

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM
ARTRÓPODES.

Giulia Magalhães Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

UBERLÂNDIA – MG
JULHO-2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIA BIOMÉDICA
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

APLICAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM
ARTRÓPODES.

Giulia Magalhães Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

UBERLÂNDIA – MG
JULHO-2018

DEDICATÓRIA

A Deus, por sua misericórdia e graça, e a
minha família, em especial ao meu pai
Mário, minha mãe Geisa e minha irmã
Giovana.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas infinitas graças e bênçãos em minha vida, pois de nada sou merecedora. “Tu és o meu Deus; graças te darei! Ó meu Deus, eu te exaltarei!” Salmos 118:28.

Aos meus pais que sempre me apoiaram nessa jornada. O amor de vocês é incondicional e demonstra um interesse genuíno na minha felicidade e na da Gigi. Apenas posso agradecer por tudo o que vocês têm me dado, pois nunca conseguirei compensar devidamente a dedicação que sempre manifestaram. Vocês são bênçãos, espero que um dia meus filhos possam sentir tanto orgulho e gratidão por mim, igual eu sinto por vocês.

A minha avó Elza, minha madrinha Gisele, e meus primos\irmãos Jorge e João, que sempre me receberam em Ribeirão Preto com muito amor e entenderam a minha ausência. Amo nossa família.

A minha irmã Giovana, que é o presente que Deus me deu. Minha companheira que sempre tenta me alegrar de alguma forma, e me enche de orgulho.

Aos meus amigos, de Uberlândia e de Ribeirão Preto que sempre me confortaram nas horas de desespero, comemoraram as minhas vitórias e me fizeram companhia quando eu me sentia sozinha. Em especial, aos jovens da IPC, IEBNA, ao “Bonde” e aos amigos do laboratório.

A coordenação do meu curso, que sempre esteve presente e foi solícita quando eu precisava, e ao meu orientador, Prof. Dr. Jonny Yokosawa, pelos momentos de dedicação, ensinamentos e paciência.

À todos vocês, meu muito obrigada!

RESUMO

Atualmente doenças que são transmitidas por vetores tem alarmado vários países, devido a sua rápida disseminação, a dificuldade de diagnóstico, severidade e dificuldade em prevenção. Temos como exemplo, as arboviroses, que são vírus transmitidos por artrópodes, como chikungunya, Dengue e Zika e algumas zoonoses, como rickettsioses. Nota-se que as arboviroses apresentam distribuição nacional, ou seja, estão presentes em todos os estados brasileiros, porém, as rickettsioses são mais frequentes na região sudeste do país. Independente de sua localização, ambas as infecções apresentam caracteres importantes e que não podem ser negligenciados, principalmente se tratando das *rickettsias* pertencentes ao grupo da febre maculosa. Assim, através do teste molecular, este trabalho visou a pesquisa de *rickettsias*, pertencentes ao grupo da febre maculosa, em carrapatos da espécie *Amblyomma dubitatum*, e da aplicação de testes moleculares para investigar a presença de alfavírus em larvas de mosquitos. Todos os vetores são provenientes da cidade de Uberlândia . Três amostras de carrapatos foram testadas para o gene específico pertencentes a rickettsias do grupo da febre maculosa, o *ompB*, onde 2 obtiveram positividade. Nove amostras de mosquitos foram testadas para os alfavírus chikungunya e Mayaro, e 1 apresentou *amplicom* do tamanho esperado. É de extrema importância que essas avaliações sejam feitas, pois elas retratam o possível perfil epidemiológico da cidade, sendo assim, nos permite conhecer a distribuição dessas espécies no município de Uberlândia.

Palavras-chave: Arboviroses; Alfavírus; Febre Maculosa Brasileira; Mosquitos; Carrapatos;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Arboviroses e seus vetores.....	6
1.2 Zoonose: Rickettsiose.....	9
1.3 Dados epidemiológicos.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVO GERAL.....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4.0 METODOLOGIA.....	16
4.1 Área de Estudo.....	16
4.2 Amostras.....	16
4.2.1 Amostras testadas para alfavírus.....	16
4.2.2 Amostras testadas para <i>Rickettsia</i>	17
4.3 Extração de ácido nucleico.....	18
4.3.1 – Extração de RNA’.....	18
4.3.2 – Extração de DNA.....	19
4.4 PCR e RT-PCR.....	20
4.4.1 RT-PCR para detecção de RNA de alfavírus.....	21
4.4.1.1 RT-PCR para segmento do gene que codifica actina de mosquitos.....	21
4.4.1.2 RT-PCR para alfavírus.....	22
4.4.2 PCR para detecção de DNA de <i>Rickettsia</i>	23
4.4.2.1 PCR para segmento do gene que codifica o rRNA 16S de carrapatos.....	24
4.4.2.2 PCR para segmento do gene <i>ompB</i>	24
4.5 Eletroforese.....	25
4.6 Sequenciamento nucleotídico.....	26
4.6.1 Sequenciamento das amostras testadas para alfavírus.....	26
4.6.2 Sequenciamento das amostras testadas para <i>Rickettsia</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Diagnóstico de alfavírus.....	27
5.2 Diagnóstico de <i>Rickettsia</i>	31
6. CONCLUSÕES	35

1. INTRODUÇÃO

A degradação ambiental e o rápido crescimento populacional, assim como o crescimento descontrolado das cidades, são fatores que proporcionam a disseminação de vetores que transmitem patógenos ao homem e a outros animais. Atualmente a locomoção de pessoas para outras áreas, seja urbana ou rural, tem aumentado, e isso também facilita a disseminação de vírus e bactérias. Os patógenos são transportados em pacientes infectados, especialmente em indivíduos que se encontram no período de incubação da infecção. Assim, estes agentes patogênicos podem sofrer transição de um problema de saúde de uma área restrita para um problema mundial rapidamente. Geralmente, os vírus que se disseminam com mais facilidade e atingem uma maior parcela da população são os vírus respiratórios e os Arbovírus (FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, 2014).

Os vetores artrópodes hematófagos proporcionam um modo de transporte eficiente para um número bastante amplo de agentes infecciosos, abrangendo tanto parasitas, quanto patógenos de grande importância para a saúde humana (BENELLI, 2015; BENELLI; DUGGAN, 2018). É fato que a epidemiologia de infecções transmitidas por artrópodes tem mudado. Doenças que pertenciam a regiões tropicais, agora também são encontradas em países com o clima temperado. Pode-se citar como exemplos desse fato, o surto de chikungunya que acometeu a Itália em 2007 (REZZA et al., 2007) e a epidemia de chikungunya que ocorreu nas Américas e no Caribe em 2013 (STAPLES; FISCHER, 2014).

Visto que as doenças transmitidas por artrópodes tem grande importância para a saúde pública, esse trabalho irá abordar algumas delas, como as arboviroses e bactérias obrigatoriamente intracelulares.

1.1 Arboviroses e seus vetores

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes. Esses vírus são mantidos na natureza por ciclos epidemiológicos que envolvem hospedeiros vertebrados e vetores artrópodes hematófagos (BICHAUD et al., 2014). Mosquitos e carrapatos correspondem aos principais vetores de arboviroses (KUNO; CHANG, 2005). São conhecidas cerca de 15 mil espécies de artrópodes hematófagos e, dentre os vetores transmissores de vírus que infectam humanos, a

grande maioria pertence à ordem Diptera da classe Insecta (FORATTINI, 2002). A subfamília Culicinae (família Culicidae) engloba os principais mosquitos transmissores de vírus com mais de 3.000 espécies. Espécies dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus*, *Psorophora*, *Coquillettidia*, *Sabethes* e *Wyeomyia* compõem os principais vetores das arboviroses brasileiras (HONORIO et al., 2009). Percebe-se que nos últimos anos, a distribuição global e a carga de doenças associada aos arbovírus aumentaram, tendo como exemplo o vírus da chikungunya que atingiu o nordeste da Itália em 2007 e a França em 2010 e 2014, fato inesperado, já que o clima desses países não favorece o desenvolvimento dos seus vetores (FAILLOUX et al., 2017) e a circulação do vírus Mayaro em Cuiabá-MT em 2012 (SERRA et al., 2016).

Os mosquitos do gênero *Aedes* são importantes vetores na transmissão de diversos vírus causadores de doenças que concentram grande atenção da opinião pública, como o vírus da dengue (HAWLEY et al., 1987). Experimentalmente, o *Aedes albopictus* é considerado como potencial vetor dos flavivírus (vírus dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4, vírus da encefalite japonesa, vírus do Oeste do Nilo e vírus da febre amarela), dos alfavírus (vírus chikungunya, vírus da encefalite equina do leste, vírus Mayaro, vírus da encefalite equina do oeste, vírus da encefalite equina venezuelana e vírus Sindbis) e dos bunyavírus (vírus Jamestown Canyon, vírus Keystone, vírus Oropouche e vírus LaCrosse) (MOORE; MITCHELL, 1997). Os mosquitos desse gênero podem habitar com sucesso os ambientes de climas tropicais e temperados e apresentam comportamento antropofílico e zoofílico. Acredita-se que a negociação de pneus e de madeira da Ásia foi a provável via de introdução desse inseto em países onde sua presença teria sido improvável. Isso foi possível graças a resistência que os ovos desses tem em relação a dessecação (ERGULER et al., 2017; VANNAVONG et al., 2017).

De acordo com Figueiredo (2007), os mosquitos do complexo *Culex pipiens* apresentam populações de diferentes hábitos, podendo ser antropofílicos e/ou zoofílicos. Estes mosquitos são responsáveis pela transmissão de importantes arbovírus, como o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), que já foi detectado no Brasil, e o vírus do Oeste do Nilo (WNV), um importante agente causador de manifestações neurológicas graves nos humanos infectados na América do Norte (FIGUEIREDO, L. T., 2007).

