

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Izabela Maurício de Rezende**

**PROSPECÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CULICÍDEOS E PEQUENOS  
MAMÍFEROS, EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Juiz de Fora

2015

**Izabela Maurício de Rezende**

**PROSPECÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CULICÍDEOS E PEQUENOS  
MAMÍFEROS, EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientadora: Betânia Paiva Drumond**

**Co-orientadora: Giliane de Souza Trindade**

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rezende, Izabela Maurício de.

PROSPECÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CULICÍDEOS E PEQUENOS MAMÍFEROS, EM MINAS GERAIS, BRASIL / Izabela Maurício de Rezende. -- 2015.

97 p.

Orientadora: Betânia Paiva Drumond

Coorientadora: Giliane de Souza Trindade

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Flavivírvurs . 2. Arbovírus. 3. Zoonoses. 4. Vírus Emergentes. 5. Detecção Molecular. I. Drumond, Betânia Paiva, orient. II. Trindade, Giliane de Souza, coorient. III. Título.

**IZABELA MAURÍCIO DE REZENDE**

**“Prospecção de flavivírus em culicídeos e pequenos mamíferos, em  
Minas Gerais, Brasil”**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30 / 02 / 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Betânia Paiva Drumond**

**Orientadora**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

Betânia Paiva Drumond

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luzia da Rosa e Silva**

**Membro Interno**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

Maria Luzia da Rosa e Silva

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cíntia Lopes de Brito Magalhães**

**Membro Externo**

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Cíntia Lopes de Brito Magalhães

**Prof. Dr. Guilherme Côrtes Fernandes**

**Membro Externo**

**Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora**

Guilherme Côrtes Fernandes

**Aos meus pais, Waldir e Angélica**

**Ao meu Xodozinho, Igor**

**Às minhas avós, Alice e Therezinha**

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de Juiz de Fora (PROPESQ/UFJF) pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de utilização dos recursos oferecidos.

À minha orientadora, Betânia Paiva Drumond, pela disponibilidade, pela confiança em meu trabalho, pela transmissão de seus conhecimentos, pelo exemplo, por me ajudar e apoiar durante toda esta caminhada para a concretização deste sonho.

À minha co-orientadora Giliane de Souza Trindade, pelos esclarecimentos e discussões.

Aos colaboradores deste trabalho, Profa. Dra. Erna G. Kroon (UFMG), pesquisador Dr. Pedro Augusto Alves (UFMG/Fiocruz – Bio-Manguinhos), Prof. Dr. Magno Augusto Zazá Borges e seus alunos (UNIMONTES), Prof. Dr. Adriano Páglia e seus alunos (UFMG) e a toda equipe de pesquisadores do Grupo ECOVIR (UFJF, UFMG, UFOP, UFSJ, IFET-Sudeste de Minas).

À professora Dra. Maria Luzia, pelo convívio e troca de conhecimentos. Obrigada pelo seu carinho que sempre me cativou.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia, Andrêssa, Livia, Tatiane, Lorena, Bárbara, Jerusa e todos que já passaram pelo nosso lab, pela companhia, pela troca de ideias e pela amizade de vocês, essencial para esta conquista. Ao Laboratório de Vírus/UFMG, por ter me acolhido, quando precisei. Não se faz ciência sozinho.

Aos professores e colegas do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, por cederem espaço físico, equipamentos e pela troca de conhecimentos.

Ao namorado Pedro, pela compreensão, paciência, carinho, amizade e companheirismo. Obrigada também pelas orientações e discussões.

À inseparável amiga Rafa, por ser a melhor amiga.

À todos os meus familiares que sempre torceram por mim e vibram a cada conquista. Em especial às minhas vizinhas, Alice e Therezinha, por serem as detentoras do melhor colo do mundo.

Aos meus pais, Wadir e Angélica e ao meu irmão, Igor, que são tudo para mim e nunca mediram esforços para que esta conquista fosse possível.

À Deus, pela força e proteção.

## RESUMO

O Brasil é um país tropical de grande extensão territorial, com mais de um terço recoberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais com condições ideais para a ocorrência de diversas arboviroses, as quais são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos. Dentro deste cenário, Minas Gerais abriga um dos biomas mais importantes do Brasil, a Mata Atlântica, considerado *'hotspot'*, ou seja, região com uma rica biodiversidade. Estes fatores somados às diferenças climáticas, a grande variação latitudinal e as variadas tipologias vegetacionais do estado, propiciam a ocorrência de áreas com elevados índices de diversidade e endemismo de mamíferos. Diante deste contexto, este trabalho visou realizar a prospecção de flavivírus em culicídeos e pequenos mamíferos, em Minas Gerais, Brasil. *Pools* de culicídeos coletados em Montes Claros, no ano de 2012, tiveram seu RNA total extraído e foram testados por RT-PCR para a presença de flavivírus. Uma coleção de pequenos mamíferos, que foram coletados em Rio Pomba, MG, nos anos de 2012 e 2013, pertencentes a Coleção-ECOVIR, também foram analisados neste trabalho, sendo utilizados o soro de 115 animais e fígado de 54 animais desta coleção. Estas amostras passaram pelo processo de extração de RNA total, seguida da síntese de cDNA e testes para a presença de flavivírus através da técnica de qPCR. Dos 96 *pools* de culicídeos testados, um *pool* de *A. aegypti* pode estar naturalmente infectado com DENV-1. Posteriormente, 69 *pools* foram testados para YFV, SLEV e ROCV e um *pool* de *A. scapularis* apresentou fragmento de DNA com tamanho esperado para ROCV no PCR e apresentou um amplicon na reação de qPCR com iniciadores Flavi-1, indicando a circulação de flavivírus em *Aedes scapularis* no ambiente urbano de Montes Claros. Uma amostra de roedor *Calomys sp.* foi detectada como naturalmente infectada com flavivírus (possivelmente SLEV, DENV-1, DENV-3 e DENV-4), mostrando que roedores podem fazer parte da cadeia de manutenção e/ou transmissão de flavivírus na natureza, no Brasil. Esta amostra de roedor foi coletada na área de pasto, que poderia ser considerada uma área de transição entre o ambiente silvestre e peridoméstico.

Palavras-chave: flavivírus, arbovírus, zoonoses, vírus emergentes, detecção molecular.

## ABSTRACT

Brazil is a tropical country of vast territory, with more than one third covered with tropical forests and ecosystems creating ideal conditions for the existence of many arboviruses that are maintained in a variety of zoonotic cycles. Within this scenario, Minas Gerais presents three of the most important biomes of Brazil, the Atlantic Forest that is considered hotspot of biodiversity. These factors plus the climatic differences, the great latitudinal range and the diversity of vegetation favor the occurrence of areas with high diversity index and endemism of mammals. Given this context, this work aims to prospect flaviviruses in mosquitoes and small mammals, in Minas Gerais, Brazil. Pools of mosquitoes collected in Montes Claros, in 2012, were submitted to RNA extraction and tested by RT-PCR for the presence of flaviviruses. A collection of small mammals (Collection- ECOVIR) collected in Rio Pomba, MG, in 2012 and 2013 was also analyzed in this work. A total of 115 serum samples and 54 liver samples were submitted to RNA extraction, followed by cDNA synthesis and they were tested for the presence of flavivirus by qPCR technique. A total of 96 mosquito pools was tested and one pool of *Aedes aegypti* presented an amplicon that could represent a DENV-1 infection. Subsequently, 69 pools were tested for YFV, SLEV and ROCV and a pool of *A. scapularis* presented a DNA amplicon fragment with expected size for ROCV and it was positive in qPCR using primers Flavi-1, indicating the circulation flavivirus in *Aedes scapularis* in the urban environment, in Montes Claros. A sample of a rodent *Calomys sp.* was detected as naturally infected with flaviviruses (possibly SLEV, DENV-1, DENV -3 and DENV-4), indicating that rodents may be part of the maintenance chain and/or flavivirus transmission in nature, Brazil. This rodent sample was collected in the pasture area that could be considered a transition area between the wild and peridomestic environments.

Keywords: flaviviruses, arboviruses, zoonoses, emerging viruses, molecular detection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores relacionados à emergência de doenças infecciosas.....	17
Figura 2: Diagrama esquemático da organização do genoma dos flavivírus ...	20
Figura 3: Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do DENV .....	23
Figura 4: Distribuição do <i>A. aegypti</i> , nas Américas, nas décadas de 1930, 1970 e no ano de 1998 .....	24
Figura 5: Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do WNV.....	27
Figura 6: Armadilhas utilizadas na captura dos culicídeos.....	40
Figura 7: Esquema do DNA sintético usado como controle positivo nas reações de qPCR.....	52
Figura 8: Curva padrão das reações de qPCR para detecção de Flavivírus....	55
Figura 9: Gel de poliacrilamida contendo produtos de PCR separados por eletroforese.. .....	56
Figura 10: Gel de poliacrilamida após separação eletroforética de amplicons de qPCR submetidos à digestão com a enzima de restrição NcoI.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de culicídeos coletadas em Montes Claros, de fevereiro a abril de 2012, no Campus UNIMONTES-MG.....	41
Tabela 2:Espécimes de culicídeos coletados e testados para DENV, SLEV, YFV e ROCV.....	44
Tabela 3: Iniciadores utilizados na detecção do vírus da dengue .....	45
Tabela 4: Iniciadores utilizados na detecção de vírus rocio (ROCV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	45
Tabela 5- Espécimes de pequenos mamíferos coletados em região de Mata Atlântica, que fazem parte da Coleção-ECOVIR.....	50
Tabela 6 Iniciadores utilizados na detecção de flavivírus, por qPCR. ....	51
Tabela 7: Iniciadores utilizados na reação de qPCR, para o gene controle da reação .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – *biological oxygen demand* (demanda biológica de oxigênio)

cDNA – DNA complementar

cm - centímetro

Cq – *quantification cycle* (ciclo de quantificação)

DENV – *Dengue virus*

DEPc – dietilpirocarbonato

DF – febre clássica do dengue

DHF – febre hemorrágica do dengue

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – deoxinucleotídeo trifosfato

DTT – ditioneitol

EDTA – etilenodiaminotetracético

EUA – Estados Unidos da América

fg – fentograma

IFET - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

JEV – *Japanese Encephalitis virus*

kb – kilobases

kg - quilograma

M – molar

mg - miligrama

mL- mililitro

mM – milimolar

M-MLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*

µg – micrograma

ng – nanograma

nm – nanômetro

NS – nonstructural (não estrutural)

nt – nucleotídeo

°C – celsius

ORF – *Open reading frame* (janela aberta de leitura)

pb – pares de bases  
PBS – tampão salina fosfatada  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
prM – pré-membrana  
qPCR – *quantitative* PCR (PCR quantitativo – PCR em Tempo Real)  
RNA – ácido ribonucleico  
ROCV – *Rocio vírus*  
RT – transcrição reversa  
RT-PCR – reação de transcrição reversa, seguida de PCR  
RT-qPCR - reação de transcrição reversa, seguida de PCR quantitativo (PCR em Tempo Real)  
SCD – síndrome do choque do dengue  
SFB – soro fetal bovino  
SLEV – *Saint Louis encephalitis virus*  
t.a. – temperatura ambiente  
TBE –Tris, borato e EDTA  
TBEV – *Tick-borne encephalitis vírus*  
Tm – *melting temperature* (temperature de melt)  
U – unidade  
UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros  
UTR – *untranslated region* (região não traduzida)  
WNV – *West Nile virus*  
YFV – *Yellow fever virus*

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Doenças virais emergentes e reemergentes, vetores e reservatórios	16
1.2	Os Flavivírus	19
1.3	Flavivírus no Brasil	21
1.3.1	<i>Dengue virus</i>	21
1.3.2	Vírus da Febre Amarela	24
1.3.3	Vírus do Oeste do Nilo	26
1.3.4	Vírus da Encefalite de Saint Louis	28
1.3.5	Vírus da Encefalite Japonesa	29
1.3.6	Rocio virus	30
1.4	Multiplicação viral	30
1.5	Transmissão de flavivírus e mosquitos vetores	31
1.6	Epidemiologia	33
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos	39
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1	Prospecção de flavivírus em culicídeos	40
4.1.1	Coleta de culicídeos	40
4.1.2	Extração de RNA total de mosquitos	43
4.1.3	Detecção de flavivírus por RT-PCR	44
4.1.3.1	RT-PCR - Método de Lanciotti e colaboradores (1992)	45
4.1.3.2	RT-PCR - Método de Bronzoni e colaboradores (2005)	46
4.1.4	Análise dos produtos de PCR	48
4.2	Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos	48
4.2.1	Coleção de órgãos e tecidos de pequenos mamíferos silvestres	48
4.2.2	Extração RNA total a partir de soro e/ou fígado de pequenos mamíferos	49
4.2.3	Detecção de flavivírus por RT-qPCR	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
5.1	Testes das condições de qPCR	55
5.2	Prospecção de flavivírus em culicídeos	56

5.3	Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos .....	58
6	DISCUSSÃO .....	59
6.1	Prospecção de flavivírus em culicídeos .....	59
6.2	Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos .....	62
7	CONCLUSÕES .....	67
8	PERSPECTIVAS .....	67
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
	APÊNDICE A – Total de culicídeos coletados em Montes Claros, Minas Gerais, de fevereiro a abril de 2012, dados por coleta .....	78
	APÊNDICE B – Detecção molecular de <i>Flavivirus</i> em <i>pools</i> de culicídeos coletados em Montes Claros, MG.....	83
	APÊNDICE C – Pequenos mamíferos pertencentes à Coleção-ECOVIR utilizados neste trabalho e resultados do qPCR.....	88

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças virais emergentes e reemergentes, vetores e reservatórios

5

A emergência de doenças infecciosas tem aumentado desde 1940 e está relacionada principalmente a fatores socioeconômicos, ambientais, ecológicos e às mudanças e adaptação dos microrganismos (JONES et al., 2008; LUNA, 2002; TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001). Durante as

10 últimas décadas, a invasão de patógenos em novas áreas e o aparecimento de novos patógenos causadores de doenças infecciosas vem aumentando (PFEFFER; DOBLER, 2010). A habilidade de patógenos infecciosos atravessarem as barreiras entre espécies, que pode ser resultado de mudanças na ecologia dos vetores e reservatórios ou modificações nos genes

15 virais, pode ser a explicação para esse elevado número de agentes emergentes, que passaram então a infectar o homem (BALE, 2012; CUNNINGHAM, 2005; VOROU; PAPAVALASSILOU; TSIODRAS, 2007). Fatores ecológicos como temperatura, precipitação e vegetação, influenciam na distribuição do vetor artrópode e do hospedeiro vertebrado, ambos necessários

20 para a manutenção do vírus (GUBLER, 2001). Além desses fatores, para a manutenção do ciclo de transmissão do vírus, também se faz necessária a presença do animal reservatório, geralmente silvestre (MACKENZIE et al., 2004). O alto risco de transmissão para os humanos está associado ao elevado potencial de adaptação do vírus a ambientes antropofizados (WEAVER;

25 REISEN, 2010). Mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência do vetor, favorecer o estabelecimento de novos reservatórios ou permitir a seleção de mutantes virais adaptados a novos ciclos de manutenção (FIGUEIREDO, 2007), assim como perturbar os sistemas naturais causando mudanças na genética viral, composição e dinamismo da

30 população de vetores e hospedeiros e/ou mudanças no ambiente. Todos esses fatores favorecem a emergência de zoonoses (WEAVER; REISEN, 2010) (Figura 1).

