergência de arbovírus. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p. 155-164, 2001.

ANEXO A - Número de amostras (N) em cada ponto de coleta e os pontos de GPS

Região	Ponto	N	GPS
Rio Machado	1	94	S8-55-57 W62-03-19,9
	2	2	S8-53-39,9W62-10-50,0
	3	2	S8-52-46,9W62-11-24,4
	4	1	S8-52-41,8W62-11-28,3
	5	3	S8-50-00,9W62-12-27,7
	6	13	S8-44-05,4W62-15-05,8
	7	4	S8-43-21,1W62-15-26,9
	8	5	S8-42-07,3W62-16-10,7
	9	6	S8-42-23,2W62-18-31,5
	10	1	S8-42-35,1W62-20-14,0
	11	4	S8-41-54,2W62-20-45,2
	12	13	S8-40-20,8W62-22-12,9
	13	19	S8-40-17,2W62-22-03,7
	14	8	S8-39-04,8W62-22-43,6
	15	6	S8-38-49,9W62-23-30,6
	16	5	S8-34-51,7W62-25-57,7
	17	6	S8-32-43,7W62-27-51,2
	18	1	S8-27-54,7W62-34-23,8
	19	4	S8-24-57,9W62-37-34,2
	20	2	S8-20-21,3W62-41-42,0
	21	3	S8-20-06,0W62-42-09,5
	22	3	S8-20-16,9W62-42-40,0
	23	5	S8-19-24,5W62-44-06,6
	24	3	S8-17-31,5W62-43-34,9
	25	3	S8-17-22,4W62-43-37,1
	26	2	S8-17-04,6W62-43-44,2
	27	9	S8-16-49,7W62-43-56,5
	28	5	S8-16-42,2W62-44-08,1
	29	4	S8-16-47,7W62-45-32,0
	30	8	S8-16-59,9W62-45-42,1
	31	6	S8-14-53,9W62-46-13,2
	32	1	S8-15-20,3W62-46-16,4
	33	92	S8-10-15,1W62-46-50,6
Jacupiranga	34	8	24o54 30S/048o08 01W
	35	28	24o54 35S/048o07 37W
	36	29	24o52 64S/048o06 96W
	37	32	24o52 48S/048o05 74W
	38	4	
	39	15	24o53 65S/048o05 93W
	40	33	24o56 57S/048o02 80W
Teodoro Sampaio	41	35	22o22 70S/052o25 66W
	42	23	22o30 18S/052o27 85W
	43	14	22o29 19S/052o29 75W
	44	6	24o54 32S/048o07 98W
Machadinho d'Oeste	45	285	S8-52-53 W65-03-19,9

ANEXO B - Resultado das amostras testada pelo HI. O local, idade e sexo do indivíduo e ponto de GPS da coleta

(Continua)

N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
1	Machadinho d'Oeste	20	20			20		40	40	20			40							7	M	45
2	Machadinho d'Oeste		20					40	40	40			40	80		80				64	M	45
3	Machadinho d'Oeste					20		40	20	40			80	80		160				12	F	45
4	Machadinho d'Oeste		20						40	40			80	80		160				10	F	45
5	Machadinho d'Oeste					20		40	640	20		20	40							62	F	45
6	Machadinho d'Oeste	20			20	20		160	1240	20		40	160	160		640				34	M	45
7	Machadinho d'Oeste								640	20				160		160				57	M	45
8	Machadinho d'Oeste								640	40			160	80	40	320				34	F	45
9	Machadinho d'Oeste			160						20					20					35	F	45
10	Machadinho d'Oeste								640					80		160				24	F	45
11	Machadinho d'Oeste							320	640	160		80	160	40	80	80		20		24	F	45
12	Machadinho d'Oeste								640	40				80		40				5	M	45
13	Machadinho d'Oeste								20	40			80	40		40				9	M	45
14	Machadinho d'Oeste								20	40								20		48	F	45
15	Machadinho d'Oeste												80	80		40				10	M	45
16	Machadinho d'Oeste									40										13	M	45
17	Machadinho d'Oeste		20										80	160	20	40				36	F	45
18	Machadinho d'Oeste							160	40	160		640	80	40	40	40				60	F	45
19	Machadinho d'Oeste							320	40	160		640	160	160	80	80				62	F	45
20	Machadinho d'Oeste								20					40		40				55	F	45
21	Machadinho d'Oeste							1280	640	1280		640	640	320	640	640				32	F	45
22	Machadinho d'Oeste								20	80			80	80	40	80				18	M	45
23	Machadinho d'Oeste								20	40						80		20		44	M	45
24	Machadinho d'Oeste							320	80				160	80	40	80				18	M	45
25	Machadinho d'Oeste								20				80	80		80				40	F	45
26	Machadinho d'Oeste								20	40						80				17	F	45
27	Machadinho d'Oeste								20	40				160	80		320			15	F	45
28	Machadinho d'Oeste												40	80		320		20		38	F	45
29	Machadinho d'Oeste																			18	F	45
30	Machadinho d'Oeste									20								20		48	M	45
31	Machadinho d'Oeste								40			160	160	320						36	F	45
32	Machadinho d'Oeste			160					40	40			40	80						48	M	45
33	Machadinho d'Oeste								40	40	20					40				8	F	45

34	Machadinho d'Oeste								80	40			40	160		80				51	M	45
35	Machadinho d'Oeste																			12	F	45
36	Machadinho d'Oeste								40					160		80				37	F	45
37	Machadinho d'Oeste			160					40	40						40				15	M	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
38	Machadinho d'Oeste								40	40	20		80	160		160				72	M	45
39	Machadinho d'Oeste							80	40	80	20		80	160	40	80				24	M	45
40	Machadinho d'Oeste							80	40	40	40		80	160	40	80				43	M	45
41	Machadinho d'Oeste								40	20	40		40	80	20	80		20		8	M	45
42	Machadinho d'Oeste								40		20									7	F	45
43	Machadinho d'Oeste								40		20			40						32	M	45
44	Machadinho d'Oeste								40		20									17	F	45
45	Machadinho d'Oeste								40	20	20			40						12	M	45
46	Machadinho d'Oeste								80	40			80	160	20	80	20			33	F	45
47	Machadinho d'Oeste								40	40			40	40		40		20		64	F	45
48	Machadinho d'Oeste								40	40	20				40			20		22	F	45
49	Machadinho d'Oeste								40	20	20									81	F	45
50	Machadinho d'Oeste								40	20			80	80		40				60	M	45
51	Machadinho d'Oeste								80				80	80	20			20		55	M	45
52	Machadinho d'Oeste								40	40	20		80	160	40	80				7	F	45
53	Machadinho d'Oeste													40		40		20		31	F	45
54	Machadinho d'Oeste								40	80			40	160	40	80		20		52	F	45
55	Machadinho d'Oeste								40	40	40					40				61	F	45
56	Machadinho d'Oeste								40	40	20							20		63	M	45
57	Machadinho d'Oeste								40	40	20									44	F	45
58	Machadinho d'Oeste							40	40	40	40	40	80	160	20	40				8	F	45
59	Machadinho d'Oeste							40	40	40	40	40	40	160		80				12	M	45
60	Machadinho d'Oeste					20			80	40	40	20	80	160	20	80		20		23	M	45
61	Machadinho d'Oeste					20		320	1280	1280	640	320	320	1280	640					27	M	45
62	Machadinho d'Oeste					20		40	160	40	40	40	80	160	40	160				70	F	45
63	Machadinho d'Oeste					20		80	320	40	40	20	80	160	80	80				46	F	45
64	Machadinho d'Oeste				20	20		20	80	20	20	20								72	M	45
65	Machadinho d'Oeste								320	40	40		80	160	40	80	20			69	M	45
66	Machadinho d'Oeste							80	640	40	40		80	160	40	80				11	M	45
67	Machadinho d'Oeste								640	40	40		80	160	80	80				19	F	45
68	Machadinho d'Oeste							160	1280	80	80	80	80	160	320	320				12	M	45
69	Machadinho d'Oeste			640					80	40	20	40	40	40		80		80		13	F	45
70	Machadinho d'Oeste								160	40	20		80	160	80	80		40		70	F	45
71	Machadinho d'Oeste								160	40	20		80	80	80		20			50	M	45