As fêmeas dos mosquitos citados se infectam durante a hematofagia realizada em hospedeiros competentes, ou seja, aqueles que possuem uma variedade de fatores biológicos e genéticos que possibilitam a amplificação do vírus. Essa prática é necessária para a nutrição

dos ovos da fêmea para uma posterior oviposição. Após um período de incubação de 8 a 14 dias, uma infecção persistente é estabelecida nas glândulas salivares do vetor, dessa forma este poderá transmitir o vírus para outro hospedeiro. A transmissão transovariana e venérea também podem ocorrer, mas essas são menos frequentes (FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014).

Os vírus Mayaro (MAYV) e chikungunya (CHIKV) são exemplos de arbovírus, pertencentes à família *Togaviridae*, gênero alfavírus. O genoma dos alfavírus é formado por RNA de fita simples, polaridade positiva, não-segmentado, de aproximadamente 12 kb, associado a 240 cópias de uma proteína denominada C (30 kDa), que forma um capsídeo de simetria icosaédrica, o qual é recoberto por um envelope, que advém da membrana plasmática da célula do hospedeiro. Nessa membrana, estão inseridas as glicoproteínas E1 (54 kDa) e E2 (52 kDa), isto constitui as espículas virais (MEZENCIO et al., 1990). De acordo com Strauss (STRAUSS; STRAUSS, 1994) o RNA genômico (42 S) funciona como RNA mensageiro para síntese das proteínas não estruturais, as poliproteínas p123 e p1234. Após serem clivadas essas poliproteínas dão origem a quatro proteínas não estruturais (nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4), que são necessárias para a replicação do RNA viral, já que elas formam o complexo de replicação. Este, por sua vez, é responsável pela formação inicial de várias fitas de RNA genômico de polaridade negativa, que servirá como molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico e RNA subgenômico 26 S, ambos de polaridade positiva. O RNA subgenômico (26 S) serve como RNAm para a tradução das proteínas estruturais do vírus, as quais são sintetizadas sob a forma de uma poliproteína, dando origem à proteína do capsídeo (proteína C) e às proteínas p62, 6K e E1. A proteína C possui atividade autoproteolítica, realizando sua própria clivagem durante a tradução, a partir do polipeptídeo nascente.

O MAYV foi isolado pela primeira vez em Trinidad em 1954 (LEDNICKY et al., 2016). Em 1955 houve uma epidemia de infecção causada pelo vírus Mayaro perto da cidade de Belém, e foi a primeira vez que esse vírus foi detectado no Brasil (CAUSEY; MAROJA, 1957). Segundo Anderson (ANDERSON et al., 1957), os micos e macacos apresentam uma grande variedade de anticorpos contra esse vírus, então conclui-se que esses animais são provavelmente o reservatório natural do patógeno. Recentemente, o MAYV foi encontrado em regiões urbanas dos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul (ABAD-FRANCH et al., 2012; MOURAO et al., 2012).

O CHIKV é enzoótico, primitivamente encontrado em regiões tropicais e subtropicais da África, no sul e sudeste da Ásia e em ilhas do Oceano Índico. No início de 1950, esse vírus foi isolado de um paciente do atual território da Tanzânia e em 1954 houve um surto nas Filipinas (TORRES et al., 2015). No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque (Amapá). Ao longo de 2014, foram confirmados 2.772 casos de CHIKV, distribuídos em seis Unidades Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). Em 2016, foram registrados quase 272 mil casos prováveis de febre chikungunya e 196 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No país os casos de Mayaro não são notificados devido a falta de exames específicos para a detecção desse vírus, sendo assim, o diagnóstico dessa arbovirose é comprometido, dificultado e muitas vezes, negligenciado.

As sintomatologias clínicas dessas viroses incluem febre alta, artralgias, podendo se transformar em artrite dos pulsos, tornozelos, dedos dos pés e de outras articulações, exantema, cefaleia, mialgia, dor ocular, fotofobia, e especificamente no caso do Mayaro, conjuntivite, diarreia e vômitos. Essa apresentação clínica não específica é muitas vezes confundida com a Dengue, já que essa tem uma alta recorrência no Brasil. A infecção causada por MAYV, em específico, não evolui para quadros hemorrágicos, diferente da causada por CHIKV (AZEVEDO et al., 2009; SERRA et al., 2016).

A falta de exames rápidos e específicos para tais arbovírus dificulta o diagnóstico precioso e visto que a sintomatologia dessas doenças é muito semelhante, desconfia-se que alguns casos de dengue cuja sorologia é negativa para o mesmo, ou seja, classificados como suspeita de dengue, possam ser casos de Mayaro, chikungunya ou outra arbovirose.

1.2 Zoonose: Rickettsiose

Em relação a outros artrópodes hematófagos de grande importância para a saúde pública, os carrapatos têm um papel crucial (PFAFFLE et al., 2013), uma vez que são capazes de transmitir um elevado número de agentes infecciosos para seres humanos e animais. Bactérias obrigatoriamente intracelulares, como *Rickettsiae*, se destacam dentre os patógenos transmitidos por carrapatos, pois estas mantêm ciclos enzoóticos e silvestres na natureza (LABRUNA et al., 2004). Dentre as doenças causadas pela *Rickettsia*, a febre maculosa merece maior atenção, por causa de seu impacto e incidência mundial. Nos países das Americas

observa-se a incidência de febre maculosa das montanhas rochosas (FMMR) e no Brasil, a febre maculosa brasileira (FMB) (MARTINS et al., 2015).

Rickettsia spp. pertencem a ordem *Rickettsiales*, e a família *Rickettsiaceae*. Hospedeiros vertebrados e invertebrados são os alvos de bactérias pertencentes a essa ordem (ROUX; RAOULT, 1995). Com base nos padrões antigênicos, o gênero *Rickettsia* é dividido em três grupos, sendo eles o grupo do tifo (GT), o grupo da febre maculosa (GFM) e o grupo ancestral (GA) (GALVAO et al., 2006).

O tifo murinho é uma rickettsiose causada pela *Rickettsia typhi*. Essa patologia desencadeia episódios de cefaleia, febre, artralgias e hepatomegalia, apresentando uma taxa de mortalidade de 4% (CIVEN; NGO, 2008). O tifo murinho é facilmente encontrado em ambientes urbanos albergados por ratos. Porém, estudos recentes mostram a presença desse agente em ambientes sub-urbanos onde não há a presença de ratos, devido a isso, assimila-se essa patologia a presença de gatos e cachorros (BLANTON et al., 2016).

O grupo da febre maculosa (GFM), é composto por 16 espécies (*R. akari*, *R. australis*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. slovacica*, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. felis*) (YU; WALKER, 2006). Atualmente a presença dessas espécies é confirmada através de técnicas de PCR que amplificam os fragmentos de *Rickettsia* conservados, como o Omp A, gltA e htrA (WECK et al., 2017).

O grupo ancestral (GA), é composto pelas espécies *R. bellii* e *R. canadensis*. Destas duas, a *R. Bellii* é a mais encontrada, sendo que sua patogenicidade é desconhecida, embora sabe-se que esta não cause febre maculosa. Estudos recentes demonstram a presença dessa espécie em carrapatos originários da cidade de Uberlândia – MG (COELHO et al., 2016).

1.2.1 Febre Maculosa

A febre maculosa (FM) é uma doença infecciosa transmitida por carrapatos, de caráter agudo, causa febre e possui gravidade variável (OLIVEIRA et al., 2018; PAROLA et al., 2013). Apresenta sintomatologia inespecífica, característica que dificulta o diagnóstico clínico-epidemiológico precoce. A erupção cutânea é considerada o único marcador clínico, porém, esta nem sempre está presente, podendo atrasar o tratamento da doença (OLIVEIRA et al., 2016). No Brasil, a ocorrência de outras doenças de natureza epidêmica e de sintomatologia semelhante, como chikungunya, aumentam a dificuldade diagnóstica, uma vez faz-se

necessário considerar a existência de outras doenças febris agudas durante a avaliação dos casos (OLIVEIRA et al., 2018).

Classicamente, casos graves da doença foram associados a *Rickettsia rickettsii*, registrados nas regiões do cerrado e mata atlântica. Essa espécie foi descrita pela primeira vez por Howard Taylor Ricketts, em 1906, que também identificou o carrapato como seu vetor (DEL FIOLE et al., 2010). Em 1900, foi identificado o primeiro caso de riquetsiose no Brasil e posteriormente, em 1932 José Toledo Piza diagnosticou, no município de São Paulo, um paciente com ‘‘tifo exantemático’’, o que atualmente consideramos como um caso de febre maculosa, devido a clínica que o paciente apresentava (MORAES-FILHO, 2017).

A *Rickettsia rickettsii* se mantém na natureza por meio de carrapatos. Esses artrópodes desempenham papel importante, pois além de atuar como vetores, agem como reservatórios, pois a transmissão transovariana pode ocorrer (OGRZEWALSKA et al., 2015).

A *Rickettsia* tem preferência pelas células endoteliais dos pequenos vasos e capilares sanguíneos, por isso, quando ocorre sua inoculação e posterior infecção, lesões que levam a perda de integridade das paredes dos vasos e capilares se instalam, ocasionando o extravasamento sanguíneo para os tecidos. Isso resulta em uma hemorragia intratecidual, febre alta, mialgias e cefaleias. Esse conjunto de sintomas inespecíficos dificultam seu diagnóstico clínico, pois esta pode ser confundida com a febre amarela ou Dengue, por exemplo (GALVAO et al., 2002).