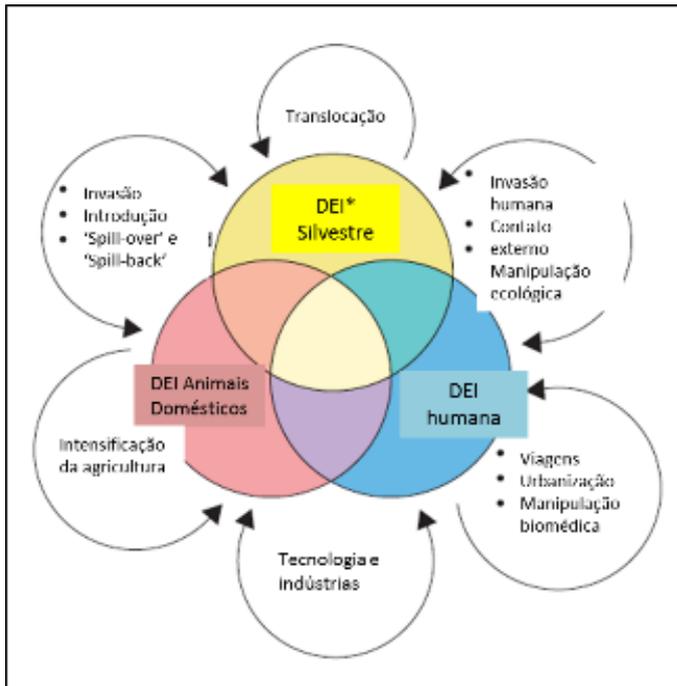


Figura 1: Fatores relacionados à emergência de doenças infecciosas. *Spill-over*: transmissão do agente infeccioso de animais reservatórios para animais de vida silvestre. *Spill-back*: a transmissão do patógeno de animais de vida silvestre para animais domésticos. \*DEI: doença emergente infecciosa. Adaptado de JONES et al., 2008.

5

Dos patógenos que causam doenças em humanos, 75% são considerados zoonóticos, capazes de infectar homens e animais, sendo em maior parte de vida silvestre e com transmissão por vetores artrópodes, representando uma ameaça global (JONES et al., 2008; LUNA, 2002; TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001). Destes patógenos, 44% são representados por vírus emergentes (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001) e deles, 19% são vírus zoonóticos (PFEFFER; DOBLER, 2010; TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001). A vida selvagem representa um reservatório de microrganismos que, uma vez transferidos para os seres humanos, podem surgir como ameaças à saúde pública. Somente 3% dos agentes emergentes zoonóticos possuem o homem como seu reservatório principal, sendo os animais, especialmente os de vida selvagem, os principais reservatórios da maioria das zoonoses (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001). Nos últimos dez anos, muitos vírus vêm sendo descritos como oriundos da vida silvestre, pertencentes a diversas famílias virais tais como *Coronaviridae*, *Bunyaviridae*, *Astroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae* e *Reoviridae* (MACKENZIE; JEGGO, 2013).

10

15

20

As altas taxas de mutação do vírus de RNA, associadas às altas taxas de multiplicação destes vírus, permitem que eles se adaptem facilmente às flutuações de ambiente (COFFEY et al., 2008; JONES et al., 2008). Uma grande parcela dos vírus de RNA zoonóticos é representada pelos arbovírus. O termo arbovírus vem de uma abreviação para a frase no inglês *arthropod-borne virus*, que são vírus transmitidos a um hospedeiro vertebrado através de um artrópode hematófago. Os arbovírus incluem diversos grupos taxonomicamente distintos. Dentre eles estão os membros das famílias *Flaviviridae*, *Togoviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (FIGUEIREDO, 2007; WEAVER; REISEN, 2010). Arbovírus estão geralmente associados a três diferentes manifestações clínicas, febres, febres hemorrágicas e encefalites. No entanto, mais de uma síndrome pode ser observada durante a infecção pelo vírus (VASCONCELOS, PFC, TRAVASSOS DA ROSA, APA, PINHEIRO, FP, TRAVASSOS DA ROSA, 2005). As arboviroses são comumente associadas à emergência de doenças infecciosas (WEAVER; REISEN, 2010), um fenômeno natural relacionado à evolução e adaptação das espécies (COFFEY et al., 2008; JONES et al., 2008).

Muitos vírus de RNA vêm causando grandes epidemias devido à variedade de hospedeiros e reservatórios, aumentando o número de infecções no homem (WEAVER; REISEN, 2010). A maioria dos animais reservatórios são mamíferos, principalmente das ordens Rodentia, Chiroptera, Primatas e Carnivora, mas muitas aves também são importantes reservatórios de patógenos infecciosos zoonóticos. A grande diversidade de roedores conhecida, seu notável potencial reprodutivo e a sua capacidade de adaptação a diferentes nichos, são fatores que explicam, em parte, a emergência e a reemergência de zoonoses virais associadas a estes animais (VANDEGRIFT; WALE; EPSTEIN, 2011).

A circulação de flavivírus em mamíferos já foi descrita para alguns vírus do gênero, como observado por Padgett et al. (2007) que avaliou a prevalência do vírus do Oeste do Nilo em esquilos, na Califórnia, nos anos de 2004 e 2005 e no trabalho de Ometto et al.(2013), em que foi analisada a soroprevalência do vírus do Oeste do Nilo em equinos provenientes de diferentes biomas brasileiros. Estudos realizados no Rio Grande do Sul, detectaram a presença do vírus da Febre Amarela em primatas não-humanos e em casos esporádicos

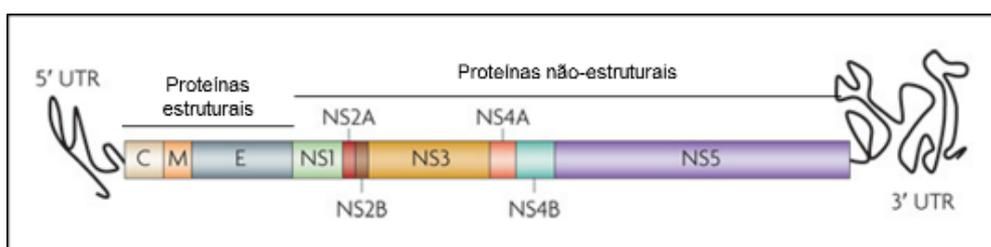
da doença na população que vive próxima da mata (ALMEIDA et al., 2014). O vírus já foi detectado também na população de Minas Gerias (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; RIBEIRO; ANTUNES, 2009). Bakhvalova et al. (2009) demonstraram a transmissão vertical do vírus da encefalite transmitido por carrapatos (TBEV) entre roedores da espécie *Myodes rutilus pallas*. Pauvolid-Corrêa et al. (2010a) detectaram a presença de anticorpos neutralizantes anti-SLEV em cavalos do sul do pantanal brasileiro e um trabalho realizado no estado do Paraná identificou a presença do vírus da encefalite de Saint Louis em primatas não-humanos e em cavalos (SVOBODA et al., 2014). Embora existam poucos dados disponíveis na literatura, De Thoisy et al. (2009) observaram a circulação dos quatro sorotipos de DENV em roedores silvestres, na Guiana Francesa, entre 2001 e 2007. Anticorpos neutralizantes para DENV-1 e DENV-2 já haviam sido detectados em roedores, morcegos, marsupiais e ungulados na América Central (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004; PLATT et al., 2000).

## 1.2 Os Flavivírus

A família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (ICTV, 2015). O gênero Flavivírus, constituído por aproximadamente 50 vírus, pertence ao grupo de arbovírus de maior importância global, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, além de doenças graves como encefalites, febres hemorrágicas e hepatites em humanos. Dentre os integrantes do gênero Flavivírus, os arbovírus de maior importância para a saúde pública são vírus da Dengue (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus Rocio (ROCV), vírus da Encefalite de Sant Louis (SLEV) e vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (LINDENBACH et al., 2013). Para estes vírus vem sendo relatado um aumento na incidência, na área geográfica ocupada e no número de hospedeiros e por causa disso eles tem sido classificados como patógenos emergentes ou reemergentes (MACKENZIE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2005).

Os representantes do gênero Flavivírus são formados por um envelope (40-60 nm) e um capsídeo contendo uma fita simples de RNA de polaridade

positiva com tamanho aproximado de 11 kb. A fita de RNA possui uma janela aberta de leitura (ORF), ladeada por duas regiões não traduzidas 5' e 3' (5'UTR e 3'UTR), com 100 e 400 a 700 nucleotídeos (nt), respectivamente. Essencial à multiplicação viral é a extremidade *cap* 5' (mG5ppp5Am) e uma estrutura muito conservada na região 3' UTR, que possui uma calda de poliadenina ausente nos RNAs mensageiros celulares (ALVAREZ et al., 2005; ZHOU et al., 2007; LINDENBACH; et al., 2013). O genoma dos flavivírus funciona como um RNA mensageiro, sendo traduzido em uma poliproteína que é clivada posteriormente em 3 proteínas estruturais, envelope (E), pré-membrana (prM) e capsídeo (C) e em sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (ALESHIN et al., 2007) (Figura 2). A glicoproteína E possui o maior determinante antigênico do vírus, sendo alvo de anticorpos neutralizantes e é esta proteína que se liga à célula durante a ligação, fusão e entrada do vírus. A proteína de membrana (M) é um fragmento proteolítico pequeno, formado a partir da clivagem proteína prM, durante a maturação da partícula viral, em duas proteínas menores, “pr” e “M”. A proteína C forma o capsídeo viral, que envolve o RNA genômico (LINDENBACH et al., 2013; PIERSON; DIAMOND, 2013).



20 Figura 2: Diagrama esquemático da organização do genoma dos flavivírus. Adaptado de GUZMAN et al., 2010

Os flavivírus são encontrados em 6 continentes diferentes, onde são responsáveis por endemias e epidemias de doenças relacionadas a eles, todos os anos. A distribuição geográfica dos flavivírus é bastante dinâmica, permitindo a emergência dos vírus em novas áreas geográficas e o aumento da incidência das doenças. As ações humanas contribuem significativamente para o avanço dos flavivírus, antes do desenvolvimento do transporte intercontinental mais rápido e eficaz, o movimento dos flavivírus entre o Velho Mundo e o Novo Mundo era considerado raro (PIERSON; DIAMOND, 2013).

### 1.3 Flavivírus no Brasil

Dos aproximadamente 50 flavivírus conhecidos, ao menos 13 já foram encontrados no Brasil, sendo eles: Dengue vírus 1-4, vírus da Febre Amarela, vírus Rocio, vírus da encefalite de Sant Louis, vírus do Oeste do Nilo, flavivírus de *Culex* e os vírus Bussuquara, Cacipacoré, Iguapé e Ilheus (FIGUEIREDO, 2000, 2007; revisado por PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014). A maioria destes vírus são mantidos em ciclos zoonóticos e ocasionalmente acometem homens e animas que entram em contato com o ambiente silvestre aonde esses vírus ocorrem (FIGUEIREDO, 2000). Dos flavivírus já descritos no Brasil, o único que possui vacina como medida profilática é o YFV. Para os demais arbovírus, o controle deve ser feito mediante o controle do vetor e o tratamento da doença causada pelo vírus é somente de suporte (BURKE; MONATH, 2001; LINDENBACH; RICE, 2001).

15

#### 1.3.1 *Dengue virus*

Acredita-se que a primeira epidemia descrita de dengue tenha ocorrido na Filadélfia, em 1780. Epidemias foram muito comuns na América do Norte, Caribe, Ásia e Austrália nos séculos XVIII e XIX. Em 1944, Sabin e Schlesinger isolaram o vírus de camundongos e a existência de mais de um sorotipo foi descrita através de estudos de proteção-cruzada em pacientes voluntários. Durante a Segunda Guerra Mundial, o DENV começou sua ampla distribuição pelo mundo, aumentando o número de pessoas que entravam em contato com o vírus. A partir de 1950, epidemias da dengue envolvendo múltiplos tipos e linhagens do DENV tornaram-se comuns em muitas partes do mundo, como na África, Ásia, Austrália e Américas (PIERSON; DIAMOND, 2013).

Existem quatro *Dengue virus* genética e antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CHEN; VASILAKIS, 2011). A análise filogenética baseada na sequência completa do gene E de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 confirma a existência de mais de um genótipo para cada tipo viral, sendo 5 genótipos para DENV-1 e DENV-3, 6 genótipos para DENV-2 e 4 genótipos para DENV-4 (CHEN e VASILAKIS,

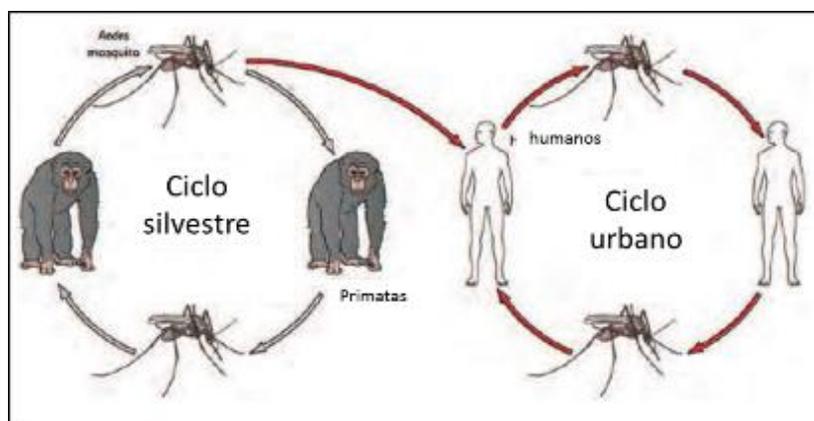
2011; WEAVER e VASILAKIS, 2009). Outra subdivisão que tem sido abordada recentemente é “linhagem”. Esta denominação tem sido empregada para caracterizar os vírus agrupados em subtipos em um nível taxonômico abaixo de genótipo (MENDEZ et al., 2010).

5 Qualquer um dos quatro tipos de DENV pode causar desde a doença assintomática até as formas sintomáticas de febre do dengue ou dengue clássica (DF), febre hemorrágica do dengue (DHF) ou síndrome do choque do dengue (SCD) (HALSTEAD, 1980). A tradicional classificação da dengue, como DF, DHF e SCD foi revista pela Organização Mundial da Saúde que propôs  
10 uma nova classificação de acordo com os níveis de gravidade da doença. A partir de estudos clínicos e parâmetros de laboratório, percebeu-se uma nítida diferença entre os pacientes com dengue grave e não grave. Dessa forma, para tornar mais prático e facilitar a decisão dos médicos, estabeleceu-se uma divisão entre os pacientes com dengue não grave em dois grupos, pacientes  
15 com e sem sinais de alerta (DEEN et al., 2009; GOTO et al., 2012; MEDINA et al., 2012). Os sinais de alerta incluem dor abdominal ou sensibilidade, vômitos persistentes, acumulação de fluido, sangramento da mucosa, letargia e inquietação, aumento do hematócrito acompanhado de uma rápida diminuição na contagem de plaquetas. Quando o paciente apresenta estes sintomas há a  
20 necessidade de uma observação criteriosa e uma intervenção médica (DEEN et al., 2009).

A Febre Clássica do Dengue tem seu início súbito com sintomas inespecíficos como febre alta, dores de cabeça e retroorbital, mialgia, náuseas e vômitos. Pode ocorrer linfadenopatias, aparecimento de petéquias e  
25 erupções. A febre diminui dentro de 12 a 24 horas e os demais sintomas cessam em até 7 dias (BURKE; MONATH, 2001; GUBLER, 1998). Na Febre Hemorrágica do Dengue, o aparecimento da doença também é súbito com presença de sintomas inespecíficos que duram de 2 a 7 dias. O paciente apresenta uma melhora, com queda da febre e diminuição dos sintomas e  
30 dentro de 12 a 24 horas os sintomas reaparecem com sinais de hemorragias espontâneas, plaquetopenia, lesões púrpuras e equimoses. Sem um diagnóstico e tratamento, o paciente pode desenvolver um caso de Choque do Dengue, fase que pode ser transitória, devido ao extravasamento do plasma, ou progressiva e alcançar um estágio em que não há detecção de pulso ou

pressão sanguínea, levando o paciente ao óbito (BURKE; MONATH, 2001; GUBLER, 1998).