72	Machadinho d'Oeste								160	80	40		160	160	160	80				31	F	45	
73	Machadinho d'Oeste			80					80	160	80	40		80	160	40	160		20		60	F	45
74	Machadinho d'Oeste								640	20	20						20	20		45	M	45	
75	Machadinho d'Oeste								80	80	40			80	160	40	160		40		52	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS	
76	Machadinho d'Oeste											20				20				38	F	45	
77	Machadinho d'Oeste			20														20		44	F	45	
78	Machadinho d'Oeste								80	40	20	20	80	40	40	40	160			20	F	45	
79	Machadinho d'Oeste		20	640					20	40			20		40	20		20		34	M	45	
80	Machadinho d'Oeste								20	20	40	20	20		20	20	160			32	F	45	
81	Machadinho d'Oeste		20												80	40	80		20	29	F	45	
82	Machadinho d'Oeste														20	20	40			5	F	45	
83	Machadinho d'Oeste		20						40	20	160	20	20	40	40	20	40		20	38	M	45	
84	Machadinho d'Oeste		20									20	20		20	20				12	M	45	
85	Machadinho d'Oeste		20						20	20	20	20	20	40	20	20	40			14	F	45	
86	Machadinho d'Oeste									20	20				20	20				16	F	45	
87	Machadinho d'Oeste		20						20	20	40	20	20	80	40	20	40			39	M	45	
88	Machadinho d'Oeste		40							20			20	20	20	20	40			15	M	45	
89	Machadinho d'Oeste								40	20				20						15	F	45	
90	Machadinho d'Oeste												20	20	20	20	40			14	M	45	
91	Machadinho d'Oeste																			54	F	45	
92	Machadinho d'Oeste														160	20	40			44	F	45	
93	Machadinho d'Oeste																			39	M	45	
94	Machadinho d'Oeste								40	20	20	20	20			160				64	F	45	
95	Machadinho d'Oeste		40	1280												20	40			39	M	45	
96	Machadinho d'Oeste											20								25	F	45	
97	Machadinho d'Oeste		20						20	40	40	20	20	20	40	20	80		20	45	M	45	
98	Machadinho d'Oeste		20		40				40	40	40	20	20	40	20	20	40			44	M	45	
99	Machadinho d'Oeste								20	20				20	40	20	20	40		14	F	45	
100	Machadinho d'Oeste												20		40	20	20	40		8	F	45	
101	Machadinho d'Oeste			20					40	40	80	20	20	40	80	20	40		20	33	F	45	
102	Machadinho d'Oeste			20					20	20				20	20		20			6	M	45	
103	Machadinho d'Oeste								320	320	640	640	160	640	320	1280	320			25	M	45	
104	Machadinho d'Oeste		20						80	80				20	40		20			26	F	45	
105	Machadinho d'Oeste		20	80						20	40		20	20	40					32	M	45	
106	Machadinho d'Oeste		20							20	20	20		20	20	20	20			25	M	45	
107	Machadinho d'Oeste		20																	15	F	45	
108	Machadinho d'Oeste								20	40	20	20	20	20	20	20	40			17	F	45	
109	Machadinho d'Oeste		20							20	20	20	20	20	20	20				6	M	45	

110	Machadinho d'Oeste		20							20					20					33	F	45
111	Machadinho d'Oeste							20	20	20		20	20		20		20			25	F	45
112	Machadinho d'Oeste							20	20			20	20	20						10	F	45
113	Machadinho d'Oeste							20	20							20				5	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
114	Machadinho d'Oeste							40	40							40				30	F	45
115	Machadinho d'Oeste	20	40		160			40	20	40										13	F	45
116	Machadinho d'Oeste							160	160	80	20	80	40		40	40				33	F	45
117	Machadinho d'Oeste							40	40	40					80	80				47	F	45
118	Machadinho d'Oeste							40	40	40			40	40	40					9	F	45
119	Machadinho d'Oeste							20	40	40	20									30	F	45
120	Machadinho d'Oeste												40	40		40				18	F	45
121	Machadinho d'Oeste							160	160	320	160	160	80	80	320	160				13	M	45
122	Machadinho d'Oeste								40	80	40		40	40	320	80				45	F	45
123	Machadinho d'Oeste								20					40		40				11	F	45
124	Machadinho d'Oeste															20				10	F	45
125	Machadinho d'Oeste				40								40		40	40				19	M	45
126	Machadinho d'Oeste							320	80	1280	80	160	80	160	160	160				33	M	45
127	Machadinho d'Oeste							80	40	40	40	20	40	40	80	40				7	F	45
128	Machadinho d'Oeste									20	20	20	40	40	40	40				19	M	45
129	Machadinho d'Oeste									20	20					20				12	F	45
130	Machadinho d'Oeste							80	160					20						21	M	45
131	Machadinho d'Oeste								40	80	40	40	40	40	40	40				14	F	45
132	Machadinho d'Oeste										40		20			40				6	M	45
133	Machadinho d'Oeste									80			40	40		40				10	F	45
134	Machadinho d'Oeste							160	80	160	40	80	40	40	40	40		20		30	F	45
135	Machadinho d'Oeste							160	160	160	40	40	20	40	160	80				12	F	45
136	Machadinho d'Oeste							160	160	160	40	160	20	40	40	80				32	F	45
137	Machadinho d'Oeste							160	160				40	40	40	40				36	F	45
138	Machadinho d'Oeste							320	160	640	160	20	160	160	320	320		40		47	M	45
139	Machadinho d'Oeste												20		20					9	F	45
140	Machadinho d'Oeste							160	20	80			20	40		20		20		33	F	45
141	Machadinho d'Oeste												40	40						21	F	45
142	Machadinho d'Oeste							80	320	20	40	40	40	40	80	40				14	F	45
143	Machadinho d'Oeste																			24	F	45
144	Machadinho d'Oeste							160	80	160	40	80	40	80	20	40				21	M	45
145	Machadinho d'Oeste							80	40		40		40	20		20				15	M	45
146	Machadinho d'Oeste								40	80	20		20	20		20				10	F	45
147	Machadinho d'Oeste							80	80	160	40	320	20	80	40	80				12	F	45