Todo paciente que apresentar febre súbita associada com mialgia e cefaleia, picada de carrapato ou exposição a área que possivelmente possa ser infestada pelos mesmos, exantemas ou manifestações hemorrágicas, pode ser considerado como caso suspeito. Anorexia, vômitos e náuseas podem ou não estar presentes. Caso haja demora no diagnóstico, o paciente poderá evoluir a óbito (KRAWCZAK et al., 2016).

Infelizmente, a taxa de letalidade de infecção por *R. rickettsii* no Brasil é superior a 50% e pode atingir 100% (ANGERAMI et al., 2012; DE LEMOS; ROZENTAL; VILLELA, 2002; OLIVEIRA et al., 2018). Devido a essa taxa e ao desenvolvimento tecnológico, o Governo Federal mantém um banco de dados (Portal SINAN) sobre a notificação da doença. Mesmo não sendo exato, é utilizado como representativo da ocorrência da doença em determinada região do país.

1.3 Dados epidemiológicos

Segundo o site do Ministério da Saúde, em 2017, da Semana Epidemiológica (SE) 1 a 52, foram registrados 185.854 casos prováveis de febre de chikungunya, e em 2016, 277.882. Em 2018, até a SE 23 (31/12/2017 a 09/06/2018), foram registrados 47.791 casos prováveis de febre de chikungunya no país, com uma incidência de 23,0 casos/100 mil habitantes., destes, 30.251 (63,3%). A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de chikungunya (24.307 casos; 50,9%) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Centro-Oeste (12.815 casos; 26,8%), Nordeste (6.484 casos; 13,6%), Norte (3.955 casos; 8,3%) e Sul (230 casos; 0,5%). A análise da taxa de incidência de casos prováveis de febre de chikungunya (número de casos/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, evidencia que a região Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência. Entre as unidades federativas destacam-se Mato Grosso (369,6 casos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (89,3 casos/100 mil hab.) e Minas Gerais (41,0 casos/100 mil hab.), especificamente em Uberlândia, 96 casos foram notificados em 2017.

Até essa mesma SE, foram confirmados laboratorialmente oito óbitos por chikungunya e existem ainda 39 óbitos em investigação que podem ser confirmados ou descartados. No mesmo período de 2017, foram confirmados 156 óbitos e existiam 58 óbitos em investigação.

De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde de consolidação Nº 4 de 03 de outubro de 2017 todo caso de febre maculosa é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde. Deve-se realizar a investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação, avaliando a necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes. A investigação deverá ser encerrada até 60 dias após a notificação. A unidade de saúde notificadora deve utilizar a ficha de notificação/investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN encaminhando-a para ser processada, conforme o fluxo estabelecido pela Secretaria Municipal de Saúde (Sistema de Informação de Agravos e Notificações, 2018).

Segundo o SINAN, o agente etiológico da febre maculosa na região sudeste do Brasil é a *R. rickettsii*, associado ao carrapato *Amblyomma sculptum* (previamente conhecido como *Amblyomma cajennense*, “carrapato estrela”) como vetor competente. O risco de infecção para os humanos tem sido relacionado com fatores exposicionais que favorecem o contato com os carrapatos, principalmente em áreas rurais (atividades de lazer, pescaria, contato com capivaras, atividades de fazenda).

Quanto à sazonalidade, a maioria dos casos se apresenta entre os meses de junho e novembro, coincidindo com a maior abundância dos estágios ninfais do carrapato *Amblyomma sculptum*. A maioria dos casos (>70%) tem sido notificada em adultos do sexo masculino, estando fortemente relacionado a atividades ocupacionais em áreas habitadas por capivaras.

A região Sudeste apresentou o maior número de casos no Brasil nos últimos 10 anos, com 69,96% (911/1302) dos casos e, destes, 425 foram óbitos, representando uma letalidade de 46,65% (425/911) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Casos confirmados de febre maculosa. Região Sudeste e Brasil. 2007-2017*

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Região Sudeste	57	60	79	78	106	92	80	107	125	103	24
Minas Gerais	13	11	10	11	14	7	15	11	16	21	2
Espírito Santo	3	2	0	4	7	5	4	13	5	6	3
Rio de Janeiro	10	8	8	5	13	6	4	22	14	13	1
São Paulo	31	39	61	58	72	74	57	71	90	63	18
Brasil	92	87	122	107	134	138	121	165	158	136	42

Fonte: SINAN – atualizado em 13/09/2017

Tabela 2: Óbitos de febre maculosa. Região Sudeste e Brasil. 2007-2017*

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Região Sudeste	16	22	30	26	45	52	40	65	64	51	14
Minas Gerais	6	5	4	1	5	4	6	4	4	5	0
Espírito Santo	0	0	0	0	1	5	2	0	3	2	2
Rio de Janeiro	2	3	3	1	4	2	1	7	2	7	1
São Paulo	8	14	23	24	35	41	31	54	55	37	11
Brasil	16	22	31	27	45	52	40	65	67	51	15

Fonte: SINAN – atualizado em 13/09/2017.

A ocorrência de epidemias simultâneas dificulta o manejo clínico em razão de peculiaridades da dengue, da febre do chikungunya e febre Mayaro. Diante do exposto, o presente trabalho propõe, implementar o teste de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para detecção dos alfavírus MAYV e CHIKV em larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* coletadas em Uberlândia e Ituiutaba, o que possibilitará fornecer dados importantes, como detectar se há circulação desses alfavírus nesses locais.

2. JUSTIFICATIVA

Patógenos transmitidos por artrópodes causam importantes doenças que acometem humanos, e podem ocasionar grande impacto na saúde pública e econômico na sociedade. Apesar das ações de controle dos vetores transmissores, estes continuam em circulação em todo o país e, por essa razão, a cada ano nos deparamos com maiores números de casos das doenças causadas pela transmissão desses patógenos.

Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Coquilletidia* já foram associados com casos de arboviroses no país. Além dos mosquitos, carrapatos também podem transmitir patógenos e segundo o Portal da Saúde (SUS), a febre maculosa brasileira e outras riquetsioses têm sido registradas em áreas rurais e urbanas do Brasil. Essas doenças causadas por patógenos transmitidos por mosquitos e carrapatos, além dos prejuízos com gastos envolvidos no tratamento dos pacientes e no controle dos vetores, também ocasionam prejuízos econômicos, pois ceifam os trabalhadores da sua área de trabalho no período em que estes estão acometidos com a doença.

Diante do exposto, o presente trabalho propõe aplicar testes moleculares para a detecção dos alfavírus Mayaro e chikungunya em larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* coletadas em Uberlândia, e de *Rickettsias* em carrapatos coletados em um parque público de Uberlândia. Isso irá fornecer ferramentas importantes para se investigar a presença desses patógenos em vetores biológicos e que podem representar risco potencial à comunidade da região.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aplicar testes moleculares para investigar a presença de alfavírus em larvas de mosquitos, e de *Rickettsia* em carrapatos coletados na cidade de Uberlândia, MG.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o teste de RT-PCR para detecção do RNA dos vírus chikungunya e Mayaro;
- Investigar a presença desses alfavírus por RT-PCR em larvas de mosquito de diferentes espécies, principalmente dos gêneros *Aedes* e *Culex*, coletadas em Uberlândia;
- Realizar sequenciamento nucleotídico para identificação dos alfavírus detectado por RT-PCR;
- Realizar a extração de DNA de carrapatos de capivaras coletados em um parque público de Uberlândia, MG;
- Realizar a pesquisa molecular de *Rickettsia* nas amostras de DNA extraídas;
- No caso da detecção do DNA de *Rickettsia*, identificar as espécies da bactéria;
- Identificar a espécie de carrapato na qual a *Rickettsia* foi encontrada.

4. METODOLOGIA

4.1 Área de Estudo

O município de Uberlândia se localiza na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e se destaca na produção econômica, exercendo uma influência considerável na mesorregião a que pertence. A população do município é de aproximadamente 700 mil habitantes, de acordo com estimativa do IBGE em 2009, que está intimamente ligada com as atividades realizadas no município que na área urbana tem os serviços como maior destaque (DOS SANTOS; PETRONZIO, 2011). Essa estimativa populacional coloca a cidade na 2ª posição dentre as 853 do mesmo estado. Sua densidade demográfica é de 146 habitantes por quilômetro quadrado, colocando-o a na posição 46 do mesmo estado.

O estudo foi feito no município de Uberlândia, Minas Gerais. Os carrapatos utilizados no teste de PCR para pesquisa de *Rickettsia* foram coletados no Parque do Sabiá, um local público e muito frequentado por turistas e uberlandenses para a prática de esportes e momentos de lazer. As larvas utilizadas para teste RT-PCR para os vírus chikungunya e Mayaro foram coletadas e disponibilizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia-MG.

De acordo com a Prefeitura de Uberlândia, o Parque do Sabiá possui uma área de 1.850.000 m². Abrange um zoológico com animais em cativeiro, um bosque de área verde e um conjunto hidrográfico. Esse espaço foi criado a fim de gerar lazer para a população uberlandense e visitantes.

4.2 Amostras

4.2.1 Amostras testadas para alfavírus.

Nos experimentos, foram utilizadas larvas dos mosquitos do gênero *Culex* e do gênero *Aedes*, sendo que do último foram analisadas as espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. As amostras foram cedidas pela Escola Técnica de Saúde–ESTES, pertencente a estrutura organizacional da Universidade Federal de Uberlândia, e do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Uberlândia-MG.

As amostras foram coletadas em 2015 por agentes do CCZ local, colocadas em frascos com etanol 70% e, no *Laboratório de Virologia da UFU*, separadas em ‘pools’ com oito larvas por tubo. Em seguida, as larvas foram maceradas com Trizol (Thermo Fisher) e armazenadas a -80 °C (Tabela 3).