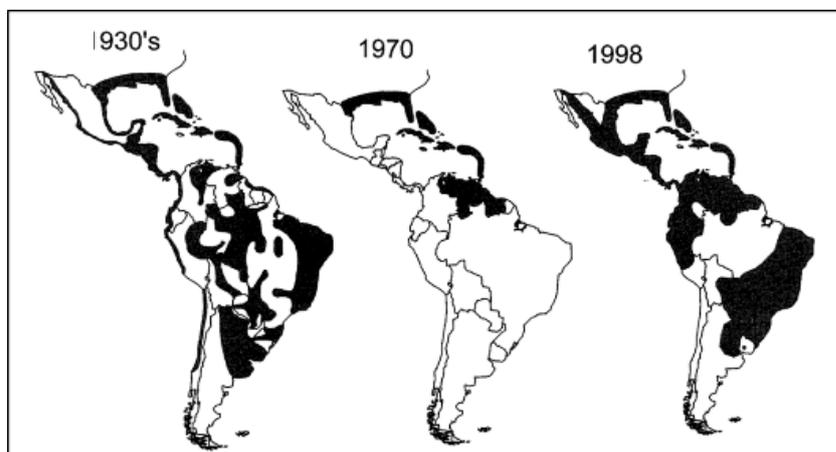
Os quatro tipos do DENV se mantêm em dois ciclos de transmissão ecológica e evolutivamente distintos, um urbano e outro silvestre (Figura 3). O principal mosquito vetor é o *Aedes aegypti*, podendo também ser transmitido por outros mosquitos do gênero. Estudos recentes mostram a necessidade de pesquisas sobre o DENV silvestre, devido ao rápido crescimento da população humana nas áreas de florestas tropicais e ao redor destas e ao fato de que pouca ou nenhuma alteração genética pode ser necessária para o DENV silvestre se adaptar ao hospedeiro humano e aos mosquitos urbanos, o que poderia causar a emergência destes vírus (CHEN; VASILAKIS, 2011; FIGUEIREDO et al., 2010). Em 2013, no evento *Third International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*, foi apresentado um trabalho sobre a descoberta de um novo DENV silvestre, o tipo 5, pelo Dr. Nikos Vasilakis. Este vírus foi detectado durante um surto de dengue, no estado de Sarawak, na Malásia, em 2007. Pelas características genéticas e sorológicas trata-se de um novo dengue virus, que os pesquisadores acreditam ser mantido em primatas não humanos, na Malásia. Este vírus até hoje, foi detectado em apenas um surto de dengue em humanos, mas reforça a possibilidade de emergência de DENV silvestre, o que teria um grande impacto no controle da doença (SCIENCEMAG, 2013). Infecções em humanos pelo DENV acarretam em uma elevada viremia, capaz de suportar a transmissão do vírus (PIERSON; DIAMOND, 2013).



25

Figura 3: Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do DENV. Fonte: Adaptado de PIERSON & DIAMOND; 2013.

Nas décadas de 1950 a 1970, as Américas vivenciaram, indiretamente, uma época de controle do DENV decorrente de uma campanha para erradicação do mosquito vetor da febre amarela urbana (SOPER, 1963). Com a interrupção da campanha na década de 1970 e acelerada e incontrolada urbanização, principalmente na América Latina, o vetor se espalhou pelo continente e o vírus voltou a circular nesta região, causando epidemias de dengue (SHEPARD et al., 2011) (Figura 4). Nas últimas décadas, a dengue tem sido considerada a arbovirose de maior importância para a saúde pública mundial, emergindo em países até então livres da doença e reemergindo em países onde a doença já havia sido controlada (GUBLER, 1998; LINDENBACH et al., 2013). A acelerada urbanização, o inadequado controle do mosquito e a facilidade de locomoção das pessoas favoreceram para esse quadro mundial da dengue. O DENV causa, anualmente, 25 a 100 milhões de casos da doença, sendo 250.000 casos de DHF/SCD (PIERSON; DIAMOND, 2013). Estima-se que três bilhões de habitantes no mundo vivam em regiões endêmicas da doença e por ano, cerca de 120 milhões de pessoas viajam para essas áreas (SHEPARD et al., 2011).



20 Figura 4: Distribuição do *A. aegypti*, nas Américas, nas décadas de 1930, 1970 e no ano de 1998. Fonte: Adaptado de GUBLER, 1998

### 1.3.2 Vírus da Febre Amarela

25

O vírus da febre amarela foi caracterizado como causador de doenças em 1648, em Yucatan, México. Áreas tropicais das Américas sofreram com

grandes epidemias causadas pelo vírus entre os séculos XVII a XX. O primeiro isolamento viral ocorreu no ano de 1927, a partir do sangue de um paciente em Gana, que foi inoculado em macaco *Reshus* (PIERSON; DIAMOND, 2013). O YFV foi trazido para o Brasil em navios de escravos vindos da África, América do Norte e Caribe, durante o século XVI (FIGUEIREDO, 2007; PIERSON; DIAMOND, 2013).

A maioria das infecções pelo YFV é assintomática, sendo que 15% das pessoas infectadas desenvolvem doença moderada ou grave com icterícia. Em pacientes sintomáticos, o período de incubação é de 3 a 6 dias, ocorrendo início súbito com febre, calafrios, dor de cabeça intensa, dores nas costas, dores no corpo, náusea, vômitos, fadiga e fraqueza. A maioria das pessoas melhoram após o início dos sintomas. A forma grave é caracterizada por febre alta, icterícia, sangramento e, eventualmente, choque e falência múltipla de órgãos (CDC, 2013). O número de casos de febre amarela comprovados por exames clínicos e laboratoriais são baixos, subestimando certamente o verdadeiro número de casos (MONATH; CETRON; TEUWEN, 2008). Um surto de febre amarela pode passar despercebido, por causa da semelhança de sinais e sintomas com hepatites virais, malária, leptospirose, febre tifoide e febres hemorrágicas. Com isso, torna-se difícil o diagnóstico por meio de sinais clínicos (WHO, 2008). No Brasil a área de vacinação da febre amarela recomendada pelo Ministério da Saúde, vem sendo ampliada para regiões que não eram consideradas áreas de risco para o vírus (ROMANO et al., 2014).

Na América do Sul, o YFV é mantido num ciclo zoonótico envolvendo macacos e mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*. No Brasil, há zonas bem definidas de circulação do YFV, sendo (i) uma região de baixo risco, onde o vírus se mantém no ciclo silvestre e são poucos os casos em humanos; (ii) uma região de transição onde o contato entre macacos, mosquitos vetores e humanos é maior (iii) e uma terceira zona endêmica, caracterizada por uma elevada densidade populacional de humanos e mosquitos vetores competentes, com número elevado de casos da doença (VASCONCELOS et al., 2004). A presença do ciclo silvestre do YFV, em que a transmissão ocorre entre mosquitos e primatas não humanos, explica porque as extensivas campanhas de vacinação contra o YFV diminuem, mas não eliminam, os casos da doença causada pelo vírus (PIERSON; DIAMOND, 2013). O principal vetor

do vírus é o *Aedes aegypti*, mosquito característico de regiões urbanizadas. Nas Américas, casos epidêmicos em humanos geralmente ocorrem pela introdução do homem no ciclo silvestre do vírus, em regiões de transição onde o *Aedes aegypti* é o principal mosquito-vetor (PIERSON; DIAMOND, 2013). A

5 erradicação do mosquito vetor do YFV na década de 1960, surtiu efeito nas Américas Central e do Sul (SOPER, 1963). Na mesma época, a doença foi controlada na África devido ao início da utilização de uma vacina segura e eficaz (GUBLER, 2001). Entretanto, no Brasil, a reemergência dessa

10 arbovirose foi facilitada pela crescente urbanização de áreas silvestres, descuido da população com as medidas profiláticas, invasão antrópica de áreas silvestres, ampla distribuição do mosquito-vetor, presença de reservatórios silvestres naturais e baixa porcentagem de pessoas imunizadas nas Américas (BURKE; MONATH, 2001; GUBLER, 2001; SALL et al., 2010). Estima-se que ocorram 200.000 casos da doença por ano, chegando ao

15 número de 30.000 mortes, a maioria na África. Em todo o mundo, 44 países, incluindo o Brasil, são considerados endêmicos para o YFV, com aproximadamente 900 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (PIERSON; DIAMOND, 2013)

20

### 1.3.3 Vírus do Oeste do Nilo

O primeiro relato de isolamento do vírus do Oeste do Nilo ocorreu em 1937, de uma mulher com doença febril, no distrito West Nile, em Uganda. Em

25 1990, na Europa Oriental, ocorreram muitos casos relacionados a doenças neurológicas causadas pelo vírus. Em 1999, o vírus foi detectado na América do Norte, após causar sete mortes em humanos e um grande número de mortes em cavalos e aves em Nova Iorque. O vírus já foi detectado em todos os Estados Unidos e em partes do Canadá, México, Caribe e América do Sul,

30 incluindo o Brasil (PIERSON; DIAMOND, 2013).

Mais de 80% dos casos da doença causada pelo WNV são assintomáticos e o tempo de incubação do vírus varia de 2 a 14 dias. Manifestações sintomáticas da doença causam dores pelo corpo, febre, fadiga, vômito, diarreia, erupções cutânea e linfadenopatia, que duram menos de 7

dias (PIERSON; DIAMOND, 2013; ROSSI; ROSS; EVANS, 2010). Menos de 1% dos pacientes infectados pelo WNV desenvolvem sintomas neurológicos, podendo desenvolver meningites, encefalites ou paralisias flácidas agudas (GRAY; WEBB, 2014). Encefalites e meningites são caracterizadas pelo rápido surgimento de dores de cabeça, fotofobia, dores na nuca, confusão mental e febre. A paralisia flácida aguda inicia-se pelo início agudo de fraqueza assimétrica e ausência de reflexos sem dor (ROSSI; ROSS; EVANS, 2010).

O vírus se mantém em um ciclo primário de transmissão que envolve espécies do gênero *Culex sp.* como vetores. As aves migratórias são os reservatórios naturais do WNV (GRAY; WEBB, 2014). Em algumas regiões, mosquitos de outros gêneros podem desempenhar o papel de vetores secundários em ciclos de transmissão do vírus em que, preferencialmente, os mamíferos são os reservatórios do vírus pela preferência dos vetores por estes animais (CAMPBELL et al., 2002; GRAY; WEBB, 2014). Homens e cavalos são hospedeiros acidentais do WNV (ROSSI; ROSS; EVANS, 2010). A invasão por linhagens diferentes do WNV em novas áreas pode ocorrer através da migração das aves, que servem como reservatórios para o vírus (CAMPBELL et al., 2002) (Figura 5).

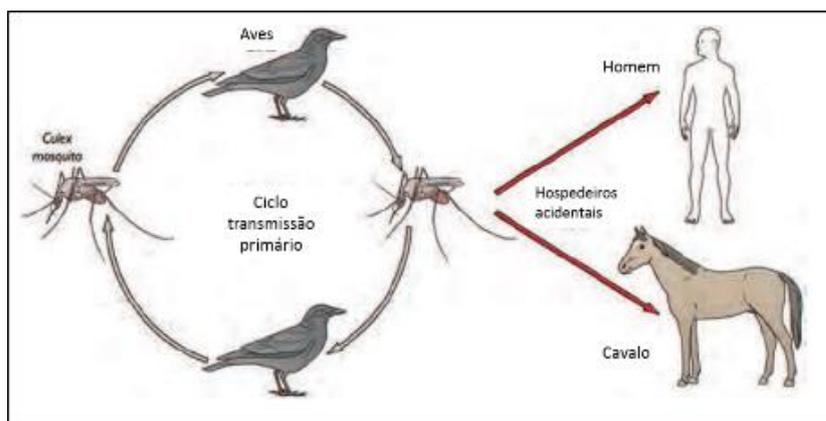


Figura 5: Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do WNV. Fonte: Adaptado de PIERSON & DIAMOND; 2013.

Embora a maioria das infecções pelo WNV em humanos ocorra através da picada do mosquito *Culex sp.* infectado, outras vias de transmissão já foram descritas para o vírus, incluindo transfusão sanguínea, transplante de órgãos, através da placenta, pela via congênita, e/ou através do leite (PIERSON; DIAMOND, 2013). Desde a introdução do vírus nos Estados Unidos, em 1999,

já foram notificadas mais de três milhões de infecções, com 1.500 mortes (SUTHAR; PULENDRAN, 2014). A circulação do WNV no Brasil é recente, com o primeiro relato de detecção do vírus no ano de 2009, por testes sorológicos em cavalos do Pantanal (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011), sendo detectado nos anos subsequentes em aves (OMETTO et al., 2013; PÉREZ-RAMÍREZ; LLORENTE; JIMÉNEZ-CLAVERO, 2014), equinos (OMETTO et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011) e, em 2014, foi detectado em um trabalhador rural do estado do Piauí (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

10

#### 1.3.4 Vírus da Encefalite de Saint Louis

No ano de 1933, o SLEV foi isolado de uma suspensão de cérebro de pacientes em Saint Louis, Missouri, EUA. Logo após se espalhou por toda a América e já foi encontrado do Canadá até a Argentina (ROCCO et al., 2005). O primeiro vírus isolado no Brasil foi em 1969, de um *pool* de mosquitos da espécie *Sabethes belisarioi* capturado na estrada Belém-Brasília (CAUSEY; SHOPE; THEILER, 1964; FIGUEIREDO, 2007; ROCCO et al., 2005).

O SLEV é antigenicamente relacionado ao grupo das encefalites japonesas (BURKE; MONATH, 2001). A maioria dos casos de doença causados pelo SLEV são assintomáticas (PIERSON; DIAMOND, 2013). Quando presentes, os sintomas causados pelo SLEV são muito parecidos com os causados pelo DENV, embora Rocco et al. (2005) tenham descrito erupção cutânea e prurido na palmas das mãos e na sola dos pés, sintomas não característicos da dengue. O período de incubação varia de 5 a 15 dias, os primeiros sintomas são febre, mal-estar generalizado, dor de cabeça, sonolência, anorexia, mialgia, garganta inflamada e tosse, seguido de 1 a 4 dias pelo surgimento de sinais meníngeos e neurológicos, que podem ser fatais (BURKE; MONATH, 2001; PIERSON; DIAMOND, 2013). O baixo número de casos relatados de pacientes com o SLEV em regiões tropicais da América talvez seja reflexo do diagnóstico inadequado destes pacientes (FIGUEIREDO, 2014).

O vírus se mantém em seu ciclo primário entre aves silvestres e mosquitos, principalmente *Culex sp.* Ciclos secundários do vírus incluem

vetores pertencentes aos gêneros *Aedes sp.*, *Mansonia sp.* e *Sabethes sp.*; e marsupiais, roedores e primatas não humanos como animais reservatórios (RODRIGUES et al., 2010). O vírus já foi isolado de uma grande variedade de vertebrados, incluindo espécies de aves, guaxinins, gambás e morcegos no norte da América, além de aves, roedores e primatas não humanos na América tropical (BURKE; MONATH, 2001). No Brasil, o SLEV vem sendo descrito nos últimos 40 anos, sendo isolado de aves, mamíferos e humanos (MAIA et al., 2014; MONDINI et al., 2007b; ROSA et al., 2013; TERZIAN et al., 2011). Recentemente, o vírus foi isolado do cérebro de cavalo, na cidade de Abaeté, em Minas Gerais (ROSA et al., 2013). Os casos em humanos no país tem sido relatados nos estados do Pará e São Paulo (MAIA et al., 2014).