148	Machadinho d'Oeste							40	40	40	40			40						7	M	45
149	Machadinho d'Oeste								80		40				80					24	F	45
150	Machadinho d'Oeste							160	40	160	80	40	80		80	80				25	F	45
151	Machadinho d'Oeste								40	80	40									20	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
152	Machadinho d'Oeste		20						20		20		20	20						17	F	45
153	Machadinho d'Oeste								20		20		20	20		20				35	M	45
154	Machadinho d'Oeste		20						20	20	20		20			40				6	M	45
155	Machadinho d'Oeste												20	40		40				16	F	45
156	Machadinho d'Oeste		20	320					320	160	640	160	320	160	160	320	160			27	M	45
157	Machadinho d'Oeste								320	40	320	160	160	80	160	80	80		80	40	F	45
158	Machadinho d'Oeste		20						40		20		20	40	20	20				23	F	45
159	Machadinho d'Oeste								20		20		20	40	20	20				23	F	45
160	Machadinho d'Oeste								20		20		20	40	20	20				51	F	45
161	Machadinho d'Oeste		20							20	20		20	40	20	40				7	F	45
162	Machadinho d'Oeste								80	20	320	80		40	40	40	80			78	F	45
163	Machadinho d'Oeste												40	40		80				5	M	45
164	Machadinho d'Oeste								20	40	40	40		20		40				31	M	45
165	Machadinho d'Oeste			320					160	80	160	160	160	80	40	80	160			8	M	45
166	Machadinho d'Oeste			1280					20	20						20				28	M	45
167	Machadinho d'Oeste								20	20						20				6	F	45
168	Machadinho d'Oeste								20	20										45	F	45
169	Machadinho d'Oeste								20	20		20	20			20	20			10	F	45
170	Machadinho d'Oeste								20	20		20	20	20	20	20	20			28	F	45
171	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20	20			18	F	45
172	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20	20			10	M	45
173	Machadinho d'Oeste								20	20		20	20	20	20	20	20			19	M	45
174	Machadinho d'Oeste																			14	F	45
175	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20		20		16	M	45
176	Machadinho d'Oeste								20	40	20	20	20	20	20	20				14	F	45
177	Machadinho d'Oeste									20		20			20	20				9	M	45
178	Machadinho d'Oeste											20		20		20				10	M	45
179	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20				7	M	45
180	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20				7	M	45
181	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20				12	M	45
182	Machadinho d'Oeste								160	80	80	40	80	20	20	20	40		20	31	F	45
183	Machadinho d'Oeste								20	20	20		20							30	M	45
184	Machadinho d'Oeste									20		20			20					12	F	45
185	Machadinho d'Oeste								1280	640	1280	1280	1280	640	320	1280	1280			27	M	45

186	Machadinho d'Oeste							160	80	40	80	20	20	20	80	20				16	F	45
187	Machadinho d'Oeste							20	20					20	20	20				36	M	45
188	Machadinho d'Oeste													20	20	20				18	M	45
189	Machadinho d'Oeste										20				20	20				39	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
190	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20			20	20				19	M	45
191	Machadinho d'Oeste							20	20	20	20	20		20	20	20				33	F	45
192	Machadinho d'Oeste								20		20	20					20			7	M	45
193	Machadinho d'Oeste							20	20		20			20						15	F	45
194	Machadinho d'Oeste							40	40	80	80	20	20	20	80	80				23	F	45
195	Machadinho d'Oeste								20	20					20	20				10	F	45
196	Machadinho d'Oeste							80	80	40	80	160	80	20	80	40				47	F	45
197	Machadinho d'Oeste							20	40	20	40	20	20		20	20				15	M	45
198	Machadinho d'Oeste								20		20				20			20		53	M	45
199	Machadinho d'Oeste							40	40	20	20	20			20	20				20	M	45
200	Machadinho d'Oeste								20		20		20	20	20	20				11	F	45
201	Machadinho d'Oeste							20	20	20	20	20	20	20	20	20				8	F	45
202	Machadinho d'Oeste								20		20				20	20				5	M	45
203	Machadinho d'Oeste							20	40	160	160	80	20	20	20	80				38	M	45
204	Machadinho d'Oeste							20	20		20				20	20				14	M	45
205	Machadinho d'Oeste										20					20				21	F	45
206	Machadinho d'Oeste							20	20		20				20	20				19	M	45
207	Machadinho d'Oeste							20	20		20									7	M	45
208	Machadinho d'Oeste								20		20				20	20				11	M	45
209	Machadinho d'Oeste							20	20	20	20		20	20	20	20				17	M	45
210	Machadinho d'Oeste							20	20		20	20	20	20	20	20				24	F	45
211	Machadinho d'Oeste								20		20	20								8	M	45
212	Machadinho d'Oeste							320	160	320	320	1280	320	160	160	640	20	40		49	M	45
213	Machadinho d'Oeste							20	20	20					20	20				14	M	45
214	Machadinho d'Oeste							20	20		20					20				40	F	45
215	Machadinho d'Oeste								20	20	20			20	20	20				9	F	45
216	Machadinho d'Oeste							20	20	20	20	20	20	20	20	20				21	F	45
217	Machadinho d'Oeste							20	20	20										16	F	45
218	Machadinho d'Oeste							80									20			52	M	45
219	Machadinho d'Oeste																			56	M	45
220	Machadinho d'Oeste	20	20		320				20	160	80	160	20	40	80	160		20		33	M	45
221	Machadinho d'Oeste							160	160	160	320	160	80	40	160	320				42	F	45
222	Machadinho d'Oeste			640					20		80									76	M	45
223	Machadinho d'Oeste								20	20	160		20		80	160		80		29	F	45