O número amostral (n) foi obtido por conveniência, de acordo com a quantidade de larvas encontradas pelos agentes do CCZs em cada local.

Tabela 3: Identificação das amostras testadas para alfavírus.

Identificação da	Amostra	Material genético testado
16		Cultura de células de MAYV
39	189	
379	1068	
461	585	MOSQUITOS
831	389	
869		

4.2.2 Amostras testadas para *Rickettsia*.

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de *Amblyomma dubitatum* e *A. sculptum*, para realização de pesquisa molecular de *Rickettsia*. Extraíu-se o DNA de carrapatos provenientes de 6 capivaras diferentes. Essas amostras pertenciam a carrapatos da espécie *Amblyomma dubitatum* (Tabela 4): Esses carrapatos foram cedidos pelo Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, recebemos os mesmos já identificados em espécies.

Tabela 4: Identificação das amostras extraídas de carrapatos.

Identificação da amostra de DNA	Identificação da capivara	Quantidade de metades de carrapatos	Espécies dos carrapatos
2	C22	3	<i>A. dubitatum</i>
6	C16	1	<i>A. dubitatum</i>
8	C21	1	<i>A. dubitatum</i>

4.3 Extração de ácido nucleico

A extração das moléculas de ácidos nucleicos é uma técnica básica e necessária para a identificação das doenças estudadas. Para que os ácidos nucleicos sejam analisados ou manipulados faz-se necessário isolá-los e separá-los dos demais componentes celulares, isso deve ser feito com atenção para que a integridade, quantidade e pureza do material sejam adequadas, pois esses fatores influenciam no resultado final.

Dependendo do organismo haverá variação no protocolo e no tipo de ácido nucleico extraído. No caso dos carrapatos, o qual procura-se por bactérias do gênero *Rickettsia*, foi extraído o DNA através da técnica adaptada de Chomkzynski (1993) e descrita por Sangioni et al. (2005). Nos mosquitos, o qual procura-se por alfavírus, foi extraído RNA utilizando o reagente Trizol, pois este realiza a lise celular.

4.3.1 – Extração de RNA'

As amostras já haviam sido armazenadas em Trizol, então, adicionamos 2,5µl de glicogênio e 100µl de clorofórmio. Feito isso, agitamos a amostra em vortex, incubamos por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugamos a 12.000xg por 15 minutos à 4°C. Ao final dessas etapas obtivemos um tubo tipo eppendorf com duas fases, transferimos a fase superior e aquosa para um novo tubo. Adicionamos a esse tubo 300µl de isopropanol, agitamos por inversão e incubamos durante 10 minutos à temperatura ambiente, com isso, precipitamos o RNA. Centrifugamos novamente à 12.000xg por 10 minutos à 4°C. Após esse processo obtivemos o *pellet*, que ficou aderido a parte inferior do tubo, o sobrenadante foi desprezado e esse *pellet* lavado com 500µl de etanol 75% e centrifugado a 7.500xg por 5 minutos à 4°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi deixado aberto no interior do fluxo laminar, para que o *pellet* secasse. Por fim, o RNA foi dissolvido com 20µl de água tratada com Dietilpirocarbonato.

4.3.2 – Extração de DNA

Os carrapatos foram colocados dentro de um microtubo com 120µl tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) cortados com o auxílio de um bisturi, após isso adicionamos mais 30 µl de TE, completando um total de 150µl de tampão, este foi adicionado no início pois facilita o corte do carrapato. Essa mistura foi macerada com o auxílio de um pistilo, seguida de agitação em vortex por 15 segundos. Ao final da agitação, 450µl do tampão GT foram adicionados. Com isto, incubou-se a amostra por cerca de 10 minutos, com agitação feita a cada 2,5 minutos. Após o intervalo, adicionou-se 100µl de clorofórmio, e a mistura passou por mais uma agitação no vortex por cerca de 15 segundos, sendo que logo em seguida o tubo foi centrifugado a 11000 g por 5 minutos. No final do processo de centrifugação, encontramos duas fases no microtubo, a fase que contém o DNA foi transferida para outro microtubo de 1,5ml, sendo que o total transferido foi cerca de 400µl, a partir desse momento continuou-se o protocolo para extração de DNA.

Ao tubo contendo a fase com DNA foram adicionados 600µl de isopropanol, agitado em vortex e centrifugado a 17000g por 15 minutos, à uma temperatura de 4°C. Após esses procedimentos, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 800µl de álcool etílico 70% e o tubo foi centrifugado por 5 minutos na mesma rotação e temperatura que anteriormente, só que a 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixando o *pellet*, formado no interior do tubo, secar a temperatura ambiente. Ao final desse processo, o DNA foi ressuspensão com 50µl de TE modificado, estando pronto para o uso de técnicas de PCR. Todo o processo foi realizado no interior da capela do fluxo laminar.

4.4 PCR e RT-PCR

Os *primers* utilizados nesse estudo estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Pares de Primers utilizados nas reações do presente estudo.

<i>Primers</i>	Especificidad da PCR	Sequência dos Primers (5'→3')	Amplicom (pb)	Referência
Alfa614MAYVFR	Mayaro	GAC ACA ACC CCG TTC ATG T	347	Grupo de estudo
Alfa961modCRV	Alfavírus	CCT GGG CTC ATC GTT AT		
Alfa614CHIKVFR	chikungunya	TAC ACA ACC CCG TTC ATG T	347	Grupo de estudo
Alfa961modC	Alfavírus	CCT GGG CTC ATC GTT AT		
Alfa697MAYV	Mayaro	CAA GAA CAT AGG ATT ATG TTC	264	Grupo de estudo
Alfa961modC	Alfavírus	CCT GGG CTC ATC GTT AT		
Alfa697CHIKVRV	chikungunya	TAA GAA CAT AGG ATT ATG TTC	264	Grupo de estudo
Alfa961modC	Alfavírus	CCT GGG CTC ATC GTT AT		
ACT-2F	Actina	ATGGTCCGGYATGGGNCAGAAG-GACTC	683	Staley et al., 2010
ACT-8R		GATTCCATACCCAGGAAGGADGG		
16S-F	Carrapato	CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T	460	Mangold et al., 1998
16S-R		GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T		
120-M59FW	<i>ompB</i>	CCG CAG GGT TGG TAA CTG C	856	Roux e Raoult, 2000
120-807RV		CCT TTT AG ATTA CCG CCT AA		
OmpB587FW	<i>ompB</i>	GGT AAA ACT CTT ACT ATA ACA GG	506	Jonny Yokosawa
120-807RV		CCT TTT AG ATTA CCG CCT AA		

Nessas duas doenças estudadas encontramos duas grandes diferenças que nos fizeram usar protocolos distintos para cada uma delas. Para detecção de *Rickettsia*, extraímos DNA por isso seguimos o protocolo de PCR. Para o diagnóstico de alfavírus, extraímos RNA, pois esse é um vírus de RNAss fita positiva, devido a isso tivemos que empregar o protocolo de RT-PCR.

A técnica de RT-PCR, nada mais é do que uma PCR que é antecedida por uma transcrição reversa. Para isso, utiliza-se de uma enzima especial, a transcriptase reversa, que

consegue produzir uma molécula de DNA complementar (cDNA) a partir de uma molécula de RNA. Posterior a essa etapa, segue-se com o protocolo de PCR convencional, onde no final do processo haverá milhões de cópias de cDNA que serão avaliadas em uma eletroforese.

4.4.1 RT-PCR para detecção de RNA de alfavírus

Para o diagnóstico dessa doença, utilizamos de duas reações diferentes, uma para a detecção do gene que codifica para a proteína actina de mosquitos, para avaliar a qualidade da extração do material genético do vetor, e outra para a detecção dos alfavírus.

4.4.1.1 RT-PCR para segmento do gene que codifica actina de mosquitos

Como o material genético extraído é o RNA, começamos com a reação de transcrição reversa, para isso utilizamos os seguintes reagentes (Tabela 6).

Tabela 6: Reagentes para a transcrição reversa para actina de mosquito.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Água tratada com Dietilpirocarbonato	4,0 µl
Primer ACT-8R 10 µM	2,0 µl
Primer Alfa961modC 10 µM	2,0 µl
dNTPs 10mM	2,0 µl
RNA	5,0 µl
Total	15,0 µl

O tubo com os reagentes foi agitado e centrifugado e o mesmo foi colocado no termociclador a 95°C por 3 minutos e no gelo por 1 minuto. Posterior a isso, foi adicionado 4,0µl de tampão 5x Bioron (Ludwigshafen, Germany) e 1,0µl da transcriptase reversa (Bioron). O tubo foi colocado no termociclador nas seguintes condições: 48°C por 60 minutos e 70°C por 10 minutos.

Com o cDNA formado, podemos dar início ao protocolo de PCR. Adicionamos os seguintes reagentes em um tubo de 1,5ml (Tabela 7):

Tabela 7: Reagentes para a PCR para actina de mosquito.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Fermentas)	2,0 µl
Primer Act-8R 10 µM	2,0 µl
Primer Act-2F 10 µM	2,0 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Taq DNA polimerase 5U/µl(Fermentas)	0,25 µl
MgCl ₂ 50mM	0,6 µl
Água para Biologia Molecular	10,75 µl
Total	18,0 µl

O volume final foi distribuído nos tubos para PCR e acrescentado 2µl do cDNA. No termociclador, as amostras passaram por um programa que consistia em: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com 72°C durante 7 minutos. O tamanho do *amplicon* esperado era de 683pb.

4.4.1.2 RT-PCR para alfavírus;

O protocolo de transcrição reversa, foi semelhante ao utilizado para a PCR do gene que codifica para a proteína actina, apenas com uma mudança, retiramos o *primer* Act-8R e por consequência corrigimos o volume com a água para biologia molecular.