### 1.3.5 Vírus da Encefalite Japonesa

15

A primeira epidemia descrita causada pelo JEV ocorreu no ano de 1870, no Japão. O vírus só foi isolado no ano de 1935, a partir do cérebro de um homem infectado em Tóquio. Embora a maioria dos casos da doença sejam assintomáticos ou resultem em sintomas generalizados como dor no corpo, febre, calafrios, vômito e diarreia, mais de 30% dos casos graves resultam em morte ou em sequelas neurológicas (PIERSON; DIAMOND, 2013; SU et al., 2014).

O vírus se mantém em um ciclo zoonótico entre aves aquáticas e mosquitos do gênero *Culex sp.*. Os porcos são os principais animais reservatórios do JEV e humanos e outros animais vertebrados são considerados hospedeiros acidentais do vírus (PIERSON; DIAMOND, 2013). A distribuição geográfica do JEV tem aumentado nos últimos anos, se espalhando por países da Ásia e causando surtos e epidemias em populações que nunca haviam entrado em contato com o vírus (SCHUH et al., 2013). Por ano, estima-se que ocorram 70.000 casos da doença causada pelo JEV em áreas endêmicas para o vírus (SU et al., 2014), indicando que o JEV continua a ser uma das causas mais importantes de encefalites virais (PIERSON; DIAMOND, 2013).

### 1.3.6 Rocio virus

O primeiro isolamento do vírus ROCV, no Brasil ocorreu em 1975, durante uma epidemia de meningoencefalites, no estado de São Paulo (MEDEIROS et al., 2007). Sua patologia é semelhante àquelas causadas pelo JEV e SLEV. A doença caracteriza-se por um início súbito com febre, anorexia, náuseas, vômitos e cefaleia, que evolui para convulsões e/ou alteração de consciência. No sistema nervoso central os sintomas mais comuns são os meníngeos. Alteração de consciência, anormalidades motoras, cegueira e surdez já foram relatados. Sequelas como deficiência motora e cerebelar foram observadas em 20% dos casos estudados. O diagnóstico é feito através de isolamento viral, por sorologia ou por testes moleculares. Epidemias em São Paulo durante 1975 e 1976, resultaram em 971 casos da doença (BRONZONI et al., 2005; BURKE; MONATH, 2001; DE BARROS et al., 2011).

Importantes aspectos da epidemiologia de ROCV ainda continuam desconhecidos. Pássaros silvestres são os possíveis animais reservatórios do vírus no ciclo. *Psorophora ferox* e *Aedes scapularis* são os vetores descritos da doença (BURKE; MONATH, 2001; FIGUEIREDO, 2007; MITCHELL; FORATTINI; MILLER, 1986; MITCHELL; FORATTINI, 1984).

### 1.4 Multiplicação viral

Os vírus do gênero *Flavivirus* são capazes de infectar diferentes tipos celulares em humanos, tais como células do fígado, rins, pâncreas, do sistema imune e nervoso (STEIN e SHI, 2008). Os flavivírus interagem com receptores da membrana de células-alvo do hospedeiro através da proteína E, que é alvo de anticorpos neutralizantes. Após a ligação na célula, o vírus penetra por endocitose, o pH dentro do endossomo diminui e o vírus libera seu nucleocapsídeo no citoplasma. Ocorre então dissociação do capsídeo com o genoma e o RNA viral é liberado no citoplasma celular para início da transcrição e replicação (BURKE; MONATH, 2001; STEIN e SHI, 2008).

No citoplasma, o RNA genômico viral pode seguir por três caminhos distintos: por possuir polaridade positiva, funciona como um RNA mensageiro

para a maquinaria celular durante a transcrição, originando uma poliproteína que é posteriormente clivada; pode também servir de molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico durante a replicação, sendo usado como molde para a polimerização de fitas de RNA negativas, que por sua vez servirão de  
5 molde para a produção de mais fitas de RNA genômico polaridade positiva; e pode ainda ser empacotado juntamente com algumas enzimas, para formar as novas partículas virais (LINDENBACH et al., 2013) que vão ser transportadas para o Complexo de Golgi, para então serem secretadas pela célula (STEIN e SHI, 2008).

10

### 1.5 Transmissão de flavivírus e mosquitos vetores

Os culicídeos vêm sendo descritos como potenciais vetores para  
15 diversos patógenos causadores de doenças infecciosas, incluindo os flavivírus (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010b). Os vetores podem se infectar após realizar o repasto sanguíneo em indivíduos infectados (FIGUEIREDO et al., 2010), pela transmissão transovariana (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002) ou pela via sexual (ROSEN, 1987). Estas estratégias de transmissão no vetor são  
20 importantes não somente para a sobrevivência do vírus no ambiente natural, mas também para o estabelecimento da sua biologia de transmissão (KUNO; CHANG, 2005). No vetor, os flavivírus se multiplicam principalmente no epitélio do intestino médio, cérebro e glândulas salivares. A infecção no mosquito não resulta em nenhuma manifestação patológica e o mesmo permanece infectado  
25 durante toda sua vida (GUBLER et al., 2007).

No Brasil, há uma grande diversidade de mosquitos vetores em potencial para a transmissão de diversos patógenos que infectam tanto o homem quanto os animais. A transmissão dos arbovírus é determinada pela presença do mosquito vetor competente, do reservatório e do hospedeiro final,  
30 que pode ser um hospedeiro acidental como ocorre, muitas vezes, com o homem. Entre os vetores de importância médica, estão os mosquitos dos gêneros *Aedes sp.*, *Psorophora sp.* e *Culex sp.* (LAPORTA et al., 2012).

O gênero *Aedes* possui 900 espécies, distribuídas em 44 sub-gêneros, sendo 9 encontrados na região neotropical. Uma variedade de outras espécies

de *Aedes*, distribuídas no Pacífico Sul, como *A. polynesiensis*, *A. pseudoscutellaris*, *A. malayensis* e *A. cooki* apresentaram uma susceptibilidade maior ao DENV quando comparadas com *A. aegypti*. Ciclos de transmissão silvestre de dengue no continente africano incluem espécies de *A. furcifer*, *A. taylori* e *A. luteocephalus*. Ainda, o *A. albopictus* já foi relacionado à transmissão do DENV em primatas não humanos e humanos em florestas da Malásia, demonstrando que esta última e outras espécies de *Aedes* foram o vetor original do dengue humano e o vírus posteriormente explorou o *Aedes aegypti* como vetor, o que facilitou sua transmissão devido ao caráter altamente antropofílico desta espécie de mosquito (CIOTA; KRAMER, 2010).

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da transmissão urbana do DENV e YFV, sendo extremamente antropofílico e urbano, não colonizando bem o ambiente silvestre, preferindo os pequenos reservatórios de água limpa em residências humanas. O *Aedes albopictus* é considerado um vetor auxiliar (GRATZ, 2004) e foi registrado pela primeira vez no Brasil no Rio de Janeiro em 1986, e no mesmo ano já era encontrada em São Paulo e Minas Gerais (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). Em 2002, estava presente em 20 dos 27 estados brasileiros (SANTOS, 2003). Além de poder ser um potencial vetor do DENV, o *Aedes albopictus* é considerado um vetor competente de outros arbovírus, como YFV, *Mayaro virus* e *Oropouche virus* (GRATZ, 2004).

Entre as espécies de *Aedes* nativas do Brasil, o *A. scapularis* tem chamado a atenção por sua adaptação ao ambiente urbano. Esta espécie possui ampla distribuição nas Américas, sendo encontrada do sul da Flórida ao norte da Argentina. Forattini; Kakitani; Sallum (1997) foram os primeiros a descreverem sua domiciliação no Brasil, propondo que este mosquito estaria se domesticando. Desde então surgiram vários relatos sobre sua preferência por ambientes modificados pela ação humana (FORATTINI, 1995; GOMES, 2007), inclusive criando-se em recipientes artificiais como latas e baldes plásticos (FORATTINI; KAKITANI; SALLUM, 1997). *Aedes scapularis* foi implicado na transmissão do vírus Rocio no Brasil (MITCHELL; FORATTINI; MILLER, 1986) e mostrou-se um vetor eficiente do YFV em condições laboratoriais (ARNELL, 1976). Em levantamento feito pela equipe do laboratório de controle biológico da UNIMONTES, nos meses de abril e maio de 2011 o *Aedes scapularis* foi o mosquito mais abundante tanto no Campus Darcy Ribeiro da UNIMONTES

como no bairro Sapucaia, locais amostrados na cidade de Montes Claros (BORGES et al., manuscrito em preparação).

Mosquitos do gênero *Psorophora sp.* também já foram descritos como vetores do ROCV no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010c; 5 STRAATMANN et al., 1997). Na região do Pantanal, esses mosquitos foram os mais abundantes durante a realização de vigilância epidemiológica no ano de 2007 (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010c).

Diversas espécies de mosquitos do gênero *Culex sp.* são encontradas do norte até o sul das Américas (DEMARI-SILVA et al., 2014) e essas espécies 10 estão implicadas na transmissão de agentes infecciosos ao homem, como *Wuchereria bancrofti* (BARRETTO et al., 2014) e também de arbovírus que circulam no Brasil, como WNV, JEV, SLEV, Bussuquara e flavivírus de *Culex* (FIGUEIREDO, 2000; NEWMAN et al., 2011).

15

## 1.6 Epidemiologia

Hoje em dia acredita-se que 40% da população mundial, cerca de 2,5 bilhões de pessoas, vivem em áreas com elevado risco de transmissão do 20 DENV. A dengue é endêmica em pelo menos 100 países na Ásia, Américas e África. A Organização Mundial da Saúde estima que 50 a 100 milhões de infecções ocorram anualmente pelo DENV, sendo 500.000 casos de DHF e pelo menos 20.000 mortes, principalmente entre crianças (CDC, 2013).

O Brasil é, sem dúvida, o país que notifica o maior número de casos nas 25 Américas, com surtos ocorrendo principalmente nos meses de janeiro a maio (OPAS, 2007; Nogueira et al., 2005). O estado de Minas Gerais é caracterizado pela sazonalidade de surtos da dengue, com aumento do número de casos notificados geralmente de novembro a março (AMÂNCIO et al., 2014). Desde 1986, grandes epidemias de dengue são reportadas, logo após a reintrodução 30 do DENV-1, seguida da introdução do DENV-2 em 1990, e do DENV-3, em 2000, no Estado do Rio de Janeiro. Os DENV-3 e DENV-2 têm sido responsáveis pela maioria dos casos de febre do dengue, FHD/SCD no Brasil (NOGUEIRA, et al., 2005, TRAVASSOS DA ROSA, 2005). Recentemente, o DENV-4 foi reintroduzido na Região Norte do país, já sendo reportados casos

em vários estados (TEMPORÃO et al., 2011, FIGUEIREDO et al., 2008; MS 2010a), reemergindo após 30 anos da sua primeira detecção no país, no ano de 1982 (OSANAI et al., 1983). A co-circulação e a alternância de tipos vêm ocorrendo em muitas regiões do Brasil, o que pode ser um sinal de alerta para  
5 a possibilidade de crescimento da circulação de um determinado sorotipo na próxima estação de transmissão (MS, 2010b).

O YFV ocorre em regiões tropicais da África e América do Sul e cerca de 200.000 casos e 30.000 mortes são notificados anualmente. Acredita-se que com os casos não notificados, esses números possam alcançar valores de 10 a  
10 50 vezes maior. Não há relatos da circulação do vírus na Ásia, embora o continente seja considerado vulnerável à introdução do YFV (MONATH, 2001; PIERSON; DIAMOND, 2013).

Na América do Sul, o YFV ocorre principalmente na região Amazônica (MONATH, 2001). A maior epidemia de YFV urbana no Novo Mundo aconteceu  
15 após o término da intensa campanha para erradicação do *A. aegypti* nas Américas, mosquito vetor do YFV e de outros arbovírus. Porém, mesmo com essa ressurgência do *A. aegypti* e reemergência da DENV na América do Sul, o YFV ainda se manteve como uma doença zoonótica no continente (WEAVER; REISEN, 2010). Em 2008, uma epidemia urbana no Paraguai,  
20 causada pelo YFV, sugeriu uma reemergência do vírus na população. A epidemia foi logo controlada devido a uma intensa campanha de vacinação do governo. Esse surto pode ter ocorrido principalmente por causa do desmatamento de áreas silvestres e evidencia a importância da manutenção da vacinação em massa (WEAVER; REISEN, 2010). No Brasil, entre os anos  
25 de 2008 e 2009, foram relatados três surtos da doença causada pelo YFV, um em Minas Gerais, resultando em 63 casos (RIBEIRO; ANTUNES, 2009); um segundo surto região sudeste do estado do Rio Grande do Sul, resultado em 21 casos e 9 mortes e um terceiro, com 28 casos e 11 mortes relatados no estado de São Paulo (MASCHERETTI et al., 2013; ROMANO et al., 2014)

O SLEV distribui-se por todo continente americano, sendo encontrado do  
30 Canadá até a Argentina (RODRIGUES et al., 2010). Infecções pelo SLEV já foram descritas nos Estados Unidos e, com menor frequência, nas Américas Central e do Sul. Casos de doença causadas pelo SLEV são raras, com epidemias esporádicas em áreas tropicais e geralmente acompanhadas por um

aumento no número de aves e mosquitos infectados pelo vírus (MAY et al., 2008).

No Brasil, 5% da população que vive no norte e no sul do país já foram detectadas contendo anticorpos contra o SLEV. Na região sudeste do Brasil, o vírus já foi isolado de roedores e pássaros (FIGUEIREDO, 2000). O primeiro caso da doença no Brasil foi relatado em 2004, quando o vírus foi isolado do soro de um paciente com doença febril, no estado de São Paulo (ROCCO et al., 2005). Em 2006, um estudo sorológico em pássaros detectou uma alta prevalência dos anticorpos anti-SLEV na população estudada (TERZIAN et al., 2011). A soroprevalência em cavalos varia de 3% a 43% (MAIA et al., 2014). Em 2006 ocorreu o primeiro surto da doença no país, quando 12 pacientes com suspeita de dengue foram confirmados como infectados pelo SLEV (MONDINI et al., 2007b). Em 2008, foi confirmada a infecção pelo SLEV em um homem de 74 anos, morador da cidade de Ribeirão Preto, que primeiramente havia sido diagnosticado com dengue (MAIA et al., 2014).

O WNV é considerado o vírus mais amplamente distribuído (HUANG et al., 2014), sendo encontrado em todos os continentes, com exceção da Antártida (WEAVER; REISEN, 2010). Nas américas, o primeiro relato de surto causado pelo WNV foi em Nova Iorque em 1999, causando 7 mortes. Na última década, o vírus se espalhou por todos os EUA e já foi encontrado no Canadá, México, Caribe e América do Sul (PIERSON; DIAMOND, 2013).

No Brasil, os casos de circulação do WNV são recentes, com o primeiro relato de soroprevalência do vírus em 172 cavalos da região do Pantanal, em 2009 (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014). A partir daí, outros estudos demonstraram a presença de anticorpos anti-WNV em pássaros e cavalos em diferentes regiões do Brasil (OMETTO et al., 2013; PÉREZ-RAMÍREZ; LLORENTE; JIMÉNEZ-CLAVERO, 2014; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). No ano de 2014, foi relatado o primeiro caso de WNV em um trabalhador rural do estado do Piauí. A confirmação foi feita por testes sorológicos e o caso foi considerado como isolado, sem identificação de cadeia de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país tropical de grande extensão territorial, com mais de um  
5 terço recoberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais com  
condições ideais para a ocorrência de diversas arboviroses, as quais são  
mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos. Dentro deste cenário,  
Minas Gerais abriga um dos biomas mais importantes do Brasil, a Mata  
Atlântica, considerado '*hotspot*', ou seja, região com uma rica biodiversidade.  
10 Esses fatores somados as diferenças climáticas, a grande variação latitudinal e  
as variadas tipologias vegetacionais do estado, propiciam a ocorrência de  
áreas com elevados índices de diversidade e endemismo de mamíferos.