224	Machadinho d'Oeste																				11	M	45
225	Machadinho d'Oeste			640				20		20			20	20							22	M	45
226	Machadinho d'Oeste									20					20						14	M	45
227	Machadinho d'Oeste							20	40	40	20	20	20	20							44	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS	
228	Machadinho d'Oeste								20		20										25	F	45
229	Machadinho d'Oeste								20		20			20							44	F	45
230	Machadinho d'Oeste			640				80	20	160	80	160		320							35	F	45
231	Machadinho d'Oeste							80	160	80	80	20	20	20	160	80					47	M	45
232	Machadinho d'Oeste								20	20	40		20		20	40					23	F	45
233	Machadinho d'Oeste																				20	F	45
234	Machadinho d'Oeste							80	20	320	160	160	80	160	320	160					47	F	45
235	Machadinho d'Oeste								20	40	40	20	20	20		40		20			21	F	45
236	Machadinho d'Oeste		20	80				160	80		20					20					71	M	45
237	Machadinho d'Oeste																				5	M	45
238	Machadinho d'Oeste			80						320	80			40		40					96	F	45
239	Machadinho d'Oeste																				9	F	45
240	Machadinho d'Oeste			1280					20							80					55	F	45
241	Machadinho d'Oeste										20					160		40			54	F	45
242	Machadinho d'Oeste							80	80	80	160	160	20	80	160	160					46	M	45
243	Machadinho d'Oeste								20	320	40	20	20	80	20	160					17	F	45
244	Machadinho d'Oeste															40					43	F	45
245	Machadinho d'Oeste								40		20		20	20	20	40					12	M	45
246	Machadinho d'Oeste								320	80	320	160	320	80	160	160	320				62	M	45
247	Machadinho d'Oeste		20	640	20				20				20	20	20	40	20				66	M	45
248	Machadinho d'Oeste								160	160		20			20	20	40				5	M	45
249	Machadinho d'Oeste								20		20		20	20	20	20					43	F	45
250	Machadinho d'Oeste								20		20										13	M	45
251	Machadinho d'Oeste								20		20										27	F	45
252	Machadinho d'Oeste								40	40	20	20	20	20	20	20		1280			43	F	45
253	Machadinho d'Oeste								1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280					32	M	45
254	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20									40	F	45
255	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20	20	20					69	M	45
256	Machadinho d'Oeste								1280	1280	1280	1280	1280	640	640	1280	1280				12	F	45
257	Machadinho d'Oeste								20	20	20										13	F	45
258	Machadinho d'Oeste					20			20	20	20	20									42	F	45
259	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20				20					17	F	45
260	Machadinho d'Oeste								160	80	320	?	320	80	160	160	160				35	M	45
261	Machadinho d'Oeste								20	20	20		20	20	20	20					65	M	45

262	Machadinho d'Oeste							20	20	20										44	M	45
263	Machadinho d'Oeste																			45	M	45
264	Machadinho d'Oeste							20	20	20		20	20		20					15	M	45
265	Machadinho d'Oeste							40	20	80	?	160	80	20	80	80				52	F	45
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
266	Machadinho d'Oeste								20	40	?	20	20	20	20	80				25	F	45
267	Machadinho d'Oeste								20	20	20	20	20	20		160				31	F	45
268	Machadinho d'Oeste							320	160	320	80	320	40	40	80	160				62	F	45
269	Machadinho d'Oeste							320	320	1280	640	640	1280	320	1280	320				38	M	45
270	Machadinho d'Oeste												20	20		20				40	F	45
271	Machadinho d'Oeste								20				20			20				44	M	45
272	Machadinho d'Oeste									160			20	20		20				46	M	45
273	Machadinho d'Oeste		20						20	80	40	20	40		160	20				45	F	45
274	Machadinho d'Oeste			20					20	20	20		20	20	20	20				58	F	45
275	Machadinho d'Oeste								20		20									10	M	45
276	Machadinho d'Oeste								20	20	20					20				47	F	45
277	Machadinho d'Oeste							1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280				11	M	45
278	Machadinho d'Oeste										20									8	F	45
279	Machadinho d'Oeste								20	40	40	20	20	20	160	80				45	F	45
280	Machadinho d'Oeste								20		20		20							41	F	45
281	Machadinho d'Oeste			20					80	80	20									77	F	45
282	Machadinho d'Oeste								20	20	20		20	20		80				42	M	45
283	Machadinho d'Oeste										20				20	40				43	M	45
284	Machadinho d'Oeste																			13	M	45
285	Machadinho d'Oeste										20			20	40	20				44	M	45
286	Rio Machado							640	20			20	20	20	20					67	M	29
287	Rio Machado			20					20	80			160	80	40	160				33	M	29
288	Rio Machado							20	40	20	20	20	40	40		20		20		12	M	30
289	Rio Machado							160	160	640	160	320	80	160	160	80		80		19	M	30
290	Rio Machado		20			80			40	40	80	20	80	40	40	40				17	M	21
291	Rio Machado							160	20	320	80	320	20	80	80	80				52	M	1
292	Rio Machado			640								20								19	M	1
293	Rio Machado									40	80	20								61	F	1
294	Rio Machado							40	160	640	320	640	80	160	160	320				59	M	1
295	Rio Machado																			7	M	1
296	Rio Machado																			11	M	33
297	Rio Machado							20	20	20										43	F	33
298	Rio Machado					80														11	M	1
299	Rio Machado					20				80	20	80								60	F	1

300	Rio Machado			320																40	F	1	
301	Rio Machado			160				640	40	160	80	160	40	20	80	80					50	F	33
302	Rio Machado								20	20											15	M	1
303	Rio Machado									40	40	160									68	F	1
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS	
304	Rio Machado																				10	M	1
305	Rio Machado			20					20	160	40	160									57	M	33
306	Rio Machado				20	20	160	20	20	160	20	80									84	F	1
307	Rio Machado							20	20	40	20	40	20	20	20	20					19	F	33
308	Rio Machado			320																	48	M	1
309	Rio Machado																				6	F	1
310	Rio Machado							80	20	160	80	160	40	80	40	80					1	M	33
311	Rio Machado	40																			25	M	1
312	Rio Machado																				34	M	1
313	Rio Machado				20			80	20	40	20	80	20	40	20	20					72	M	1
314	Rio Machado																				10	F	33
315	Rio Machado																				13	M	1
316	Rio Machado							20	20	20				20							8	F	1
317	Rio Machado																				45	F	33
318	Rio Machado																				4	F	1
319	Rio Machado			320																	49	F	1
320	Rio Machado											20									8	M	1
321	Rio Machado										40	20									27	F	33
322	Rio Machado			320				80	20	80	20	40	20	20	20	20					36	F	1
323	Rio Machado																				24	F	1
324	Rio Machado																				3	M	1
325	Rio Machado							80	20	20	80	20	20	20	20	20					11	M	1
326	Rio Machado																				8	M	1
327	Rio Machado																				15	F	1
328	Rio Machado									20	20	20									5	F	33
329	Rio Machado							160	80	640	1280	320	160	160	320	320					2	M	33
330	Rio Machado							20	20	20	80	20	20	20	20	20					15	F	33
331	Rio Machado									20	160	20									8	M	1
332	Rio Machado																				6	M	1
333	Rio Machado									20	20	20									5	M	1
334	Rio Machado																				21	F	1
335	Rio Machado																				6	M	33
336	Rio Machado		20	160	20			160	20	80	20	80	20	40	20	20					53	M	1
337	Rio Machado		80	160	40			80	20	80	20	40	20	20	20	20					78	M	1