Com o cDNA formado, podemos seguir com o protocolo da PCR. Para o diagnóstico de alfavírus utilizamos da ferramenta de semi-nested. Para a primeira reação em cadeia da polimerase, adicionamos os seguintes reagentes para compor o MIX (Tabela 8):

Tabela 8: Reagentes para a 1ªPCR para alfavírus.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Fermentas)	2,0 µl
Primer Alfa614MAYVFR 10 µM	2,0 µl
Primer Alfa961modC 10 µM	2,0 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Taq DNA polimerase 5U/µl(Fermentas)	0,25 µl
MgCl ₂ 50mM	0,6 µl
Água para Biologia Molecular	10,75 µl
Total	18,0 µl

A quantidade de 18µl do mix foi distribuída nos tubos para PCR e a eles foi adicionado 2µl do cDNA obtido pela reação de transcrição reversa. As amostras foram colocadas no

termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C a 30 segundos, 48°C a 30 segundos e 72°C a 1 minuto; e para finalizar 72°C a 7 minutos.

Anteriormente a estabelecermos esse protocolo, tentamos um experimento com os mesmos reagentes da tabela acima, mas com a adição do primer Alfa614CHIKVFR 10µM, porém verificamos que este surtia efeitos negativos na reação, os quais serão descritos nos resultados.

Com o produto da 1ªPCR formado, podemos dar continuidade ao processo e seguir para a 2ªPCR, a qual utilizou os seguintes reagentes para o MIX (Tabela 9).

Tabela 9: Reagentes para a 2ªPCR para alfavírus.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Fermentas)	2,0 µl
Primer Alfa697MAYVFR 10 µM	2,0 µl
Primer Alfa961modC 10 µM	2,0 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Taq DNA polimerase 5U/µl(Fermentas)	0,2 µl
MgCl ₂ 50mM	0,6 µl
Água para Biologia Molecular	11,8 µl
Total	19,0 µl

Com os 19µl do Mix distribuídos adicionamos 1µl do produto da 1ªPCR. As amostras foram colocadas no termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C a 30 segundos, 50°C a 30 segundos e 72°C a 1 minuto; e para finalizar 72°C a 7 minutos.

4.4.2 PCR para detecção de DNA de *Rickettsia*

Para esse teste, utilizamos de dois protocolos diferentes, um de PCR e outro de SEMI NESTED PCR, os quais serão descritos e detalhados nos itens a seguir.

4.4.2.1 PCR para segmento do gene que codifica o rRNA 16S de carrapatos;

Esta PCR teve como objetivo avaliar a qualidade da amostra de DNA obtida do carrapato. Em um tudo de 1,5ml, foram adicionados os reagentes que compõem o MIX, citados abaixo (Tabela 10)(MANGOLD; BARGUES; MAS-COMA, 1998).

Tabela 10: Reagentes utilizados para amplificação do gene que codifica o Rrna 16S.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Platinum)	2,0 µl
Primer 16S-F 10 µM	2,0 µl
Primer 16S-R 10 µM	2,0 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Taq DNA polimerase 5U/ µl (Platinum)	0,2 µl
MgCl ₂ mM (Platinum)	0,6 µl
Água para Biologia Molecular	11,8 µl
Total	19,0 µl

Após esse processo, os 19µl foram distribuídos em tubos para PCR, e a cada um destes fora adicionado 1µl da amostra de DNA a ser testada, para o controle negativo utilizou-se H₂O para biologia molecular e para o controle positivo foi utilizado DNA extraído de um carrapato previamente testado.

A próxima fase foi realizada mediante incubação em um termociclador. Esta consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 95°C, por 10 minutos, seguida de 35 ciclos consecutivos de 40 segundos de desnaturação a 95°C, hibridização dos *primers* a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de 7 minutos de extensão final a 72°C.

4.4.2.2 PCR para segmento do gene *ompB*

A PCR para o gene específico *ompB* de riquétsias do GFM teve como objetivo avaliar a presença das mesmas na amostra de DNA obtidas do carrapato. O protocolo utilizado para isso consiste em uma SEMI NESTED PCR. Em um tudo de 1,5ml, foram adicionados os reagentes que compõem o MIX da primeira PCR, citados abaixo (Tabela 11)(ROUX; RAOULT, 1995):

Tabela 11: Reagentes utilizados para segunda PCR, para *ompB*.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Platinum)	2,5 µl
Primer 120-M59 10 µM	2,5 µl
Primer 120-807 10 µM	2,5 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Taq DNA polimerase 5U/ µl(Platinum)	0,2 µl
MgCl ₂ 25mM (Platinum)	1,5 µl
Água para Biologia Molecular	13,3 µl
Total	24,0 µl

Os 24µl foram distribuídos em tubos para PCR, e a cada um destes fora adicionado 1µl da amostra de DNA a ser testada, para o controle negativo utilizou-se H₂O e para o controle positivo foi utilizado DNA extraído de uma cultura de *Rickettsia parkeri*, previamente testada.

Utilizamos as seguintes condições no ciclo do termociclador: Desnaturação inicial do DNA a 95°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos consecutivos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, hibridização dos *primers* a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos, seguidos de 7 minutos de extensão final a 72°C.

Posteriormente a realização da primeira PCR, iniciamos a segunda, para isso adicionamos em um tubo de 1,5ml os seguintes reagentes que compõem o MIX (Tabela 12):

Tabela 12: Reagentes utilizados para segunda PCR, para *ompB*.

Reagentes	Quantidade (Para uma amostra)
Tampão para PCR 10X (Platinum)	2,5 µl
Primer OMPB587FW 10 µM	0,75 µl
Primer 120-807 10 µM	0,75 µl
dNTPs 10mM	0,5 µl
Taq DNA polimerase 5U/ µl(Platinum)	0,2 µl
MgCl ₂ 25mM (Platinum)	0,75 µl
Água para Biologia Molecular	18,55 µl
Total	24,0 µl

Os 24µl do MIX foram distribuídos em tubos para PCR, e a cada um destes fora adicionado 1µl da diluição do produto da primeira PCR, esses foram diluídos na proporção de 1\10, utilizando como diluente H₂O para Biologia Molecular, tivemos que adicionar esse processo para melhor aproveitamento da NESTED.

As condições do termociclador foram as mesmas da primeira PCR. O uso da técnica de SEMI NESTED permite gerarmos um produto de PCR de menor tamanho, o que gera um resultado melhor do sequenciamento.

4.5 Eletroforese

Seguimos o mesmo protocolo de eletroforese para ambas as doenças estudadas.

A corrida foi feita a 100V por 30 minutos em um gel de agarose de 1%, imerso sob tampão TE, com 1,5µl de tampão de corrida 6x e 5µl de amostra. O corante intercalante utilizado foi o RedView e sua quantidade está relacionada ao volume do gel. A leitura do gel

foi feita em um transiluminador e as imagens foram obtidas por uma câmera e um fotodocumentador.

4.6 Sequenciamento nucleotídico.

4.6.1 Sequenciamento das amostras testadas para alfavírus.

Para podermos encaminhar a amostra para o sequenciamento, tivemos que aumentar o volume do produto da segunda PCR, para as amostras com suspeitas de positividade. Após esse processo, purificamos as amostras com o kit da EasyGen-EasyPrep PCR Clean.

Esse kit apresenta um protocolo que consiste em transferir de 10µl a 100µl do produto de PCR para um novo tubo e adicionar 5x do volume de tampão de ligação. Sendo assim, transferimos 60µl do produto de PCR e adicionamos 300µl do tampão, levamos a amostra ao vortex. Em um tubo de coleta, colocamos a coluna de filtração e transferimos essa mistura para esta. O complexo (tubo de 2,0µl e coluna de filtração) foi centrifugado por 1 minuto a 10.000xg e o filtrado foi descartado. Adicionamos 750µl de tampão de lavagem com etanol a coluna, centrifugamos novamente na mesma condição e o filtrado foi descartado e uma última centrifugação foi realizada. A coluna foi colocada em um tubo de eluição e a esta foi adicionado 40µl de tampão de eluição. Por fim, esse tubo foi centrifugado por 1 minuto e o filtrado final obtido é o produto de PCR purificado.

Foi realizado uma eletroforese em gel de agarose, nas mesmas condições citadas no item 4.5, com esse produto purificado, para averiguar a qualidade do processo.

Por exigência da empresa, diluímos os *primers*. Anteriormente esses reagentes estavam a 10µM, mas para o sequenciamento deveriam estar a 1µM. Para a diluição usamos Tris pH 8.0 com água tratada com Dietilpirocarbonato.

Em um tubo colocamos 4,5µl do primer Alfa697MAYVFR e 1,5µl do produto de PCR, e em outro tubo colocamos 4,5µl do primer Alfa961modC e 1,5µl do produto de PCR. Deixamos esses tubos secarem no termociclador à 60°C e enviamos para análise da empresa.

4.6.2 Sequenciamento das amostras testadas para *Rickettsia*.

Para realizarmos o sequenciamento, tivemos que aumentar a concentração do produto da segunda PCR, para as amostras com suspeitas de positividade. Após esse processo, purificamos as amostras com o kit da Invisorb Fragment CleanUP.

Em um tubo de 2,0µl colocou-se os produtos de PCR, que deram aproximadamente 70µl e adicionou-se 500µl do Binding Buffer. Utilizamos o vortex para misturar o reagente com o produto de PCR e após esse processo, essa mistura foi transferida para o filtro e centrifugada durante 1 minuto à 12.000rpm. O filtrado foi descartado e o filtro com o tubo foram centrifugados durante mais 2 minutos, na mesma rotação.