Estudos de animais reservatórios são de grande importância na vigilância  
de viroses zoonóticas emergentes, ainda mais quando os estudos estão  
15 integrados a medidas de saúde pública. Geralmente, as respostas para a  
ressurgência de patógenos infecciosos é multifatorial e entender cada etapa  
desse processo é válido na hora de se estabelecer medidas de prevenção e/ou  
profiláticas no combate aos causadores e à doença.

A invasão dos ambientes naturais pelo homem, causada pelo aumento  
20 populacional, permitiu a entrada do homem em um novo ambiente,  
promovendo uma oportunidade de contato do antropológico com o silvestre,  
principalmente através da diminuição ou fragmentação do hábitat de animais  
silvestres. Somado a isso, as mudanças climáticas permitiram a expansão de  
condições favoráveis para diversos vetores, remodelando o potencial dinâmico  
25 para emergência e reemergência das zoonoses. Estudos de vigilância em  
animais reservatórios e vetores invertebrados podem ajudar a explicar a  
circulação dos patógenos nos hospedeiros bem como observar o padrão de  
transmissão de zoonoses.

Hoje já são conhecidos mais de 530 arbovírus no mundo, mais de 200 no  
30 Brasil, sendo que aproximadamente 100 deles são patogênicos ao homem,  
produzindo desde doença febril inespecífica até encefalites e febres  
hemorrágicas de alta gravidade. Entre eles estão vírus de distribuição  
intercontinental como o DENV, o YFV e o WNV.

Mudanças climáticas globais são a maior causa na alteração de hábitat de artrópodes transmissores de arbovírus. A expansão geográfica do hábitat desses mosquitos pode explicar a reemergência de doenças como dengue e febre amarela na América do Sul, África e Ásia. Muitos desses vetores vêm sendo encontrados constantemente em regiões urbanas e peri-urbanas de áreas recém ocupadas e modificadas pela ação antrópica.

Nas Américas, existe um potencial para estabelecimento do DENV silvestre, principalmente pelo desmatamento de áreas silvestres e pelo rápido crescimento da população humana em áreas de florestas tropicais. Além disso, especula-se que poucas alterações genéticas seriam necessárias para que o vírus silvestre se adaptasse ao homem e a espécies urbanas de *Aedes sp.*. No Brasil, o DENV já foi detectado em outras espécies de mosquitos, como a espécie silvática de *Haemogogus* e a peri-doméstica *A. albopictus*, podendo estes mosquitos serem também potenciais vetores do DENV no ambiente silvestre e peri-urbano.

A existência de diferentes espécies de *Aedes* que podem ser vetores de arbovírus somada à grande abundância de *A. scapularis*, mosquito já descrito como potencial vetor de YFV e ROCV, em uma região endêmica de dengue justifica a proposta deste trabalho, de verificar se estes mosquitos estão naturalmente infectados com DENV, YFV, SLEV e ROCV no ambiente urbano de Montes Claros. A detecção de DENV em *A. scapularis* poderia ser decorrente da invasão de um DENV silvestre no ambiente urbano ou mesmo da adaptação do DENV urbano a uma nova espécie de vetor silvestre que invadiu o ambiente urbano. Além disso, a investigação da infecção de *A. scapularis* e outros culicídeos em Montes Claros por diferentes arbovírus também tem grande importância do ponto de vista epidemiológico, permitindo verificar quais vírus com potencial de causar infecções em humanos estão circulando na região, o que também pode nortear medidas de controle destes mosquitos na região.

Além dos vetores, a busca por possíveis animais reservatórios, que podem manter o vírus no ambiente, também justifica a segunda proposta deste trabalho, de realizar a prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos que podem ser reservatórios destes vírus. Os roedores já foram descritos como reservatórios de diversos vírus, como hantavírus e arenavírus, inclusive de

alguns flavivírus como TBEV e WNV. A presença destes animais em ambiente urbano ou peri-urbano pode favorecer o estabelecimento de doenças emergentes na população humana, além de aumentar o risco de infecção de animais domésticos e de criação. A investigação de pequenos mamíferos como

5 reservatórios de flavivírus em uma área de mata, recentemente ocupada pelo homem, pode vir a contribuir para a implantação de medidas profiláticas e campanhas para conscientização da população.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

5

Investigar espécies de culicídeos e pequenos mamíferos naturalmente infectados por flavivírus, em Minas Gerais, Brasil.

10

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Investigar a infecção por flavivírus em culicídeos, coletados na UNIMONTES em períodos epidêmicos no ano de 2012, na cidade de Montes Claros, Minas Gerais.

15

- Investigar a infecção por flavivírus em pequenos mamíferos, pertencentes à coleção-ECOVIR, composta por animais provenientes de peri-domicílio e rurais, durante os anos de 2012 e 2013, em uma área de Mata Atlântica, no IFET Sudeste de Minas, localizado no município de Rio Pomba, Minas Gerais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Prospecção de flavivírus em culicídeos

5

#### 4.1.1 Coleta de culicídeos

Os mosquitos foram coletados no Campus Darcy Ribeiro da Universidade Estadual de Montes Claros. As coletas foram realizadas de fevereiro a abril de 10 2012, por pesquisadores colaboradores da UNIMONTES, liderados pelo Dr. Magno Augusto Zazá Borges, que possui licença válida, liberada pelo IBAMA, para coleta, captura e transporte de culicídeos.

As coletas foram realizadas utilizando armadilha tipo Shannon (Figura 6a), no início do crepúsculo vespertino com duração de três horas de coleta, 15 coincidindo com o pico de atividade das espécies-alvo (FORATINI; GOMES, 1988). Também foram instaladas armadilhas elétricas BG Sentinel® (Figura 6b) (KRÖCKEL et al. 2006), no início da manhã (07h) e recolhidas no final da tarde (18h). Os espécimes coletados foram transportados ao Laboratório de Controle Biológico da UNIMONTES. Espécimes coletados no estágio larvar 20 completaram o desenvolvimento em estufa do tipo B.O.D (*biological oxygen demand*), em copos plásticos com água, cobertos com filó, a 28°C. Após a eclosão, todos os espécimes foram identificados utilizando as chaves de taxonômicas de Consoli & Lourenço-De-Oliveira (1994).



25

Figura 6: Armadilhas utilizadas na captura dos culicídeos. (a): armadilha do tipo Shannon e (b): armadilha elétrica BG Sentinel®

Foram coletados 4.210 culicídeos, no Campus Darcy Ribeiro, no período de fevereiro a abril de 2012, pela equipe do Laboratório de Entomologia da UNIMONTES. Dentre estes, estão representantes das espécies *Aedes scapularis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Psorophora sp.* e *Limatus sp.*, sendo a grande maioria, 4.120 mosquitos, pertencentes à espécie *A. scapularis* (Tabela 1 e Apêndice A). Os culicídeos foram alocados em *pools* de 20 indivíduos em criotubos e armazenados a -70°C. Para formação dos *pools*, consideraram-se informações como data, local, sexo e estágio de desenvolvimento no momento da coleta dos culicídeos. Os *pools* de mosquitos foram transportados ao Laboratório de Virologia-UFJF, em isopor com gelo seco.

Tabela 1: Espécies de culicídeos coletadas em Montes Claros, de fevereiro a abril de 2012, no Campus UNIMONTES-MG.

Espécie	Número de espécimes
<i>Aedes scapularis</i>	4.120
<i>Aedes aegypti</i>	51
<i>Aedes albopictus</i>	07
<i>Psorophoraferox</i>	22
<i>Psorophoralanei</i>	03
<i>Psorophoraalbigenu</i>	01
<i>Psorophoraciliata</i>	04
<i>Limatusdurhamii</i>	02

15

Do total de mosquitos coletados, 92 *pools*, 1.662 culicídeos, foram coletados no estágio de larva e completaram seu desenvolvimento no laboratório. Quarenta e um *pools*, totalizando 758 mosquitos, foram formados por mosquitos *A. scapularis* fêmeas, coletadas na fase adulta; 35 *pools*, totalizando 589 mosquitos, foram formados por machos de *A. scapularis* também coletados na fase adulta. Um total de 1.111 indivíduos de *A. scapularis* não foi possível determinar o sexo pois o espécime foi danificado durante a manipulação para retirada da armadilha e eles foram alocados em 59 *pools*. Mosquitos da espécie *A. aegypti* e *A. albopictus*, formaram 15 *pools*,

20

totalizando 57 mosquitos. Quinze *pools* foram formados por mosquitos dos gêneros *Psorophora sp.* e *Limatus sp.*, totalizando 32 espécimes (Apêndice A).

Do total de *pools* coletados foram escolhidos *pools* para os testes de detecção molecular de flavivírus, de acordo com a espécie, gênero, estágio de desenvolvimento no momento da coleta (larva ou adulto), data e local da coleta. Foi estipulado que todos os indivíduos da espécie *A. scapularis*, fêmeas, coletadas na fase adulta, seriam testados, perfazendo um total de 39 *pools*. Devido à baixa quantidade de *pools* das outras espécies de *Aedes sp.*, somado ao pequeno número de *pools* de *Psorophora sp.* e *Limatus sp.*, foi decidido testar todos esses mosquitos, totalizando 30 *pools*. O restante dos *pools* testados é composto por machos e fêmeas de *A. scapularis*, coletados no estágio larval e que completaram seu desenvolvimento em laboratório (18 *pools*) e mosquitos machos coletados adultos (6 *pools*). Com isso, foram escolhidos 96 *pools* para detecção do DENV (APÊNDICE B). Posteriormente, dentre os 96 *pools* escolhidos, 69 *pools* foram testados para presença de YFV, ROCV e SLEV, pelo protocolo de Bronzoni e colaboradores (2005). Para os experimentos com estes flavivírus (YFV, ROCV e SLEV), foram excluídos todos os *pools* formados por espécimes coletados na fase larval e os *pools* formados por machos coletados na fase de adulto, levando-se em conta a baixa probabilidade de larvas e machos estarem naturalmente infectados por flavivírus, quando comparados com fêmeas adultas (APÊNDICE B).

Estudos já demonstraram que a transmissão transovariana em mosquitos ocorre para alguns vírus, como DENV e YFV (HUANG et al., 2014; JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002; VILELA et al., 2010) mas a taxa de larvas infectadas é baixa, chegando a 2% de positividade (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002; VILELA et al., 2010) e, devido a isso, decidiu-se priorizar os testes para detecção de flavivírus dos mosquitos coletados já adultos, testando apenas alguns dos *pools* formados por mosquitos que foram coletados no estágio larval, fazendo a análise de ao menos um *pool*, por data de coleta. A escolha por analisar todos os *pools* formados por mosquitos fêmeas, coletadas na fase adulta, se explica porque é a fêmea do mosquito que realiza o repasto sanguíneo e, neste momento, pode se infectar com diferentes patógenos, como os arbovírus. Como a transmissão sexual do DENV em mosquitos já foi

relatada (ROSEN, 1987), decidiu-se testar alguns *pools* de mosquitos formados por machos.

#### 5      **4.1.2 Extração de RNA total de mosquitos**

A cada *pool* de mosquitos foram adicionados 250  $\mu$ L de salina fosfatada (PBS - NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM) e os mosquitos foram macerados com o auxílio de pistilos plásticos estéreis e macerador automático (10 *Pellet pestle, disposable cordless motor*, Sigma-Aldrich). Em seguida, o macerado foi centrifugado a 4.000 x *g*, por 3 minutos. Do sobrenadante obtido, 150  $\mu$ L foram aliquotados em um microtubo novo e armazenado a -70°C. O restante do sobrenadante e macerado, totalizando aproximadamente 100  $\mu$ l, foi usado para extração de RNA total pelo método do TRI Reagente® (Sigma-15 Aldrich), de acordo com especificações do fabricante. Foram adicionados 1,0 ml de TRI Reagente® a cada amostra, a mistura foi homogeneizada e as amostras foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente (t.a.). Posteriormente foram adicionados 200  $\mu$ l de clorofórmio e os tubos foram agitados vigorosamente, seguido de incubação por 3 minutos, à t.a.. Os tubos 20 foram centrifugados por 15 minutos, 12.000 x *g*. Após essa etapa apareciam três diferentes fases no tubo, uma fase fenol-clorofórmio, rosa no fundo, que continha DNA e proteínas, uma esbranquiçada intermediária, com material orgânico e uma transparente por cima, onde estava presente o RNA total do tecido alvo. A fase transparente foi transferida para um novo tubo com o auxílio 25 de uma micropipeta. Ao novo tubo, contendo a fase transparente da etapa anterior, foram adicionados 500  $\mu$ l de isopropanol e incubado por 10 minutos, à t.a., seguido por centrifugação durante 10 minutos, a 12.000 x *g*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, restando um precipitado transparente no fundo do tubo, ao qual foram adicionados 1,0 ml de etanol 75% 30 e homogeneizados em agitador do tipo vortex, por aproximadamente 15 segundos. Foi realizada mais uma centrifugação por 5 minutos, a 7.000 x *g*, com o sobrenadante sendo descartado e restando um precipitado em consistência de gel no fundo do tubo. A esse precipitado foram adicionados 60  $\mu$ l de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPc), para eluição do RNA total

extraído. O RNA total extraído foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até seu uso em reação de transcrição reversa (RT).

#### 5 4.1.3 Detecção de flavivírus por RT-PCR

Os RNAs obtidos de *pools* de mosquitos foram usados para detecção de DENV, YFV, ROCV e SLEV (Tabela 2), pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, precedida de transcrição reversa (RT-PCR). As reações  
10 foram feitas usando iniciadores específicos (Tabelas 3 e 4), de acordo com metodologia estabelecida por Bronzoni e colaboradores (2005) e Lanciotti e colaboradores (1992).

Os controles positivos usados nestas reações foram sobrenadantes de cultura de células, infectadas com os quatro tipos do DENV, gentilmente  
15 cedidos pela Profa. Dra. Erna G. Kroon – Laboratório de vírus – UFMG.

Tabela 2: Espécimes de culicídeos coletados e testados para DENV, YFV, SLEV e ROCV.

Espécie	Mês	Nº de indivíduos testados/mês	Total de indivíduos coletados/mês	Total de <i>pools</i> coletados	Total de <i>pools</i> testados	% de <i>pools</i> testados
<i>Aedes scapularis</i>	fevereiro	60	159	06	03	50%
<i>Aedes scapularis</i>	abril	873	3961	227	68	29,95%
<i>Aedes aegypti</i>	março	27	27	4	4	100%
<i>Aedes aegypti</i>	abril	24	24	8	8	100%
<i>Aedes albopictus</i>	abril	07	07	3	3	100%
<i>Psorophora ferox</i>	fevereiro	04	04	3	3	100%
<i>Psorophora ferox</i>	abril	18	18	4	4	100%
<i>Psorophora laneii</i>	fevereiro	03	03	1	1	100%
<i>Psorophora albigena</i>	fevereiro	01	01	1	1	100%
<i>Psorophora ciliata</i>	abril	04	04	3	3	100%
<i>Limatus durhamii</i>	abril	02	02	2	2	100%

Tabela 3: Iniciadores utilizados na detecção do vírus da dengue

Iniciadores (polaridade)	Sequência (5' - 3')	Tamanho esperado dos produtos (pb)
D1 (+)	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA G	511
D2 (-)	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TC	
TS1R (-)	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	482*
TS2R (-)	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	119*
TS3R (-)	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	290*
TS4R (-)	CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A	392*

Os iniciadores possuem como alvo a região codificadora das proteínas virais C e prM \*Tamanho esperado dos produtos gerados, usando os iniciadores senso negativo (-) específicos e o iniciador senso positivo (+) D1. Fonte: LANCIOTTI et al., 1992.