338	Rio Machado			80	20			80	20	80	40	80	20	20	40	20				67	F	1
339	Rio Machado																			11	F	1
340	Rio Machado																			3	F	33
341	Rio Machado							20	20	80		20								25	M	1
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
342	Rio Machado																			37	F	1
343	Rio Machado							640	160	640	160	1280	80	40	80	160				13	M	1
344	Rio Machado	40			160				20	80	20	20								40	F	1
345	Rio Machado																			39	F	1
346	Rio Machado			640				20	20											49	M	1
347	Rio Machado																			12	M	1
348	Rio Machado	20	20	20	40		80	20	20	80	20	40	20	20	20	20				72	M	1
349	Rio Machado			320						40	40	20								15	M	1
350	Rio Machado									20	20	20								7	F	1
351	Rio Machado																			13	M	1
352	Rio Machado			320	20															6	F	1
353	Rio Machado																			3	F	1
354	Rio Machado																			5	F	1
355	Rio Machado									20	20									17	F	33
356	Rio Machado									80	40	20								13	M	1
357	Rio Machado									20	20	80								23	M	1
358	Rio Machado																			2	F	1
359	Rio Machado									320	80	320								12	M	1
360	Rio Machado									640	80	40								54	M	1
361	Rio Machado									160	20	80	20		20	20				32	M	13
362	Rio Machado							20	40											41	F	24
363	Rio Machado				80			20												24	F	9
364	Rio Machado		20	320				20	20	80										41	F	21
365	Rio Machado		20	320																13	F	27
366	Rio Machado		20	20				160	40	80	20	20	20	20	20	20				1	M	22
367	Rio Machado		20		20			80	40	320	40	80	20	20	20	20				52	M	21
368	Rio Machado		20	320																35	F	15
369	Rio Machado																			43	F	23
370	Rio Machado									80										8	F	8
371	Rio Machado		20	320						80										47	F	12
372	Rio Machado							40		40		20		20						50	M	27
373	Rio Machado	20	20		160			40	40											27	F	2
374	Rio Machado		20	640																51	F	26
375	Rio Machado							160	80	160	20	40	40	20	20	20				73	F	12

376	Rio Machado							320	160	80	20	40	20	20	20	20				26	M	27
377	Rio Machado																	40		15	F	19
378	Rio Machado					80		20		20		20								43	F	19
379	Rio Machado							40	20	40		20								20	F	12
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
380	Rio Machado																			7	F	16
381	Rio Machado		20	160				20		20										50	M	12
382	Rio Machado																			5	F	13
383	Rio Machado									20		20								11	M	27
384	Rio Machado									80		20		20						7	F	13
385	Rio Machado									20		20								25	M	27
386	Rio Machado																			9	F	16
387	Rio Machado		20		20					20		20	20						20	0	M	25
388	Rio Machado																			8	F	16
389	Rio Machado							20		20		20	20	20					20	35	M	3
390	Rio Machado							20	20				20							17	F	19
391	Rio Machado							20	20											17	M	31
392	Rio Machado		20							20		20		20						10	F	24
393	Rio Machado		20		20					20		20								7	F	8
394	Rio Machado			80						20										45	M	23
395	Rio Machado							160	1280	320	320	320	320	160	320	160				18	M	33
396	Rio Machado			160				20		20		20		20						28	F	23
397	Rio Machado																			15	F	24
398	Rio Machado		20	320				20	20	80	20	20	20	20	20	20				5	M	5
399	Rio Machado	40	160					320	320	320	320	160	160	80	20	160				79	M	28
400	Rio Machado							40	40	20				20						15	F	8
401	Rio Machado								80											1	F	27
402	Rio Machado				20					20			20							23	F	16
403	Rio Machado							40	40	20	20	40	20	20	20	20				21	M	23
404	Rio Machado	20	20		160			20	20											41	M	8
405	Rio Machado							20	20	20			20							10	M	13
406	Rio Machado							20	20	20				20						34	F	33
407	Rio Machado							20		40				20						10	M	12
408	Rio Machado							80	20	80	20	40	20	20	20	20				23	F	20
409	Rio Machado							20		80	20	40	20	20	20	20				12	M	19
410	Rio Machado									20										20	M	12
411	Rio Machado							20		20		20	20	20						78	M	9
412	Rio Machado									20		20								48	M	27
413	Rio Machado		20		40	20		40	20	40	40	160	20	80	40	20				28	M	25

414	Rio Machado																			12	M	13
415	Rio Machado								20											8	M	12
416	Rio Machado								20				20							17	F	12
417	Rio Machado								20		20	20	20							21	M	9
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
418	Rio Machado																			28	F	12
419	Rio Machado									20		20								64	F	18
420	Rio Machado		20					20		80				20						45	M	30
421	Rio Machado																			8	M	12
422	Rio Machado		20	20				640	320	80	20	80	20	80	20	20				44	F	5
423	Rio Machado							20												43	F	11
424	Rio Machado							40	20	20	20	20	20	20						7	M	13
425	Rio Machado																	40		10	F	1
426	Rio Machado																			8	M	1
427	Rio Machado							80	20	80	40	160	20	20	80	40		80		13	F	1
428	Rio Machado											20								20	M	1
429	Rio Machado		20	320				20		20	20	160	20	20	20	20				69	M	1
430	Rio Machado							20		20										65	M	1
431	Rio Machado							80	80			20	20			20		80		32	M	1
432	Rio Machado				40					20						20				44	M	1
433	Rio Machado				20															63	M	1
434	Rio Machado			20				40	20	40	20	20	20	20	20	20				45	F	1
435	Rio Machado																			34	F	1
436	Rio Machado							20		80	20	20	20	20	20	20				14	M	1
437	Rio Machado									20										40	F	1
438	Rio Machado																			38	F	1
439	Rio Machado									20										23	M	1
440	Rio Machado							160	160	320	160	320	80	160	320	40				20	F	1
441	Rio Machado																			24	M	1
442	Rio Machado													20						14	M	1
443	Rio Machado									20	20									9	M	1
444	Rio Machado																			11	F	1
445	Rio Machado							40	40	80	20	80								36	F	1
446	Rio Machado							20		40		40								49	M	1
447	Rio Machado									20	40							160		43	M	1
448	Rio Machado																			16	M	1
449	Rio Machado							80	80	160	80	160	80	20	80	40				7	F	1
450	Rio Machado																			17	F	1
451	Rio Machado																			8	M	1

452	Rio Machado							20	40											15	F	1
453	Rio Machado	20	20	20	80			1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	1280				88	M	1
454	Rio Machado							20		40	40									68	M	1
455	Rio Machado							160	80	160	40	160	20	40	80	20		160		59	F	1
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
456	Rio Machado																			7	F	1
457	Rio Machado							80	20											22	F	1
458	Rio Machado									40										45	F	1
459	Rio Machado							80	20	160	20	160	20	20	20	20				15	M	13
460	Rio Machado				20					20										79	F	14
461	Rio Machado							20												14	M	11
462	Rio Machado											320								46	M	6
463	Rio Machado																			6	M	31
464	Rio Machado			20		20		160	40	320	160	320	80	80	320	80	80			48	M	28
465	Rio Machado							80	40	160	20	40	20	40	20	20				15	F	30
466	Rio Machado																			5	M	12
467	Rio Machado									20			20			20				7	F	9
468	Rio Machado					20				20			20			20				15	F	12
469	Rio Machado			80						20			20	20		20				40	M	12
470	Rio Machado		20					80	20	160	40	80	20	40	80	20				71	M	5
471	Rio Machado									160	80	160	20	40	80	20				9	M	13
472	Rio Machado			160				80	40	160	20	160	20	40	20	20	20		40	26	F	31
473	Rio Machado									160			20			20				10	F	6
474	Rio Machado									160	80	40	20			20				4	M	6
475	Rio Machado																			19	F	13
476	Rio Machado				80		40													6	M	17
477	Rio Machado							80	40	160	80	80	20	40	80	80				51	M	9
478	Rio Machado	20	80		320															18	F	13
479	Rio Machado																			7	M	6
480	Rio Machado			80				20		40	20	80	20	20	20	20				31	M	6
481	Rio Machado									80		40								13	F	13
482	Rio Machado			40				80	20	40	40	80		20		20		20		34	F	14
483	Rio Machado																			9	F	6
484	Rio Machado			40		20		40		40	40	160	20	20	20	40				58	M	14
485	Rio Machado									20	80	20	20			20				10	M	13
486	Rio Machado				20															15	F	6
487	Rio Machado			640				20												28	M	4
488	Rio Machado									80										7	F	6
489	Rio Machado							160	80											40	F	31