O filtro foi transferido para um tubo de 1,5µl. Adicionamos 10µl do tampão de eluição no centro do filtro, incubamos durante 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugamos por 1 minuto à 10.000rpm.

Ao final desse processo obtivemos as amostras purificadas e prontas para serem sequenciadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico de alfavírus

De acordo com o site do Ministério da Saúde, em 2017, da semana epidemiológica (SE) 1 a 52, foram registrados 185.854 casos prováveis de chikungunya e em 2016, 277.882 casos. Em Uberlândia, área do estudo, 96 casos foram notificados. Como não é realizado exame específico para o alfavírus Mayaro, desses casos notificados, porém não confirmados, alguns podem ser de MAYV, ou de outra arbovírose, já que os sintomas são semelhantes.

Um estudo realizado em 2008, na região de Belém-PA, avaliou, através da imunofluorescência, 106 amostras de pacientes durante um surto de Dengue. Dentre essas amostras 36 apresentaram positividade para MAYV, sendo 27% de regiões urbanas. Esse dado é interessante, pois o principal vetor de Mayaro descrito na literatura é o *Haemagogus*, mosquito que possui hábitos rurais (AZEVEDO et al., 2009). Entre janeiro e maio de 2012, foi realizado um estudo de caráter epidemiológico, utilizando de ferramentas moleculares, na região do estado do Mato Grosso. Este demonstrou que de 15 pacientes positivos para MAYV, 12 também

apresentavam positividade para Dengue tipo-4, ou seja 80%, isso demonstra uma co-infecção e uma possível relação entre esses vírus (ZUCHI et al., 2014). Em Cuiabá, 610 mosquitos (fêmeas) foram testados através da técnica de RT-PCR. O estudo demonstrou que 2.6% desses vetores estavam infectados com alfavírus e 0,1% apresentou co-infecção entre os vírus Mayaro e Dengue tipo-4 (SERRA et al., 2016).

Esses estudos demonstraram que o caráter da febre Mayaro tem mudado ao longo dos anos, pois atualmente atinge regiões peri-urbanas. Também foi demonstrado que há relatos de co-infecções, principalmente com o flavivírus da Dengue tipo-4, o que é preocupante, pois as pessoas acometidas por ambos os vírus demonstraram uma sintomatologia mais severa. Esses resultados deixaram evidente que há uma grande necessidade de mais estudos sobre o tema, em todas as regiões brasileiras, pois como o diagnóstico da febre Mayaro é difícil e a epidemiologia dessa doença pode estar sendo prejudicada e negligenciada.

Feita a extração do RNA de larvas e a RT-PCR para a amplificação do gene que codifica para a proteína Actina de mosquitos, verificou-se, através da eletroforese em gel de agarose que a amostra extraída da cultura de células C636 previamente infectada com MAYV, testada para o controle positivo (amostra 8), apresentou positividade (Figura 1).

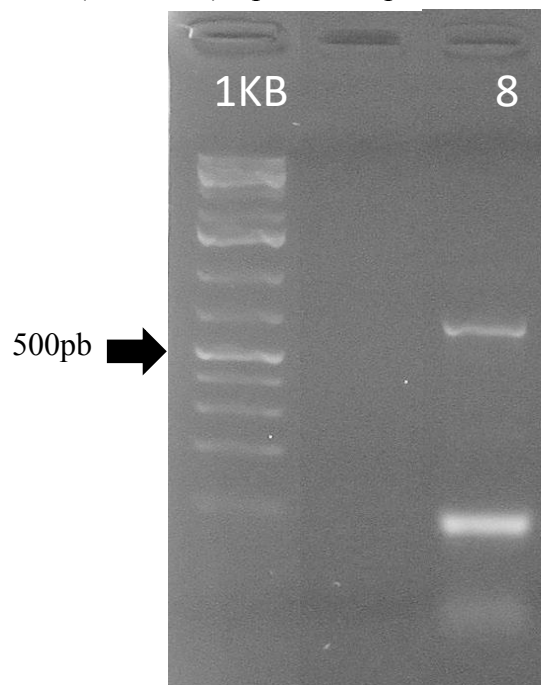


Figura 1: Eletroforese dos produtos de PCR para segmento do gene que codifica para Actina de mosquito (683pb), realizada com amostras extraídas de cultura de células C/636 inoculadas com o vírus Mayaro (amostra 8) e padrão de peso molecular 1kb (PPM).

Um estudo realizado em 2010, sugere que o par de *primers* usado para a RT-PCR de actina, pode ser utilizado como controle interno para testar a qualidade do RNA extraído de mosquitos vetores, esses primers são capazes de amplificar regiões conservadas dos genes pertencentes a 30 espécies e 8 gêneros de invertebrados, dentre eles o *Aedes* e *Culex* (STALEY et al., 2010).

Visto que o material extraído era de boa qualidade, seguimos com a RT-PCR para os alfavírus MAYV e CHIKV e posterior eletroforese em gel de agarose. A amostra 16 não apresentou banda do tamanho esperado (264pb) (Figura 2). Ao adicionar o primer Alfa614CHIKVFR no MIX da primeira PCR (amostra 17), não obtivemos resultados satisfatórios, adicionamos este mesmo *primer* no MIX da segunda PCR, no volume de 2µl para a amostra 17 e 0,75µl para a amostra 18, mas observamos que essa adição era prejudicial para a reação (Figura 2).

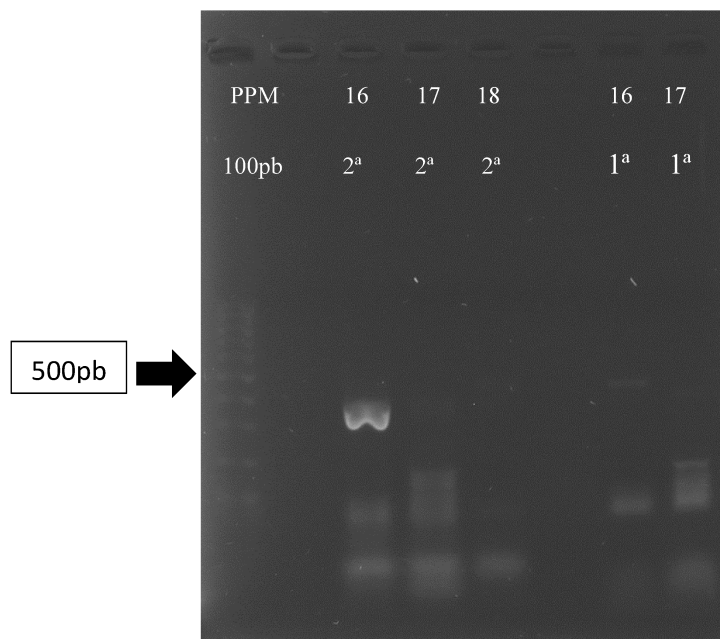


Figura 2: Eletroforese do produto de PCR para MAYV, realizada com amostras extraídas de cultura de células C6/36 inoculadas com o vírus Mayaro e padrão de peso molecular 100pb (PPM).

Devido a esse resultado, decidimos excluir os *primers* para chikungunya da reação e permanecer apenas com os de Mayaro.

Após estabelecermos o protocolo para a RT-PCR para alfavírus, extraímos o RNA de larvas de mosquitos, fizemos a transcrição reversa, primeira e segunda PCR e realizamos

eletroforese em um no gel de agarose, nas condições já descritas. Com isso encontramos algumas amostras com suspeita de positividade (Figura 3).

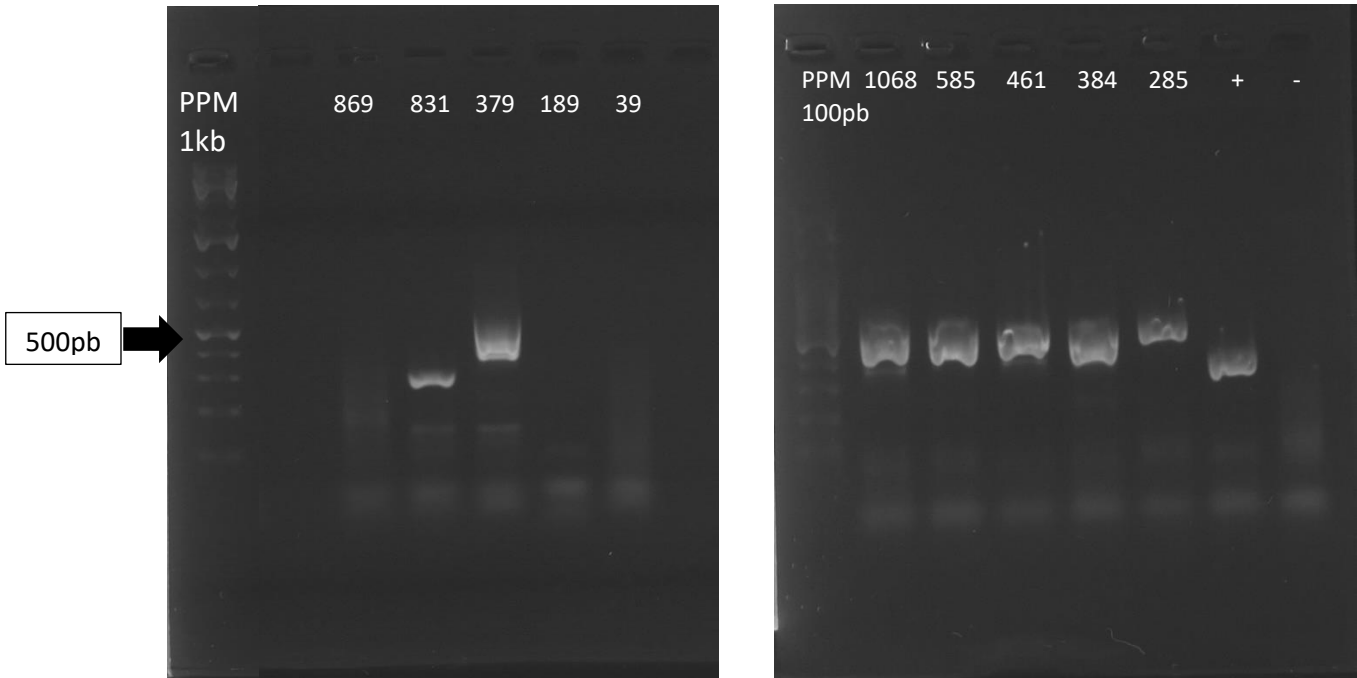


Figura 3: Eletroforese do produto de PCR para MAYV, realizada com amostras extraídas de larvas de mosquitos. Controle positivo (+), negativo (-) e padrão de peso molecular 100pb (PPM).