5

Tabela 4: Iniciadores utilizados na detecção de vírus rocio (ROCV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

Iniciadores (polaridade)	Sequência (5' - 3')	Tamanho esperado dos produtos (pb)
<b>Iniciadores gênero-específico para <i>Flavivirus</i></b>		
FG1 (+)	TCA AGG AAC TCC ACA CAT GAG ATG TAC T	1000
FG2 (-)	GTG TCC CAT CCT GCT GTG TCA TCA GCA TAC A	
<b>Iniciadores espécie-específico para <i>Flavivirus</i></b>		
ROCV (-)	TCA CTC TTC AGC CTT TCG	230*
YFV (-)	TCA GAA GAC CAA GAG GTC ATG T	253*
SLEV (-)	ATT CTT CTC TCA ATC TCC GT	232*

10 Os iniciadores possuem como alvo a região codificadora da proteína viral NS5. \*Tamanho esperado dos produtos gerados após amplificação usando os iniciadores senso negativo (-) específicos e o iniciador senso positivo (+) FG1. Fonte: BRONZONI et al., 2005.

#### 15 4.1.3.1 RT-PCR - Método de Lanciotti e colaboradores (1992)

Em um primeiro momento, foram utilizados iniciadores que têm como alvo partes das regiões codificadoras das proteínas C e prM para síntese de cDNA (usando o iniciador de senso negativo D2) por RT e amplificação (usando os dois iniciadores, D1 e D2). Em seguida, foi realizada uma *Semi-Nested-PCR* contendo iniciadores específicos para os quatro tipos de DENV, juntamente com o iniciador D1 (Tabela 3).

20

Um volume de 8 µl do RNA total extraído do *pool* de mosquitos (500 ng), juntamente com 3 µl do iniciador D2 (10 pmol/µl) anti-senso foram incubados a 70°C, por 10 minutos. Após esta incubação, em banho de gelo foi adicionado uma mistura à reação, contendo: 4 µl de tampão de RT-PCR 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Promega), 1,25 µl de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (25 mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 2,0 µl de ditioneitol 0,5M (DTT, Promega), 1,0 µl da enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Promega - 200U/µl,) e água ultra pura tratada com DEPC (q.s.p. 20µl). Essa mistura foi então incubada a 42°C, por 60 minutos, a 70°C por 10 minutos e o produto da reação foi armazenado a -20°C.

Para a PCR, a 1,0 µl do cDNA foram adicionados 2,5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 0,7 µl de dNTPs (25mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 0,2 µl de cada iniciador (D1 e D2) (10 pmol/µl), 0,25 µl de Taq polimerase (2 U/µl, Promega) e água ultra pura (q.s.p. 25 µl). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 50 segundos; pareamento a 55°C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 50 segundos. Ao final, houve uma extensão final a 72°C, por 7 minutos.

Para a *Semi-Nested* PCR, a 1,0 µl do produto da primeira PCR foram adicionados 2,5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega), 0,7 µl de dNTPs (25 mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 0,1 µl do iniciador senso D1, 0,1 µl do iniciador específico para cada sorotipo de DENV (TS1R, TS2R, TS3R, TS4R – 10 pmol/µl), 0,25 µl de Taq polimerase (2 U/µl, Promega) e água ultra pura (q.s.p. 25 µl). As condições de amplificação foram as mesmas usadas na primeira PCR.

#### 4.1.3.2 RT-PCR - Método de Bronzoni e colaboradores (2005)

Os RNA extraídos foram submetidos a uma nova síntese de cDNA por RT, a partir de iniciadores que tem como alvo a região codificadora da proteína NS5,

para então serem investigados os outros flavivírus propostos no trabalho (Tabela 4).

Um volume de 8 µl do RNA total extraído dos *pools* de mosquitos (500 ng), juntamente com 2,0 µl do iniciador anti-senso FG2 (15 pmol/µl) foram  
5 incubados a 70°C, por 10 minutos. Após a incubação, em banho de gelo foi adicionado uma mistura à reação, contendo: 4,0 µl de tampão de RT-PCR 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Promega), 1,25 µl de dNTPs (25 mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 2,0 µl de DTT 0,5M (Promega), 1,0 µl da enzima M-MLV RT (200U/µl, Promega) e água ultra pura  
10 tratada com DEPC (q.s.p. 20µl). Essa mistura foi então incubada a 42°C, por 60 minutos; a 70°C, por 10 minutos e posteriormente o produto da reação foi armazenado a -20°C.

Para a PCR, 5,0 µl do cDNA obtido foram incubados com 2,5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
15 (Promega), 0,25 µl de dNTPs (25 mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 0,7 µl de cada iniciador (FG1 e FG2 – 15 pmol/µl), 0,4 µl de Taq polimerase (2 U/µl, Promega) e água ultrapura (q.s.p. 25 µl). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 50 segundos; pareamento a 55°C, por 50 segundos e  
20 extensão a 72°C, por 50 segundos. Após o ciclo, ocorreu uma extensão final a 72°C, por 7 minutos.

Para a *Semi-Nested-PCR*, a 1,0 µl do produto da primeira PCR foram adicionados 2,5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega), 0,25 µl de dNTPs (25 mM de  
25 cada dNTP, Ludwig Biotech), 0,7µl do iniciador senso FG1 (15 pmol/µl), 0,7 µl do iniciador específico para cada flavivírus (YFV, ROCV e SLEV - 15 pmol/µl), 0,4 µl de Taq polimerase (2 U/µl, Promega) e água ultra pura (q.s.p. 25 µl). As condições de amplificação foram as mesmas usadas na primeira PCR. Amostras consideradas positivas no PCR foram também testadas por qPCR,  
30 como descrito no item 4.2.3.

#### 4.1.4 Análise dos produtos de PCR

Um volume de 10 µl do produto da *Semi-Nested-PCR* foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 110V, por 70 minutos. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Ludwig Biotech). Os géis foram corados com nitrato de prata. Para a coloração, os géis foram fixados em solução fixadora 1 (40% metanol, 10% ácido acético, 50% H<sub>2</sub>O), seguido da solução fixadora 2 (10% etanol, 5% ácido acético, 85% H<sub>2</sub>O), sob agitação constante de 45 rpm, por 30 minutos, em cada solução. Posteriormente foi adicionada a solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M e ácido nítrico 0,032 M) e o gel foi incubado por 10 minutos, sob agitação constante de 45 rpm. Os géis foram lavados com água destilada e foi adicionada a solução de nitrato de prata (0,2 g de AgNO<sub>3</sub>, 100 ml de água), na qual o gel foi incubado em agitação constante de 45 rpm, por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram lavados com água destilada para então ser adicionada a solução reveladora (2,93 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05 g de paraformaldeído, 100 ml de água), até atingir a coloração desejada. (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A coloração do gel foi interrompida com a mistura das soluções fixadora 1 e 2. O gel foi visualizado em negatoscópio (Tele-panorâmico, Blue equipamentos).

### 4.2 Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos

#### 4.2.1 Coleção de órgãos e tecidos de pequenos mamíferos silvestres

Neste estudo, foi utilizada parte de uma Coleção de pequenos mamíferos silvestres, pertencente ao grupo de pesquisa ECOVIR, liderado pela Dra. Giliane de Souza Trindade. Faz parte desta coleção (Col-ECOVIR) carcaças, órgãos, soro e tecidos de pequenos mamíferos coletados no período de outubro de 2012 a agosto de 2013, em área de Mata Atlântica e de Cerrado. A coleta de pequenos mamíferos na área de Mata Atlântica foi feita em uma propriedade rural, pertencente à fazenda do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia (IFET) Sudeste de Minas, no município de Rio Pomba, localizada na região da Zona da Mata mineira. A coleta de pequenos

mamíferos, na área de Cerrado, foi feita na região da Serra do Espinhaço, em duas fazendas de produção de leite no município do Serro, MG. Todas as coletas dos animais que fazem parte da Col-ECOVIR foram realizadas por pesquisadores colaboradores da UFMG, coordenados pelo Dr. Adriano Págliá, que possui licença de coleta válida e permanente, concedida pelo IBAMA. Os órgãos, soro e tecidos desta coleção estão preservados em conservante (*RNAlater*, LifeTechnologies) a  $-70^{\circ}\text{C}$  e/ou em nitrogênio líquido ( $-186^{\circ}\text{C}$ ), no Laboratório de Vírus da UFMG.

No presente trabalho, foram usados o fígado e o soro de animais provenientes da região de Mata Atlântica. Todos os animais coletados passaram por punção cardíaca e, sendo assim, a Col-ECOVIR conta com amostras de soro de todos os animais capturados. Alguns destes animais capturados foram sacrificados e, destes animais, também tem-se as amostras de fígado e outros órgãos (Tabela 5, Apêndice C).

Dos 173 espécimes coletados em região de Mata Atlântica, pertencentes à Col-ECOVIR e utilizados neste trabalho (Tabela 5), foi realizada a extração de RNA total do soro de 115 animais e extração de RNA total a partir do fígado de 54 animais (Apêndice C). Estas amostras de RNA total foram então usadas para a síntese de cDNA e posterior detecção de flavivírus.

#### **4.2.2 Extração RNA total a partir de soro e/ou fígado de pequenos mamíferos**

O processamento do fígado dos pequenos mamíferos foi feito segundo FERREIRA et al. (2008). As amostras foram maceradas na concentração 1:10 peso/volume em PBS e centrifugadas a  $2.000 \times g$ , por 3 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido do fígado e o soro coletado dos animais foram utilizados para a extração de RNA total, usando o kit Qiagen viral RNA Midi kit (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante. As amostras extraídas de RNA total foram quantificadas, usando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 5- Espécimes de pequenos mamíferos coletados em região de Mata Atlântica, que fazem parte da Coleção-ECOVIR.

Classificação	Espécie	Número de indivíduos
	<i>Calomys tener</i>	55
	<i>Calomys sp.</i>	20
	<i>Akodon cursor</i>	18
	<i>Akodon sp.</i>	31
Roedor	<i>Necromys lasiurus</i>	18
	<i>Oligoryzomys sp.</i>	07
	<i>Juliomys sp.</i>	02
	<i>Nectomys squampis</i>	01
	<i>Gerlinguetus ingrami</i>	01
	<i>Didelphis aurita.</i>	09
	<i>Gracilianus</i>	08
Marsupial	<i>microtarsus</i>	01
	<i>Monodelphis sp.</i>	01
	<i>Caluromy sp.</i>	01

5

#### 4.2.3 Detecção de flavivírus por RT-qPCR

Para a detecção de flavivírus a partir de soro e fígado de pequenos mamíferos, foi realizada a síntese de cDNA com oligonucleotídeos aleatórios, utilizando-se a enzima SuperScript II (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos foram diluídos na proporção 1:5 e utilizados na reação de PCR em tempo real (qPCR), com a finalidade de detecção de flavivírus.

A detecção de flavivírus foi feita utilizando-se de duas reações de qPCR, usando 2 pares distintos de iniciadores, Flavi-1 e Flavi-2, que tem como alvo sequências de genoma de 8 flavivírus. O par de iniciadores Flavi-1 tem como alvo sequências codificadoras de parte da proteína NS5 dos vírus YFV, DENV-2, WNV e JEV. O par de iniciadores Flavi-2 tem como alvo sequências

codificadoras de parte da proteína NS5 dos vírus SLEV, DENV-1, DENV-3 e DENV-4 (Tabela 6). Os iniciadores foram desenhados e as condições das qPCRs foram estabelecidas pelo pesquisador colaborador, Pedro A. Alves (dados não publicados- Laboratório de Virus - UFMG).

5

Tabela 6 Iniciadores utilizados na detecção de flavivírus, por qPCR.

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Vírus alvo	Tamanho esperado dos produtos (pb)	T <sub>m</sub> esperado dos produtos
<b>Flavi-1</b>				
FWD	CAACATGATGGGGAAAAGAGAGAAGAAG	YFV, DENV-2, WNV, JEV	113	78°C
REV	GCTCCAAGCCACATGTACCATATG			
<b>Flavi-2</b>				
FWD	ATGATGGGGAAGCGTGAGAA	SLEV, DENV 1, 3 e 4	109	78°C
REV	GCTCCCAACCACATGTACCA			

Os iniciadores possuem como alvo a região codificadora da proteína viral NS5.

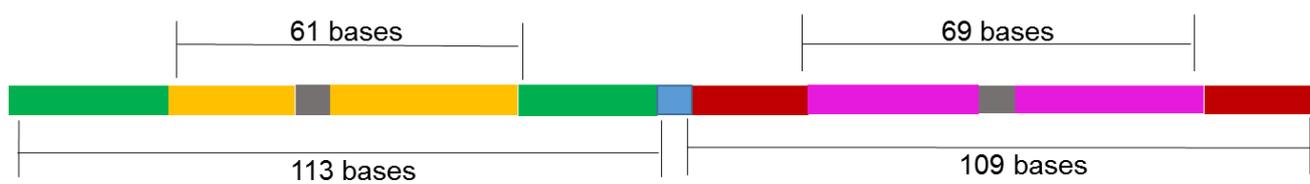
Como controle interno da reação de qPCR, foram utilizados iniciadores que amplificam a região do gene codificador para a beta actina de *Mus musculus* (Tabela 7). A reação para amplificação do gene constitutivo permite certificar que todas as etapas anteriores ao qPCR passaram no controle de qualidade e o material é de boa qualidade. Por ser um gene constitutivo dos mamíferos, a reação para beta actina sempre tem que ser positiva, pois espera-se que sempre exista RNA mensageiro deste gene nas amostras. Caso seja negativo, os passos anteriores ao qPCR devem ser analisados e repetidos.

Tabela 7: Iniciadores utilizados na reação de qPCR, para o gene controle da reação

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tamanho esperado dos produtos (pb)	T <sub>m</sub> esperado dos produtos
FWD	AAATCGTGCGTGACATCAAAGA	64	76°C
REV	GCCATCTCCTGCTCGAAGTC		

Os iniciadores possuem como alvo parte do gene codificador da proteína beta actina de *Mus musculus*. FONTE: SANTOS et al., 2014.

Para controle positivo das reações de qPCR foi sintetizado um fragmento de DNA sintético, desenhado pelo pesquisador colaborador, Pedro A. Alves (dados não publicados- Laboratório de Virus - UFMG), contendo regiões do genoma de flavivírus e regiões de ligação dos dois pares de iniciadores específicos (Figura 7). A utilização de DNAs sintéticos como controle positivo facilita nos casos em que não se tem o vírus desejado ou quando é necessário um determinado nível de biossegurança do laboratório para manipulação deste vírus. Nas sequências dos DNAs controle das reações usando os iniciadores Flavi-1 e Flavi-2, foram inseridos sítios para a enzima de restrição NcoI, de forma a se poder fazer a identificação de produto amplificado por contaminação com o DNA controle positivo. Como controle negativo das reações de qPCR foi utilizado água ultra-pura.



15 Figura 7: Esquema do DNA sintético usado como controle positivo nas reações de qPCR. Azul: Espaço contendo sítio para enzima de restrição PstI. Verde: região para ligação dos iniciadores Flavi-1-FWD e Flavi-1-REV. Amarelo: sequência interna amplificada pelos iniciadores Flavi-1. Cinza: sítio para enzima de restrição NcoI. Vermelho: região para ligação dos iniciadores Flavi-2-FWD e Flavi-2-REV de Flavi-2. Rosa: sequência interna amplificada pelos iniciadores Flavi-2.

O primeiro passo para realização da reação de qPCR, no Laboratório de Virologia da UFJF, foi a repetição das curvas padrão das duas qPCRs. A eficiência (Eff%) foi considerada satisfatória quando o seu valor encontrava-se no intervalo entre 95% e 105%, considerando-se o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) maior que 0,99 (BUSTIN et al., 2009). A curva padrão foi composta por sete pontos, diluídos serialmente, na proporção 1:10, partindo do ponto mais concentrado, que continha 1,0 ng/ $\mu$ l do DNA sintético, até o ponto menos concentrado, com 1,0 fg/ $\mu$ l do DNA sintético. O ponto mais diluído detectado, 1,0 fg/ $\mu$ l, corresponde a  $2,55 \times 10^2$  cópias de fitas do DNA.