490	Rio Machado																			48	F	33
491	Rio Machado			20				160	20	160	20	40	20	40	20	20				6	F	13
492	Rio Machado									160										39	F	13
493	Rio Machado																			13	F	15
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
494	Rio Machado																			18	F	15
495	Rio Machado					20		80	20	40						20				28	M	22
496	Rio Machado																			38	F	22
497	Rio Machado				80			20		40		20								14	M	15
498	Rio Machado							80	20	80	20	40				20				26	M	20
499	Rio Machado				160															27	F	13
500	Rio Machado							40		80		20				20				53	M	33
501	Rio Machado				160					20										38	F	30
502	Rio Machado																			10	F	6
503	Rio Machado			320						20				40						44	F	14
504	Rio Machado			1280				1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	640				49	F	28
505	Rio Machado							80	20	20				20						45	F	32
506	Rio Machado			1280					20	80		20								43	M	31
507	Rio Machado			320				80	20	160	80	160	80	20	20	80				58	M	10
508	Rio Machado							80	20	320	160	80	80	40	80	80				39	M	17
509	Rio Machado																			6	F	17
510	Rio Machado		320							40										11	M	15
511	Rio Machado	640	640	160				320	40	160	80	80	80	40	80	80	40			53	F	3
512	Rio Machado				20		40	20	20	80	40	40	80	40	20	20				37	M	8
513	Rio Machado	160	80	160	160			20		40		20								16	M	11
514	Rio Machado	20	20		320															19	M	31
515	Rio Machado			1280																6	F	2
516	Rio Machado		20					20		80		20								58	M	29
517	Rio Machado	80	20	40	80					20		20								34	M	13
518	Rio Machado																			5	F	9
519	Rio Machado						40													8	F	17
520	Rio Machado																			9	F	17
521	Rio Machado																40			42	M	28
522	Rio Machado																			28	M	1
523	Rio Machado																			9	M	13
524	Rio Machado											20	20	20						6	M	30
525	Rio Machado		20	80	20					40										47	F	7
526	Rio Machado		20		20			160	20	160	80	160	80	80	40	40	40			47	M	15
527	Rio Machado							320	160	20		20								8	M	30

528	Rio Machado							1280	320	640	640	640	320	160	640	320				27	F	6
529	Rio Machado									80	20	20								13	M	14
530	Rio Machado				80					80		20					40			20	M	33
531	Rio Machado																			7	M	33
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
532	Rio Machado	80	160	320	160		80	160	20	160	80	80	80	40	20	40	40			52	M	33
533	Rio Machado																			6	F	33
534	Rio Machado																			8	F	33
535	Rio Machado			40	80			1280	640	1280	1280	1280	1280	320	1280	1280				50	M	33
536	Rio Machado										80	20								34	F	33
537	Rio Machado							20	20	20	20	20								48	F	33
538	Rio Machado																			11	F	33
539	Rio Machado									20	20									24	F	6
540	Rio Machado							160	20	20		20								19	M	33
541	Rio Machado																			33	F	33
542	Rio Machado																			33	F	33
543	Rio Machado			80				40		20	20	20								23	F	33
544	Rio Machado																			10	F	33
545	Rio Machado	80	80	80				1280	320	1280	1280									43	M	33
546	Rio Machado																			10	F	7
547	Rio Machado									20										33	M	33
548	Rio Machado									20		20								12	M	33
549	Rio Machado																			15	F	7
550	Rio Machado	80															80			12	M	33
551	Rio Machado																			5	F	33
552	Rio Machado									80	20	20								18	M	33
553	Rio Machado							1280	640	1280	640	640	640	160	640	160				13	M	33
554	Rio Machado																			15	F	33
555	Rio Machado							20	20	160	80	40	20	20	20	20				20	M	33
556	Rio Machado	20			80					160		20								13	F	7
557	Rio Machado																			6	M	33
558	Rio Machado																			12	M	33
559	Rio Machado							40		40										45	M	33
560	Rio Machado	80			20					40										46	F	33
561	Rio Machado																			9	F	33
562	Rio Machado																			9	F	33
563	Rio Machado									20	20									6	M	33
564	Rio Machado																			10	M	33
565	Rio Machado																			4	F	33

566	Rio Machado																				9	M	33
567	Rio Machado							20													43	M	33
568	Rio Machado											20									18	F	33
569	Rio Machado							20	20	160	20	80	80	40	20	20					23	M	33
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS	
570	Rio Machado										20	20									8	F	33
571	Rio Machado			40		20	80	640	40	320	320	320	20	20	20	40					39	M	33
572	Rio Machado							20		160	20	40		20	20	20					14	M	33
573	Rio Machado									20	20					20					8	M	33
574	Rio Machado									20	20					20					10	M	33
575	Rio Machado			160				640	80	160	160	160	20	20	20	40					66	F	33
576	Rio Machado							20		80		40	20		80	40					21	F	33
577	Rio Machado																				22	F	33
578	Rio Machado			40				20		80											38	M	33
579	Rio Machado																				4	M	33
580	Rio Machado									40	40						20				33	F	33
581	Rio Machado																				13	F	33
582	Rio Machado																				4	M	33
583	Rio Machado																				22	M	33
584	Rio Machado							640	320	1280	640	1280	320	320	640	640					17	M	33
585	Rio Machado																				45	F	33
586	Rio Machado									40	20	20									3	F	33
587	Rio Machado									40											9	F	33
588	Rio Machado							320	40	320	160	160	40	20	160	80					28	M	33
589	Rio Machado									160	20	20				20					36	M	33
590	Rio Machado							320	160	160	20	20	20	20	20	20	80		20		34	M	33
591	Rio Machado					20	80		20	80							80		40		43	M	33
592	Rio Machado																				7	F	33
593	Rio Machado							80	40	20											37	F	33
594	Rio Machado																				6	M	33
595	Rio Machado																				4	F	33
596	Rio Machado									20	20				20						11	F	33
597	Rio Machado																				10	M	33
598	Rio Machado					20		80	20	20	20	20	20		20	20					20	M	33
599	Rio Machado																				16	F	33
600	Rio Machado							640	320	640	640	1280	160	160	640	160					76	F	33
601	Rio Machado							20		160	20	20	20	20	20	20	20				12	F	14
602	Rio Machado							20	20	80	20	20									10	F	33
603	Rio Machado																				23	M	14