Ao final da segunda PCR, as amostras consideradas positivas deveriam apresentar um *amplicom* de 264 pb, mas notamos que ao testarmos as amostras de larvas, uma grande quantidade apresentava *amplicom* de aproximadamente 400pb, então decidimos purificar a amostra 461 e sequencia-la. Analisando o resultado do sequenciamento, não identificamos nenhuma sequência biológica primária que fosse relevante para o estudo. Suspeitamos que a concentração e/ou a pureza do material genético enviado para o sequenciamento não foram favoráveis para um bom resultado.

Suspeita-se que a amostra 831 seja positiva, mas para a confirmação desse resultado, devemos sequencia-la.

Das 10 amostras extraídas de mosquitos e testadas, 1 (amostra 831) apresentou *amplicom* do tamanho desejado, mas para a confirmação da positividade, faz-se necessário o

sequenciamento. Caso esse seja compatível com o vírus Mayaro, teríamos 10% de amostras positivas. Esse número já era esperado, visto que os testes são realizados em larvas e a positividade das amostras dependem exclusivamente da transmissão transovariana, o que não ocorre com muita frequência. Possivelmente essa porcentagem seria maior se conseguíssemos testar os mosquitos em sua fase adulta, mas encararíamos outra variável, somente os mosquitos fêmeas fazem o repasto sanguíneo, então para obtermos dados epidemiológicos próximos a realidade, deveríamos fazer a diferenciação entre o sexo dos vetores.

Ao realizarmos os experimentos com as amostras extraídas de culturas de células com o vírus Mayaro, percebemos que a inclusão dos *primers* de chikungunya surtia efeito indesejado, pois sua adição, de alguma forma, inibia a replicação do MAYV. Por isso, definimos que não obtivemos sucesso com a combinação dos *primers* de Mayaro e chikungunya. Em contrapartida, a combinação de *primers* e o desenvolvimento do protocolo para o diagnóstico de Mayaro em larvas de mosquitos foi satisfatória quando testadas em amostras extraídas de culturas de células. Quando essa combinação foi testada em amostras extraídas de larvas de mosquitos, percebemos o aparecimento de um *amplicom*, cujo o tamanho não era o esperado, em quase todas as amostras. Tentamos identificar a qual genoma pertencia essa amplificação inespecífica, mas não obtivemos sucesso no sequenciamento, provavelmente devido a impureza do material, concentração insuficiente ou outro fator inesperado

5.2 Diagnóstico de *Rickettsia*

De acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravo de Notificação (SINAN), a cidade de Uberlândia, onde o presente estudo foi realizado, é uma região não endêmica para a Febre Maculosa Brasileira. Porém, em 2011, Souza e colaboradores conduziram um estudo com pesquisa de anticorpos de *Rickettsia* spp, em cães e equinos da cidade de Uberlândia. Essa pesquisa demonstrou evidências de *Rickettsia parkeri*, *R. belli*, *R. rickettsii* e *R. rhipicephali* no município estudado. Em 2013, Coelho identificou a presença das mesmas espécies, também no mesmo município. Esses resultados demonstram que há uma grande necessidade de mais estudos sobre o tema abordado.

Feita a extração do DNA e a PCR para a amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S, objetivando averiguar o sucesso da extração e a qualidade do DNA obtido, verificou-se, através da eletroforese que todas as amostras eram positivas (Figura4).

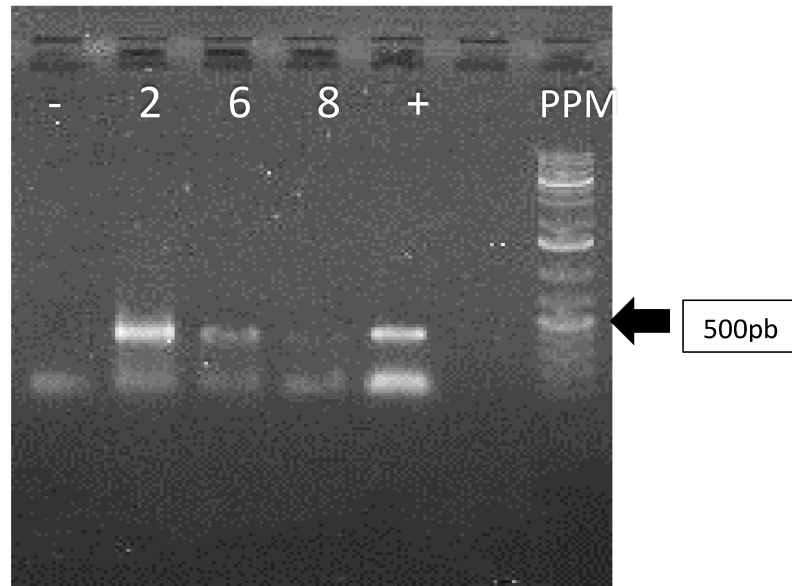


Figura 4: Eletroforese dos produtos de PCR para segmento do gene que codifica para o rRNA 16S (460pb), realizada com amostras de DNA 2, 6 e 8 de carrapatos, coletados no Parque do Sabiá. Controles negativos (-) e positivos (+) e padrão de peso molecular (PPM).

Segundo Mangold; Bargues; Mas-Coma (1998), as sequências deste gene de DNA mitocondrial funcionam como bons marcadores genéticos de carrapatos da família *Ixodidae*, como é o caso do *A. dubitatum*. Assim, a extração de DNA dos carrapatos foi bem sucedida e isso foi importante para construção de toda a base da pesquisa.

Em seguida, com essas amostras de DNA, realizou-se a primeira (Figura 5) e segunda PCR (Figura 6) para *ompB*. Das 3 amostras extraídas de carrapatos *A. dubitatum*, 2 (DNA 2 e DNA 6) apresentaram ampliações com *amplicom* de tamanho esperado. Os carrapatos dos quais as amostras apresentaram ampliações foram coletados das capivaras 22 e 16, respectivamente. Não há registros de *A. dubitatum* transmitindo bactérias do gênero *Rickettsia* para humanos (QUEIROGAS, 2010).

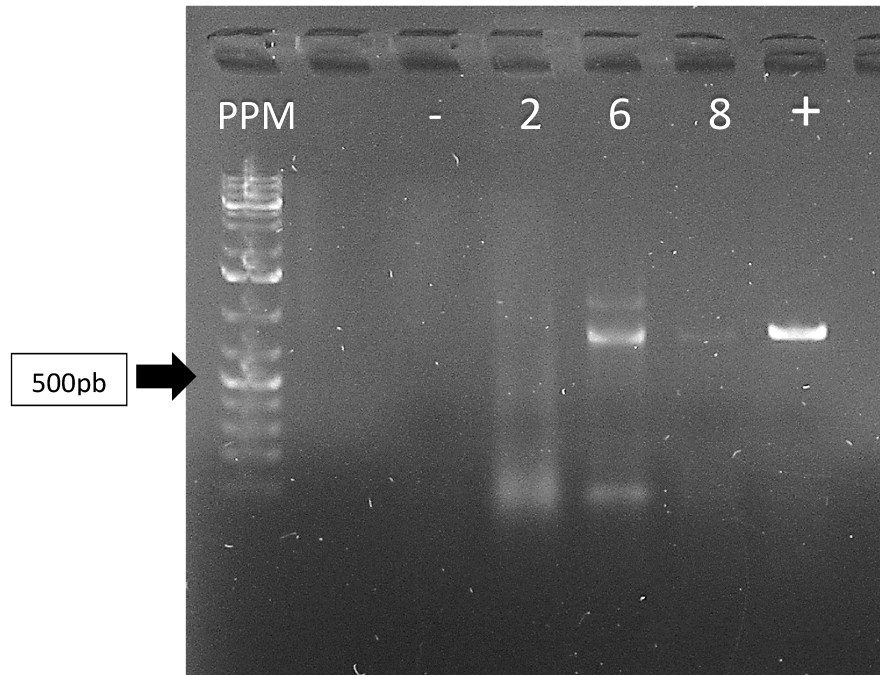


Figura 5: Eletroforese dos produtos da Primeira PCR para um segmento do gene *ompB* (856pb), realizada com amostras de DNA 2, 6 e 8 de carrapatos, coletados no Parque do Sabiá. Controles negativos (-) e positivos (+) e padrão de peso molecular (PPM).