A mistura de reação com o par de iniciadores Flavi-1 era composta por 5,0  $\mu$ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,8  $\mu$ l de cada iniciador (800 nM), 1,0  $\mu$ l de cDNA diluído e água ultra pura (q.s.p. 10  $\mu$ l). Para

a reação com o par de iniciadores Flavi-2, foram misturados 5,0 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,6 µl de cada iniciador (600 nM), 1,0 µl de cDNA diluído e água ultra pura (q.s.p. 10 µl).

5 A mistura da reação do controle interno era composta por 5,0 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µl dos iniciadores senso e não-senso juntos (2 pmol/µl), 1 µl de cDNA diluído e água ultra pura (q.s.p. 10 µl).

10 Todos os testes das amostras foram realizados em duplicata incluindo os controles positivos e negativos. As reações de qPCR foram feitas no Step OnePlus (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C, por 10 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95°C, por 15 segundos e pareamento e extensão, a 60°C, por 1 minuto. A curva de dissociação foi realizada após os 40 ciclos da PCR. Para isso, a temperatura, que partiu de 60°C, aumentava gradativamente, até que chegasse a 99°C.  
15 Todos os dados gerados eram capturados pela máquina e analisados ao término da reação.

Foram consideradas positivas as amostras que tinham produto amplificado, em ambas as duplicatas, que apresentavam temperatura de desnaturação ( $T_m$  – *melting temperature*) semelhante ou muito próxima da  $T_m$  esperada. A  $T_m$  é a temperatura em que metade das fitas de DNA está em fita dupla e a outra metade está como fita simples. Neste momento, há uma queda brusca da fluorescência capturada pela máquina e forma-se o pico da curva de  $T_m$ . Outro ponto analisado nas amostras positivas foi o ciclo de quantificação (*quantification cycle* –  $C_q$ ), que deveria estar abaixo de 35. O  $C_q$  é o ponto em  
20 que a fluorescência emitida pela amplificação daquela amostra ultrapassa a fluorescência basal da própria reação. A partir daí, podemos considerar que toda a fluorescência emitida naquele poço corresponde à amplificação de produto de PCR. Amostras que apenas uma replicata apresentava amplificação junto com a  $T_m$  do controle positivo foram consideradas suspeitas e o teste foi  
25 repetido.  
30

Além disso, em todos os experimentos realizados, foi analisado o gráfico da referência passiva (ROX), que normaliza pequenos erros de pipetagem durante a realização do qPCR. Casos em que o ROX apresentava desvios do padrão esperado eram repetidos.

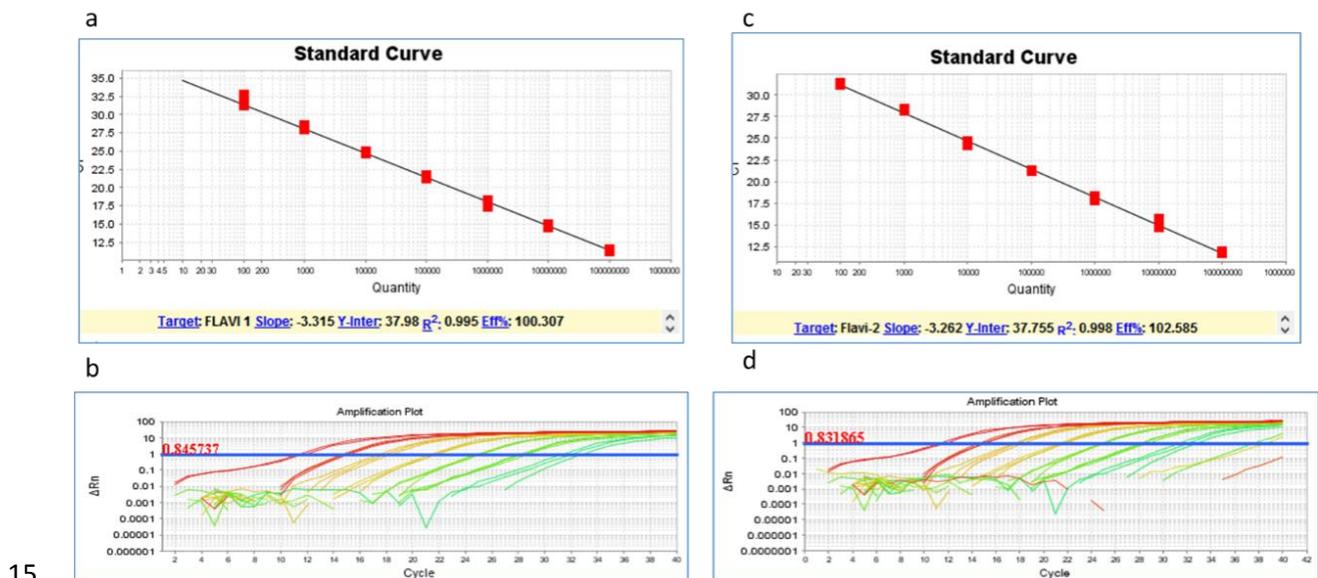
Para a confirmação do produto amplificado por qPCR, foi feita uma reação de digestão dos amplicons com a enzima de restrição NcoI (Thermo Scientific). Foram utilizados 2,0 µl do tampão da enzima 10x concentrado, 1,0 µl da enzima de restrição FastDigest NcoI, 10,0 µl do produto amplificado do qPCR água ultra pura (q. s. p. 30 µl). A mistura foi incubada a 37°C, por 3 horas, em termociclador. Em seguida, uma alíquota de 10 µl foi separada em gel de poliácridamida e os produtos visualizados após coloração como descrito anteriormente no item 4.1.4. O sítio de ligação da enzima NcoI foi inserido no meio dos fragmentos presentes no DNA sintético usado como controle positivo das reações e, com isso, conseguimos detectar se a amplificação detectada é proveniente da amostra ou de uma contaminação pelo controle positivo. Em caso de amplificação proveniente de contaminação com o DNA sintético, após a reação de digestão e visualização do produto digerido no gel de poliácridamida, os fragmentos observados deveriam conter aproximadamente 50 pb. Se a amostras fossem de fato positivas, os fragmentos observados estariam próximo aos 110 pb.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Testes das condições de qPCR

5

Inicialmente foram feitos os testes para análise da eficiência das reações de qPCR. A curva para Flavi-1 apresentou uma eficiência de 100,307%, com um valor de correlação de 0,995, enquanto que para a curva padrão para os iniciadores Flavi-2, a eficiência foi de 102,585% e o coeficiente de correlação, 0,998. A diferença de C<sub>q</sub> entre os pontos da curva padrão ficou dentro do limite aceitável quando se tem uma eficiência de 100%, que é de 3,33 ciclos de diferença entre um ponto menos diluído para o ponto mais diluído seguinte (Figura 8).



15

20

Figura 8: Curva padrão das reações de qPCR para detecção de Flavivírus. As curvas padrão foram feitas com diluições de DNA controle variando de  $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  (correspondente a variação em número de cópias de  $2,55 \times 10^8$  a  $2,55 \times 10^2$  cópias de DNA). Curva padrão usando os iniciadores Flavi-1 (a) e Flavi-2 (c). Gráficos de amplificação usando os iniciadores Flavi-1 (b) e Flavi-2 (d) Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

25

## 5.2 Prospecção de flavivírus em culicídeos

Dos 257 *pools* de culicídeos coletados, 96 *pools* foram testados para a presença de DENV (Apêndice A), sendo 64 *pools* de *A. scapularis*, 12 *pools* de *A. aegypti*, três *pools* de *A. albopictus*, 13 *pools* de *Psorophora sp.* e dois *pools* de *Limatus sp.*, segundo o protocolo de Lanciotti e colaboradores (1992).

Dos *pools* testados, um *pool* de *A. aegypti* apresentou, após separação do material amplificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, um amplicon, com tamanho entre 400 e 500 pb, sendo o amplicon estimado para DENV-1 de 482 pb (Apêndice A e Figura 9 – canaleta 7). Quando esta amostra foi testada no qPCR, ela não gerou amplicons (dados não mostrados).

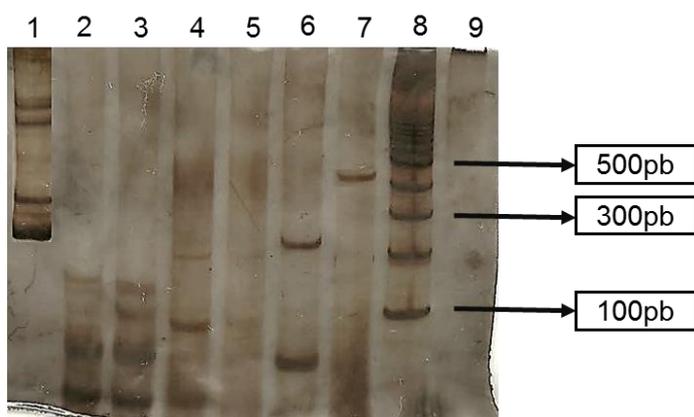


Figura 9: Gel de poliacrilamida contendo produtos de PCR separados por eletroforese. Canaleta 1: controle positivo, amostra controle de DENV-4 (fragmento esperado de 222 pb). Canaleta 2: produto de reação do *pool* MOC 31B (*A. scapularis*) testado para a presença de YFV (fragmento esperado de 253 pb). Canaleta 3: produto de reação do *pool* MOC 39A (*A. aegypti*) testado para a presença de YFV (fragmento esperado de 253 pb). Canaleta 4: produto de reação do *pool* MOC 46A (*A. albopictus*) testado para a presença de YFV (fragmento esperado de 253 pb). Canaleta 5: produto de reação do *pool* MOC 53A (*A. aegypti*) testado para a presença de YFV (fragmento esperado de 253 pb). Canaleta 6: Produto de reação do *pool* MOC 6A (*A. scapularis*), testado para a presença de ROCV (fragmento esperado de 230 pb). Canaleta 7: produto de reação do *pool* MOC 56A (*A. aegypti*), testado para a presença de DENV-1 (fragmento esperado de 482 pb). Canaleta 8: padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotech). Canaleta 9: controle negativo.

Sessenta e nove *pools* de mosquitos foram testados para presença de YFV, ROCV e SLEV (Apêndice A). Destes, 44 *pools* eram de *A. scapularis*, 12 *pools* de *A. aegypti*, três *pools* de *A. albopictus*, 13 *pools* de *Psorophora sp.* e

dois *pools* de *Limatus sp.* Dos *pools* testados, um *pool* de *A. scapularis* (amostra MOC 06 A), formado por fêmeas coletadas na fase adulta apresentou, após separação do material amplificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, um fragmento de tamanho próximo ao esperado para ROCV

5 (Apêndice A e Figura 9 – canaleta 6).

Quando este *pool* foi submetido à detecção de flavivírus por qPCR, usando os iniciadores Flavi-1 e Flavi-2, foi detectado um amplicon com  $T_m$  esperado, usando os iniciadores Flavi-1 (que tem como alvo os WNV, DENV-2, YFV e JEV). Quando este amplicon foi submetido à reação de digestão usando a

10 enzima NcoI, não foram gerados fragmentos de DNA após a digestão, sendo observado no gel, um fragmento em torno de 100 pb (Figura 10 – canaleta 1).

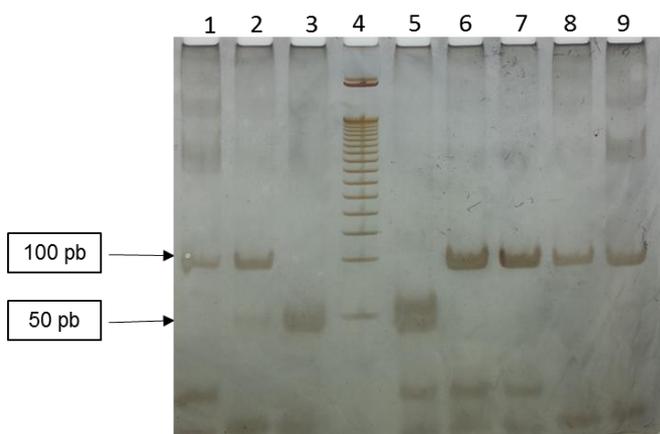


Figura 10: Gel de poliacrilamida após separação eletroforética de amplicons de qPCR submetidos à digestão com a enzima de restrição NcoI.

15 Canaleta 1: Produto da digestão com NcoI do amplicon da amostra MOC 6A (proveniente de *pool* de *Aedes scapularis*) com iniciadores Flavi-1.

Canaleta 2: Produto da digestão com NcoI do amplicon da amostra de fígado do animal 12, (proveniente de *Calomys sp.*) com iniciadores Flavi-2.

20 Canaleta 3: Produto da digestão com NcoI do amplicon da amostra MOC 6A (proveniente de *pool* de *Aedes scapularis*) com iniciadores Flavi-2.

Canaleta 4: Padrão de tamanho molecular 50 pb (Promega)

Canaleta 5: Produto da digestão com NcoI do amplicon proveniente do DNA sintético (controle positivo), com iniciadores Flavi-1.

25 Canaleta 6: Produto da digestão com NcoI do amplicon proveniente do cDNA de YFV, com iniciadores Flavi-1.

Canaleta 7: Produto da digestão com NcoI do amplicon proveniente do cDNA de DENV-2, com iniciadores Flavi-1.

Canaleta 8: Produto da digestão com NcoI do amplicon proveniente do cDNA de DENV-1, com

30 iniciadores Flavi-2.

Canaleta 9: Produto da digestão com NcoI do amplicon proveniente do cDNA de DENV-4, com iniciadores Flavi-2.

### 5.3 Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos

Das 54 amostras de fígado e 115 amostras de soro testadas, uma amostra foi positiva na reação usando os iniciadores Flavi-2 (que tem como  
5 alvo os vírus SLEV, DENV-1, DENV-3, DENV-4), no Cq 34. Esta amostra era proveniente de fígado de um espécime macho do gênero *Calomys sp* (animal 012), coletado no pasto, no mês de outubro de 2012.

Para confirmação da positividade desta amostra, o produto amplificado foi submetido à digestão com a enzima de restrição NcoI. Após a separação  
10 por eletroforese, foi observado um fragmento em torno de 100 pb, mostrando que o amplicon gerado pelo qPCR não foi digerido. Isso confirma que a amplificação observada é proveniente da amostra e não devido a uma contaminação pelo DNA sintético usado como controle positivo (Figura 10).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Prospecção de flavivírus em culicídeos

5

Dentre as espécies de mosquitos coletadas no campus Darcy Ribeiro, algumas já foram descritas como vetores de arbovírus, como *A. aegypti* e *A. albopictus* para DENV (FIGUEIREDO et al., 2010), *A. aegypti* para YFV (WEAVER; REISEN, 2010) e *A. scapularis* e *P. ferox* para ROCV (MITCHELL; FORATTINI; MILLER, 1986). Outras espécies de culicídeos também possuem um importante papel na transmissão de arbovírus, como o *Haemagogus leucocelaenus*, mosquito coletado em floresta tropical no Nordeste do Brasil, que já foi descrito como vetor de DENV, sugerindo uma adaptação do vírus silvestre a mosquitos com características predominantemente urbanas (FIGUEIREDO et al., 2010). *H. janthynomis*, *H. leucocelnus* e *Sabethes sp.* já foram descritos como potenciais vetores para YFV (VASCONCELOS et al., 2004). *Culex sp.* já foi descrito como vetor para o vírus da encefalite equina da Venezuela, vírus da encefalite equina, WNV, SLEV, JEV e outros (FIGUEIREDO, 2007).