604	Rio Machado									40											10	F	33	
605	Rio Machado						20	20		40					20							23	M	6
606	Rio Machado																					38	F	11
607	Rio Machado			20				20		40	20	160			20							27	M	33
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
608	Rio Machado							20		40	20	20		20	20	20					80	F	23	
609	Rio Machado									20												7	F	33
610	Rio Machado	20	160	80	160			160	20	20							20					36	F	17
611	Rio Machado																					3	M	33
612	Rio Machado									20												11	F	13
613	Rio Machado				80			20	20	20	20	20	20	20								46	F	6
614	Rio Machado	20	80		20			320	40	80	40	40			20	20						55	F	25
615	Rio Machado						20	320	80	80	20	20				20						40	M	1
616	Rio Machado		20		80		20	320	80	320	160	80	40	20	20	20	20		20			59	F	29
617	Rio Machado	160	160	640	160			160	20	80	20	20	20	20	20	20	20					54	M	26
618	Rio Machado							80	40	640	160	320	40	20	160	80						5	M	13
619	Rio Machado									20												20	F	28
620	Rio Machado			640			80		20	20	20	20				20						37	F	16
621	Rio Machado							80	20	320	40	80	20	20	20	40						42	F	27
622	Rio Machado					20	320	20	20	20	20					20	80	80	80			16	M	27
623	Rio Machado			20						80	40					20	20					38	M	1
624	Rio Machado																					12	M	30
625	Rio Machado				40			20	20	160	20	20	20	20	20	20						22	F	1
626	Rio Machado																					5	M	1
627	Rio Machado																					23	F	14
628	Rio Machado							20		20		20										51	F	33
629	Teodoro Sampaio							20	20													46	F	41
630	Teodoro Sampaio																					26	F	41
631	Teodoro Sampaio							20	20	20	20	160	20	20	80	20						48	F	41
632	Teodoro Sampaio								20					20		20						40	M	41
633	Teodoro Sampaio							20	20							20						57	M	41
634	Teodoro Sampaio								20					20		20						45	M	41
635	Teodoro Sampaio																					69	F	41
636	Teodoro Sampaio							20	20	40	20	20	20	20	20	20						25	F	41
637	Teodoro Sampaio								20													30	F	41
638	Teodoro Sampaio								20													26	M	41
639	Teodoro Sampaio									20												19	M	41
640	Teodoro Sampaio								20													23	M	41
641	Teodoro Sampaio																					74	M	42

642	Teodoro Sampaio							20	40		20										21	M	42	
643	Teodoro Sampaio														20	20						76	M	42
644	Teodoro Sampaio																					44	F	42
645	Teodoro Sampaio																					34	F	42
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
646	Teodoro Sampaio							20													19	M	42	
647	Teodoro Sampaio							20	20	20	20			20	20	20					76	F	42	
648	Teodoro Sampaio							20	20					20							41	F	42	
649	Teodoro Sampaio							20	20												58	F	42	
650	Teodoro Sampaio							20	20												18	M	42	
651	Teodoro Sampaio							20	20					80							40	F	42	
652	Teodoro Sampaio							20	20												32	M	42	
653	Teodoro Sampaio																				20	F	42	
654	Teodoro Sampaio																				22	M	42	
655	Teodoro Sampaio							20	20	20											31	M	42	
656	Teodoro Sampaio								20												45	F	42	
657	Teodoro Sampaio							20	20	20	20	20	20	20	20	20					56	M	42	
658	Teodoro Sampaio							20	20	20	20	20	20	20	20	20					23	F	42	
659	Teodoro Sampaio																				58	F	43	
660	Teodoro Sampaio							20	20	20				20							43	M	43	
661	Teodoro Sampaio							20	20	80	20	20	20	80	20	20					41	M	43	
662	Teodoro Sampaio																				42	F	43	
663	Teodoro Sampaio							20	80												19	M	43	
664	Teodoro Sampaio							20	20												51	M	43	
665	Teodoro Sampaio																				20	M	43	
666	Teodoro Sampaio					20		20	20	20	20	20	20	20	20	20					51	M	43	
667	Teodoro Sampaio							20	20												53	F	43	
668	Teodoro Sampaio							20	20												16	F	43	
669	Teodoro Sampaio								20												34	F	43	
670	Teodoro Sampaio								20												23	F	44	
671	Teodoro Sampaio							20	20					20	20	20					22	F	44	
672	Teodoro Sampaio							20	1280					20	20	20					32	F	44	
673	Teodoro Sampaio							20	20												30	M	44	
674	Teodoro Sampaio																				18	F	44	
675	Teodoro Sampaio									20		20				20					50	M	41	
676	Teodoro Sampaio							20	20												54	F	41	
677	Teodoro Sampaio									20						40					41	F	41	
678	Teodoro Sampaio							20													40	F	41	
679	Teodoro Sampaio																				48	F	41	

680	Teodoro Sampaio																				70	M	41	
681	Teodoro Sampaio																					20	F	41
682	Teodoro Sampaio								40	20	80					20						76	M	41
683	Teodoro Sampaio																					22	F	41
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
684	Teodoro Sampaio																				40	F	41	
685	Teodoro Sampaio							20	20	20	20	20				40						46	F	41
686	Teodoro Sampaio							20	20			20										45	F	41
687	Teodoro Sampaio																					38	F	41
688	Teodoro Sampaio							20	20			20	20			20						34	F	41
689	Teodoro Sampaio							40	20	40	20	160	20	20	80	20						51	M	41
690	Teodoro Sampaio							20								20						41	F	41
691	Teodoro Sampaio							80	20	160		20		40	40	80						52	F	41
692	Teodoro Sampaio							20														36	F	41
693	Teodoro Sampaio							20	20			40	20			20						39	F	41
694	Teodoro Sampaio																					42	F	41
695	Teodoro Sampaio																					47	M	41
696	Teodoro Sampaio																					22	F	41
697	Teodoro Sampaio							20														31	F	41
698	Teodoro Sampaio							80	40													41	F	42
699	Teodoro Sampaio																					55	F	42
700	Teodoro Sampaio							20														25	M	42
701	Teodoro Sampaio							80	20	20	20	20	20		20	20						43	F	42
702	Teodoro Sampaio							20	20	20	20	20			40	20						53	M	42
703	Teodoro Sampaio							20	20	40	20	320	20		40	20						42	F	43
704	Teodoro Sampaio																					62	F	43
705	Teodoro Sampaio																					54	M	43
706	Teodoro Sampaio																					19	F	44
707	Jacupiranga																					45	F	37
708	Jacupiranga							640	320	640	320	320	640	640	1280	640						48	M	37
709	Jacupiranga																					23	F	37
710	Jacupiranga							320	320	640	320	320	320	80	320	160						25	M	37
711	Jacupiranga																					22	F	37
712	Jacupiranga																					19	F	37
713	Jacupiranga				20	20			20	20												70	M	38
714	Jacupiranga																					28	M	38
715	Jacupiranga																					39	F	37
716	Jacupiranga																					58	M	34
717	Jacupiranga																					30	M	34