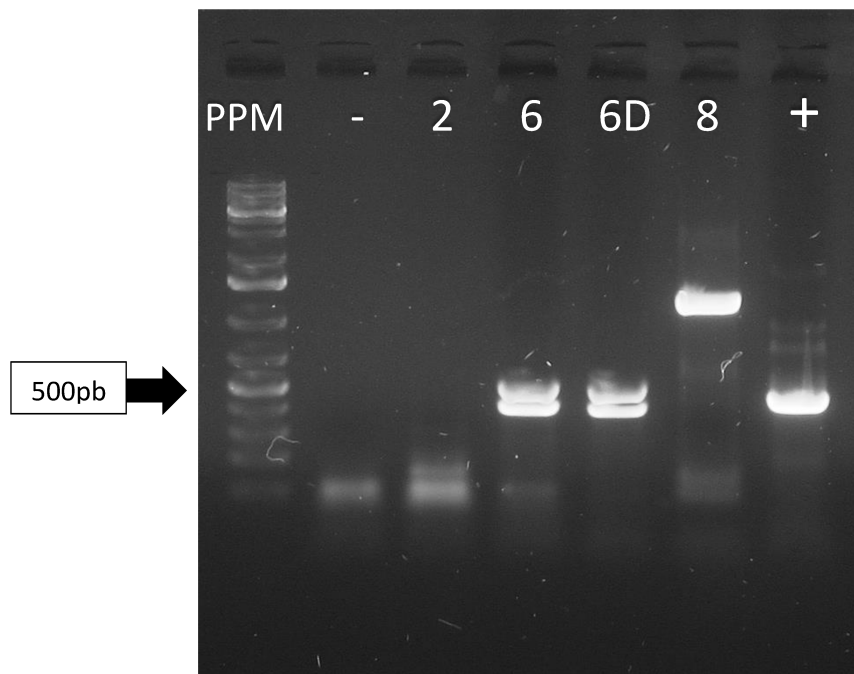


Figura 6: Eletroforese dos produtos da Segunda PCR para um segmento do gene *ompB* (506pb), realizada com amostras de DNA 2, 6 e 8 de carrapatos, coletados no Parque do Sabiá. Amostra do DNA6 diluída 1\10 (6D). Controles negativos (-) e positivos (+) e padrão de peso molecular (PPM).

Esses mesmos carrapatos demonstraram positividade para o gene *gltA*, que codifica para a enzima citrato sintase (CS2), presente em *Rickettsia* spp e após alguns experimentos observou-se que essas mesmas amostras mostraram amplificação para o segmento do gene *gltA* específico de *R. belli*, cuja a patogenicidade humana é desconhecida, sendo esses resultados demonstrados por Silva em 2017. Isso sugere uma possível dupla contaminação dos carrapatos testados. Isso não seria inédito, visto que já foi descrito que pode haver co-infecções de Rickettsias, principalmente em carrapatos do gênero estudado.

Nos experimentos para Rickettsioses, observamos que das 3 amostras testadas 1 (amostra 6) apresentou *amplicom* de tamanho esperado, porém essa apresentou banda dupla, fato que dificulta o sequenciamento devido a sua proximidade, mas não o impossibilita, por isso iremos sequencia-la. Também notamos no gel da segunda PCR para *ompB*, o aparecimento de uma banda inespecífica na amostra 8, com *amplicom* de tamanho compatível a primeira PCR, fato esse que não exclui a positividade dessa amostra, visto que na eletroforese da primeira PCR, esta aparentava ser positiva. Já a amostra 2, no gel da primeira PCR para *ompB*, apresentou um arraste, o que poderia ser devido a grande concentração de material genético, então caberia a sua diluição e posterior realização de uma nova PCR.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que os *Primers* desenhados para o diagnóstico de alfavírus podem ter funcionalidade quando usados para o vírus Mayaro. Devido a positividade de uma amostra, faz-se necessário a continuidade desse monitoramento, pois a circulação desse vírus ainda não foi descrita em Uberlândia.

De acordo com as análises realizadas, os resultados demonstram uma possível circulação de *rickettsia* pertencente ao grupo da Febre Maculosa, na cidade de Uberlândia. Devido a presença de carrapatos e de capivaras em um local com grande movimento de pessoas, há a necessidade da continuidade desse monitoramento.

Ainda há muitos experimentos a se fazer com as amostras de mosquito e carrapatos, mas devido ao tempo de estudo, a complexidade do tema e as intercorrências enfrentadas ao longo do período, não foi possível finalizar todos os testes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro virus infection in amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.

ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **Am J Trop Med Hyg**, v. 6, n. 6, p. 1012-6, Nov 1957.

ANGERAMI, R. N. et al. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 3, n. 5-6, p. 346-8, Dec 2012.

AZEVEDO, R. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. 1830-2, Nov 2009.

BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitol Res**, v. 114, n. 8, p. 2801-5, Aug 2015.

BENELLI, G.; DUGGAN, M. F. Management of arthropod vector data - Social and ecological dynamics facing the One Health perspective. **Acta Trop**, v. 182, p. 80-91, Jun 2018.

BICHAUD, L. et al. Arthropods as a source of new RNA viruses. **Microb Pathog**, v. 77, p. 136-41, Dec 2014.

BLANTON, L. S. et al. Opossums and Cat Fleas: New Insights in the Ecology of Murine Typhus in Galveston, Texas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 457-61, Aug 3 2016.

CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Para, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. **Am J Trop Med Hyg**, v. 6, n. 6, p. 1017-23, Nov 1957.

CIVEN, R.; NGO, V. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 6, p. 913-8, Mar 15 2008.

COELHO, M. G. et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, n. 3, p. 275-82, Mar 31 2016.

DE LEMOS, E. R.; ROZENTAL, T.; VILLELA, C. L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 5, p. 523-5, Sep-Oct 2002.

ERGULER, K. et al. A large-scale stochastic spatiotemporal model for Aedes albopictus-borne chikungunya epidemiology. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174293, 2017.

FAILLOUX, A. B. et al. Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network. **Curr Trop Med Rep**, v. 4, n. 1, p. 27-39, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-9, Mar-Apr 2007.

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 6, p. 677-83, Nov-Dec 2014.

FORATTINI, O. P. [Evolutionary epidemiological thought on infections]. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 3, p. 257-62, Jun 2002.

FORRESTER, N. L.; COFFEY, L. L.; WEAVER, S. C. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3991-4004, Oct 23 2014.

GALVAO, M. A. et al. Revisiting brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 255-6, Oct 2006.

GALVAO, M. A. et al. [Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 6, p. 1593-7, Nov-Dec 2002.

HAWLEY, W. A. et al. Aedes albopictus in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. **Science**, v. 236, n. 4805, p. 1114-6, May 29 1987.

HONORIO, N. A. et al. Temporal distribution of Aedes aegypti in different districts of Rio de Janeiro, Brazil, measured by two types of traps. **J Med Entomol**, v. 46, n. 5, p. 1001-14, Sep 2009.

KRAWCZAK, F. S. et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Exp Appl Acarol**, v. 70, n. 2, p. 219-29, Oct 2016.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 608-37, Oct 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsia bellii and Rickettsia amblyommii in Amblyomma ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **J Med Entomol**, v. 41, n. 6, p. 1073-81, Nov 2004.

LEDNICKY, J. et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 11, p. 2000-2002, Nov 2016.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, v. 84, n. 6, p. 478-84, Jun 1998.

MEZENCIO, J. M. et al. Ultrastructural study of Mayaro virus replication in BHK-21 cells. **Arch Virol**, v. 114, n. 3-4, p. 229-35, 1990.

MOORE, C. G.; MITCHELL, C. J. Aedes albopictus in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 329-34, Jul-Sep 1997.

MOURAO, M. P. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 12, n. 1, p. 42-6, Jan 2012.

OGRZEWALSKA, M. et al. Bacteria of the genus Rickettsia in ticks (Acari: Ixodidae) collected from birds in Costa Rica. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 6, n. 4, p. 478-82, Jun 2015.

OLIVEIRA, S. V. et al. A fatal case of Brazilian spotted fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 5, p. 653-655, Sep-Oct 2016.

OLIVEIRA, S. V. et al. Fatal case of spotted fever in a patient from Northeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 60, p. e21, 2018.

PAROLA, P. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 657-702, Oct 2013.

PFAFFLE, M. et al. The ecology of tick-borne diseases. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 12-13, p. 1059-77, Nov 2013.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840-6, Dec 1 2007.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. **Res Microbiol**, v. 146, n. 5, p. 385-96, Jun 1995.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20-9, Jan 2016.

STALEY, M. et al. Universal primers for the amplification and sequence analysis of actin-1 from diverse mosquito species. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 26, n. 2, p. 214-8, Jun 2010.

STAPLES, J. E.; FISCHER, M. Chikungunya virus in the Americas--what a vectorborne pathogen can do. **N Engl J Med**, v. 371, n. 10, p. 887-9, Sep 4 2014.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

TORRES, J. R. et al. Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. **IDCases**, v. 2, n. 1, p. 6-10, 2015.

VANNAVONG, N. et al. Effects of socio-demographic characteristics and household water management on *Aedes aegypti* production in suburban and rural villages in Laos and Thailand. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 170, Apr 04 2017.

WECK, B. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. **Acta Trop**, v. 171, p. 182-185, Jul 2017.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-3, Sep 2014.

YU, Xue-jie; WALKER, David H. The Order *Rickettsiales*. **The Prokaryotes**, [s.l.], p.493-528, 2006.

DEL FIOLE, Fernando de Sá et al. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 461-466, 2010.

MORAES-FILHO, J. Febre maculosa brasileira. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 38-45, 2017.

DOS SANTOS, Angélica Borges; PETRONZIO, Juliana Abreu Crosara. Mapeamento de uso e ocupação do solo do município de Uberlândia-MG utilizando técnicas de Geoprocessamento. **Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, INPE p. 6185.

QUEIROGAS, Vera Lúcia de. **Capivaras (Rodentia) e Carrapatos (Acari: Ixodidae): alterações ecológicas e a interação do hospedeiro e parasita em áreas urbanas**. 2010. 57 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010