718	Jacupiranga																				55	M	34	
719	Jacupiranga																					54	M	34
720	Jacupiranga																					25	M	34
721	Jacupiranga																					55	M	34
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
722	Jacupiranga						40										20		20	25	M	34		
723	Jacupiranga																				54	M	34	
724	Jacupiranga																				50	M	35	
725	Jacupiranga									20	20	20			20						25	M	35	
726	Jacupiranga																				54	F	35	
727	Jacupiranga																				59	M	35	
728	Jacupiranga				20																77	M	35	
729	Jacupiranga																				59	M	35	
730	Jacupiranga																20				36	M	35	
731	Jacupiranga																40		40		38	F	35	
732	Jacupiranga																				50	M	35	
733	Jacupiranga																				40	F	35	
734	Jacupiranga																				57	F	35	
735	Jacupiranga																				56	F	35	
736	Jacupiranga																				22	M	35	
737	Jacupiranga																				16	F	35	
738	Jacupiranga																				62	M	35	
739	Jacupiranga																				57	F	35	
740	Jacupiranga																				27	F	35	
741	Jacupiranga																				21	F	35	
742	Jacupiranga																				24	F	35	
743	Jacupiranga																				39	F	35	
744	Jacupiranga																				29	F	35	
745	Jacupiranga																				48	M	35	
746	Jacupiranga																				10	F	35	
747	Jacupiranga																				19	M	35	
748	Jacupiranga							20	20		20	20			20	20					37	M	35	
749	Jacupiranga						20										20	20	20		51	M	35	
750	Jacupiranga																				14	F	35	
751	Jacupiranga									20		20			20						28	M	35	
752	Jacupiranga																20				37	F	36	
753	Jacupiranga																				62	F	36	
754	Jacupiranga																				39	F	36	
755	Jacupiranga																				64	M	36	

756	Jacupiranga																				27	F	36	
757	Jacupiranga																					37	M	36
758	Jacupiranga																					47	F	36
759	Jacupiranga						20										20					60	F	36
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
760	Jacupiranga																				18	F	36	
761	Jacupiranga														20							37	F	36
762	Jacupiranga																					65	M	36
763	Jacupiranga																					50	F	36
764	Jacupiranga																					56	F	36
765	Jacupiranga																					57	M	36
766	Jacupiranga																					22	F	36
767	Jacupiranga																					17	F	36
768	Jacupiranga																					37	F	36
769	Jacupiranga																					26	F	36
770	Jacupiranga																					55	M	36
771	Jacupiranga																					51	F	36
772	Jacupiranga																					22	F	36
773	Jacupiranga														20							61	F	36
774	Jacupiranga																					61	M	36
775	Jacupiranga																					31	F	36
776	Jacupiranga																					30	F	36
777	Jacupiranga																					50	M	36
778	Jacupiranga																20					62	M	36
779	Jacupiranga																					59	M	36
780	Jacupiranga									20		160			20	20						20	F	37
781	Jacupiranga																					26	F	37
782	Jacupiranga															20						49	F	37
783	Jacupiranga																					64	F	37
784	Jacupiranga																					33	M	37
785	Jacupiranga							20	20	80	20	160			40	20						37	F	37
786	Jacupiranga																					61	M	37
787	Jacupiranga									20												31	F	37
788	Jacupiranga									20		80										44	F	37
789	Jacupiranga														20	20						26	F	37
790	Jacupiranga																					67	F	37
791	Jacupiranga																					38	F	37
792	Jacupiranga																					62	F	37
793	Jacupiranga		20		20																	59	F	37

794	Jacupiranga															20					57	M	37	
795	Jacupiranga																					16	M	37
796	Jacupiranga																					56	F	37
797	Jacupiranga					20																23	M	37
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS		
798	Jacupiranga																40		40		36	F	37	
799	Jacupiranga																20				41	M	37	
800	Jacupiranga																20				34	M	37	
801	Jacupiranga														20						19	M	37	
802	Jacupiranga																				32	M	37	
803	Jacupiranga																				35	M	37	
804	Jacupiranga							40	20	20											62	M	36	
805	Jacupiranga					640															27	M	37	
806	Jacupiranga				40	40	160	20		40	20	320					80	20	160		32	M	38	
807	Jacupiranga							20		40	20	320									25	F	38	
808	Jacupiranga									20											61	M	39	
809	Jacupiranga							20	20												64	F	39	
810	Jacupiranga											20	40								43	F	39	
811	Jacupiranga									20	20	20									24	F	39	
812	Jacupiranga																				39	F	39	
813	Jacupiranga									20		20									35	M	39	
814	Jacupiranga									20											14	F	39	
815	Jacupiranga						20	20	20	20		640			20	20	80		40		45	M	39	
816	Jacupiranga	20								20		20									27	M	39	
817	Jacupiranga																				47	F	39	
818	Jacupiranga																				50	F	39	
819	Jacupiranga																				49	F	39	
820	Jacupiranga									20	20	20									82	F	39	
821	Jacupiranga																				18	F	39	
822	Jacupiranga	20		20				20	20	80	80	80	20	40	40	20					50	M	39	
823	Jacupiranga					40	40			20							80		80		39	F	40	
824	Jacupiranga																				30	F	40	
825	Jacupiranga	20			20		20			40	20	20	20			40	20		20		42	F	40	
826	Jacupiranga																				27	F	40	
827	Jacupiranga																				29	F	40	
828	Jacupiranga																				27	M	40	
829	Jacupiranga									40	20	20									40	F	40	
830	Jacupiranga																				29	F	40	
831	Jacupiranga																				23	F	40	

832	Jacupiranga									20										36	F	40
833	Jacupiranga									40		40				40				27	F	40
834	Jacupiranga																			55	F	40
835	Jacupiranga									40		20				40				34	F	40
N	Local	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	MAGV	TCMV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	CARV	OROV	CATU	ID	SEX	GPS
836	Jacupiranga											40				20				35	F	40
837	Jacupiranga									40										33	F	40
838	Jacupiranga									20		20				20				29	F	40
839	Jacupiranga																			29	F	40
840	Jacupiranga																			22	F	40
841	Jacupiranga									20		20								60	F	40
842	Jacupiranga															20				46	M	40
843	Jacupiranga						20	20		20		40					40			50	F	40
844	Jacupiranga									20		80								55	M	40
845	Jacupiranga									80										42	F	40
846	Jacupiranga																			46	M	40
847	Jacupiranga							20	20	40	20	160	20	20	20	40				48	F	40
848	Jacupiranga															20				25	F	40
849	Jacupiranga									40	20	20	20	20		20				25	F	40
850	Jacupiranga						20									20				39	F	40
851	Jacupiranga																20			19	F	40
852	Jacupiranga																			49	F	40
853	Jacupiranga									40		20				20				63	F	40
854	Jacupiranga									20		20								54	F	40
855	Jacupiranga									40		20								30	F	40