20 Sendo Montes Claros uma cidade de médio porte e em crescente urbanização, a presença desta variedade de mosquitos vetores, observada neste estudo, pode representar um problema de saúde pública, uma vez que aumenta a chance de ocorrer a emergência de várias arboviroses na cidade, como ocorreu com a dengue. Montes Claros registrou suas primeiras epidemias da doença somente a partir de 1995 (SANTOS et al., 2011), mas em 25 2011 a cidade já estava entre os cinco municípios de Minas Gerais com maior número de casos notificados de dengue (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2011). Nos anos de 2013 e 2014, a incidência de dengue na cidade reduziu devido à falta de chuva, mas novos surtos ainda foram relatados, assim como muitas notificações e também óbitos. 30 (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2014).

Dentre os 257 *pools* de culicídeos coletados em Montes Claros, 96 *pools* foram testados para a presença do DENV e um *pool* de *A. aegypti* apresentou

um fragmento que poderia representar um amplicon a partir de DENV-1. Embora este resultado não tenha sido confirmado por qPCR, futuramente, será feito um experimento para o sequenciamento do fragmento amplificado para a verificação do resultado e, caso seja confirmada a positividade dessa amostra, a mesma será utilizada na tentativa de isolamento viral, análise de parte ou de todo o genoma do vírus e então será utilizada em ensaios posteriores para caracterização biológica e molecular do vírus.

Este resultado pode indicar a circulação de DENV-1, em Montes Claros. A circulação de DENV-1 no Brasil é caracterizada pela introdução, cocirculação e substituição de diferentes linhagens de vírus pertencentes ao genótipo V. As linhagens hoje circulantes no Brasil têm origem em diferentes locais e foram introduzidas de maneira independente, o que pode favorecer a emergência de vírus, com características biológicas distintas, gerando um quadro de agravamento da dengue no país (DRUMOND et al., 2012). O monitoramento do DENV é importante para que se possa detectar a circulação de linhagens mais virulentas ou que até então não circulavam no país (SANTOS et al., 2011). Por isso, a tentativa em isolar, sequenciar e caracterizar esse vírus é importante, a fim de se tentar identificar, não só qual o tipo do DENV circulante, mas também seus genótipos e linhagens.

Nesse trabalho, foi evidenciada a presença de muitos mosquitos da espécie *A. scapularis* na área e período amostrados, chegando a 100 vezes mais quando comparados com as outras espécies coletadas na mesma região e período. As larvas eram coletadas, principalmente, em coleções de água formadas após chuvas e, por isso, a coleta era abundante nestes períodos. Até o presente momento não se tem relatos de *A. scapularis* como vetor de DENV e dos 71 *pools* de *A. scapularis* analisados no presente trabalho, em nenhum deles foi detectado o material genético do DENV. Contudo, sabe-se que diferentes espécies do gênero *Aedes* podem transmitir o DENV (FIGUEIREDO et al., 2010; HUANG et al., 2014; VASILAKIS et al., 2007).

Por outro lado, o *A. scapularis* tem hábitos predominantemente silvestres e os quatro sorotipos de DENV estão envolvidos em dois ciclos de transmissão, um silvestre relacionado a primatas não humanos e espécies silvestres do gênero *Aedes*, e outro ciclo humano, envolvendo o homem como hospedeiro vertebrado e espécies domésticas de *Aedes sp.* como vetores. Ciclos silvestres

de DENV já foram demonstrados na Ásia e África. A detecção de conversão sorológica para DENV entre indígenas que vivem em partes remotas da Bolívia, onde não há a circulação de *A. aegypti*, somada ao fato de que todos os quatro sorotipos de DENV já foram isolados de várias espécies de mamíferos, como morcegos, roedores e marsupiais, principalmente (CHEN; VASILAKIS, 2011; DE THOISY et al., 2009), sugerem uma possível circulação do DENV silvestre nas Américas. A invasão desse DENV silvático no ambiente urbano pode ser facilitada por mosquitos com hábitos tipicamente silvestres, como é o caso do *Aedes scapularis*.

*A. scapularis* é tipicamente silvestre, mas a crescente urbanização e invasão de áreas de florestas pode ser um fator relacionado ao grande número desse mosquito observado em áreas urbanas da cidade de Montes Claros, norte de Minas Gerais. A ocorrência de *A. scapularis* em regiões urbanas de Montes Claros já foi detectada nos anos de 2011 e 2012, sempre após o período chuvoso, demonstrando uma possível invasão desta espécie no ambiente urbano, dependente das condições ambientais. Em 2013 e 2014, o mesmo não ocorreu devido à falta de chuva na cidade (BORGES, comunicação pessoal).

Outro fato que merece especial atenção frente a esta possível invasão do *A. scapularis* no ambiente urbano é a capacidade deste mosquito ser um vetor competente para outros flavivírus como YFV e ROCV. Mitchell & Forattini (1984) demonstraram que mosquitos do gênero *A. scapularis* coletados de região endêmica para o DENV no Brasil são um vetor eficiente para ROCV e em condições experimentais, esses mosquitos foram capazes de transmitir o vírus. Davis & Shannon (1929) demonstraram que os mesmos mosquitos, em condições experimentais, também são capazes de transmitir o YFV para macacos *Rhesus*. Embora no Brasil não existam relatos de manifestações clínicas, relacionadas ao vírus Rocio, desde 1980 (BURKE; MONATH, 2001; FIGUEIREDO, 2000; MITCHELL; FORATTINI, 1984), Straatmann et al. (1997) demonstraram, através de testes sorológicos, a presença de anticorpos anti-ROCV, em pacientes residentes no estado da Bahia e sem histórico de viagem para São Paulo, região endêmica para ROCV durante o surto de 1975 (BURKE; MONATH, 2001; FIGUEIREDO, 2000). A presença de anticorpos anti-ROCV em cavalos, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, deve

ser um alerta quanto à possibilidade do surgimento de novos casos de meningoencefalites causados pelo vírus (TERZIAN et al., 2011). Durante o período epidêmico do ROCV, na década de 1970, o vírus foi predominante em áreas rurais e de floresta. Com o aumento do desmatamento e invasão de áreas silvestres pelo homem, a reemergência desse vírus é possível, pois essa prática aumenta a chance do contato entre o homem e populações de insetos e animais que podem transmitir diferentes agentes infecciosos, inclusive o ROCV, ao homem. Muitas arboviroses reemergiram em áreas silvestres, após longos períodos de quiescência (LISIEUX et al., 2008).

No presente trabalho foi encontrado em um *pool* de *A. scapularis*, aparentemente infectado com flavivírus. Será realizado um sequenciamento desta amostra e se for confirmada a positividade da amostra, ela também será utilizada na tentativa de isolamento viral, para posterior sequenciamento e análise de parte ou de todo o genoma do vírus, para então, ser utilizada em ensaios para caracterização biológica e molecular do vírus.

## 6.2 Prospecção de flavivírus em pequenos mamíferos

A grande biodiversidade de mamíferos está intimamente relacionada ao aumento dos patógenos zoonóticos emergentes no mundo (SALKELD; PADGETT; JONES, 2013). Dos agentes infecciosos capazes de causar doenças ao homem, 60% possuem origem animal e esses patógenos possuem uma grande variedade de reservatórios, variando entre três ou mais. Isso indica a importância desses animais, principalmente os mamíferos, no ciclo zoonótico dos agentes infecciosos (LEVINSON et al., 2013; ROCHE; GUÉGAN, 2011). Os 173 espécimes da Col-ECOVIR utilizados neste trabalho, pertencem a diversos gêneros de importância na saúde pública como *Calomys sp.*, *Akodon sp.*, *Olygoryzomys sp.*, *Nectomys sp.*, *Necromussp.*, *Juliomys sp.*, e *Gerlinguetus sp.* Esses gêneros pertencem à ordem Rodentia, que é descrita como um dos principais grupos reservatórios de agentes infecciosos zoonóticos, tais como os pertencentes às famílias *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Herpesviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* e

*Togaviridae* (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004; DE THOISY et al., 2009; JEFFREY ROOT, 2013; LEVINSON et al., 2013; MACKENZIE; JEGGO, 2013; WEAVER; BARRETT, 2004). Os roedores são animais oportunistas, que se adaptam facilmente a novos ambientes e por isso, são importantes reservatórios de agentes zoonóticos infecciosos (LÖHMUS et al., 2013).

Neste trabalho, usando o qPCR, foi detectado um animal do gênero *Calomys sp.* naturalmente infectado com flavivírus. Sabe-se que roedores e marsupiais já foram descritos como reservatórios de diversos vírus como as espécies *Calomys musculinus*, *Mus musculus*, *Sigmodon hispidus* e *Netoma sp. para* arenavírus e a espécie *Peromyscus maniculatus* para hantavírus, (MACKENZIE; JEGGO, 2013; MILLS; CHILDS, 1998). Mamíferos silvestres também já foram descritos como reservatórios de diversos flavivírus (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004; DE THOISY et al., 2009; JEFFREY ROOT, 2013; LEVINSON et al., 2013; MACKENZIE; JEGGO, 2013; WEAVER; BARRETT, 2004) e dentre os flavivírus de maior importância no cenário epidemiológico atual, devido ao seu potencial emergente e reemergente, destacam-se DENV, WNV, YFV, SLEV e JEV (FIGUEIREDO, 2007). A prospecção destes vírus é de grande importância, uma vez que todos eles já foram detectados no Brasil, mas a infecção por estes vírus frequentemente pode ser confundida clinicamente com dengue (FIGUEIREDO, 2014; MONDINI et al., 2007b; TERZIAN et al., 2011).

A infecção natural de roedores e marsupiais pelo DENV já foi descrita na Guiana Francesa, no período de 2001 a 2007 (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004; DE THOISY et al., 2009). Estes relatos indicam a possibilidade destes animais poderem atuar como reservatórios ou hospedeiros acidentais do DENV, o que tem uma importância especial em uma região, como a de Minas Gerais, que é endêmica para dengue (AMÂNCIO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013; VILLABONA-ARENAS et al., 2014). Dos animais infectados com flavivírus detectados nos trabalhos de De Thoisy; Dussart; Kazanji (2004) e De Thoisy et al. (2009), algumas espécies de marsupiais são das mesmas espécies que fazem parte da Col-ECOVIR e que foram analisadas neste trabalho, como as espécies dos gêneros *Monodelphis* e *Didelphis*, coletados em uma área peri-urbana, próxima a cidade de Cayenne e em uma área de floresta de transição entre a área rural e a floresta densa, localizada próxima à

fronteira com o Brasil. Os testes foram realizados a partir do soro e fígado dos animais coletados, como o realizado neste trabalho. Isso reforça a importância de se procurar por vírus nestes animais, tendo em vista que eles são amplamente difundidos na América Central e do Sul e já foram evidenciados  
5 como reservatórios do DENV (DE THOISY et al., 2009).

Outro vírus com circulação bem estabelecida e potencial emergente no Brasil é o YFV. Embora a febre amarela urbana vem sendo controlada desde a década de 60, devido ao uso da vacina a partir de 1937, surtos esporádicos em primatas não humanos e também em humanos vem ocorrendo, em diferentes  
10 regiões do país, inclusive na região sudeste (ROMANO et al., 2014, MASCHERETTI et al., 2013; VILLABONA-ARENAS et al., 2014), incluindo em Minas Gerais (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; RIBEIRO; ANTUNES, 2009).

Os principais reservatórios do SLEV são aves, marsupiais e primatas e o vírus já foi isolado do cérebro de cavalos, em Minas Gerais (FIGUEIREDO, 2007; ROSA et al., 2013). Embora neste trabalho não tenha sido detectado nenhum animal infectado com o SLEV, os trabalhos mostrando a circulação do vírus no país (FIGUEIREDO, 2014; LUIZA et al., 2006; MAIA et al., 2014; MONDINI et al., 2007a; RODRIGUES et al., 2010; TERZIAN et al., 2011),  
20 demonstram a necessidade de vigilância deste vírus, nos seus reservatórios, vetores e também no homem (WEAVER; BARRETT, 2004).

Casos de infecção pelo SLEV, tem sido relatados no Brasil em humanos, incluindo a região sudeste (FIGUEIREDO, 2014; LUIZA et al., 2006; MAIA et al., 2014; MONDINI et al., 2007a; RODRIGUES et al., 2010; TERZIAN et al.,  
25 2011). Em 2004, o vírus foi isolado de um paciente da cidade de São Pedro, estado de São Paulo, que inicialmente havia sido diagnosticado como dengue (ROCCO et al., 2005). Em Ribeirão Preto, no ano de 2006, oito pacientes com quadro clínico de febre foram soro-positivos para SLEV (MONDINI et al., 2007a) e no ano de 2007, durante um surto do DENV-3 na cidade, seis  
30 pacientes foram primeiramente diagnosticados com dengue e estudos posteriores confirmaram a positividade para o SLEV (MONDINI et al., 2007b). Considerando que casos de dengue são comuns em todas as partes do Brasil e que infecções por SLEV e outros flavivírus podem ser clinicamente confundidas com a dengue, principalmente por apresentarem sintomas

inespecíficos, estas infecções podem ser sub-notificadas, mas diferentes estudos indicam que a importância do SLEV como vírus zoonótico no Brasil (FIGUEIREDO, 2014).

5 Outro flavivírus emergente na América do Sul é o WNV. Seu primeiro isolamento nesta região, foi a partir de pássaros, no ano de 2004, em Trinidad e em 2005, na Argentina (OMETTO et al., 2013). No Brasil há relatos de detecção de anticorpos anti-WNV em cavalos e pássaros em diferentes regiões do país, tais como Rondônia, São Paulo, Mato Grosso, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraíba e Rio Grande do Sul (MELANDRI et al., 10 2012; OMETTO et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; SOARES et al., 2010). Além desta detecção de anticorpos anti-WNV apontar para a circulação silenciosa do vírus no país, recentemente, o WNV foi detectado em um trabalhador rural com sintomas neurológicos, residente do estado do Piauí (Ministério da Saúde, 2014). No Brasil é abundante a circulação de aves e 15 mamíferos, reservatórios do WNV, bem como de seus vetores, *Culex sp.* e *Aedes sp.*, (OMETTO et al., 2013) fatores que podem favorecer o aumento da sua circulação e a ocorrência de futuros surtos da doença causada pelo WNV.

Neste trabalho foi detectada uma amostra proveniente de fígado de *Calomys sp.* naturalmente infectada com flavivírus, potencialmente SLEV, 20 DENV-1, DENV-3 e DENV-4, ratificando assim que roedores devem fazer parte da cadeia de manutenção e/ou transmissão de flavivírus nesta região de Minas Gerais, Brasil. Esta amostra de roedor foi coletada na área de pasto, que poderia ser considerada uma área de transição entre o ambiente silvestre e peridoméstico. O produto amplificado será sequenciado para confirmar o 25 resultado e identificar o vírus detectado. A amostra original de fígado deste animal será então, processada e utilizada na tentativa de isolamento viral, para posterior sequenciamento e análise de parte ou de todo o genoma do vírus, para então, ser utilizada em ensaios para caracterização biológica e molecular de flavivírus. Nenhuma amostra de soro foi positiva para os testes realizados e 30 outros órgãos tais como o baço, ainda serão investigados para a presença destes vírus. Finalmente, este trabalho faz parte de um grande projeto (ECOVIR) e outros vírus como *Bunyaviridae*, *Coronaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Poxviridae* estão sendo investigados, também nestes animais. Os resultados destes trabalhos poderão fornecer informações destes vírus e de seus ciclos

zoonóticos, principalmente de seus reservatórios, que são essenciais para a manutenção e sobrevivência do vírus no ambiente.

## 7 CONCLUSÕES

- 5 - Foram encontrados indicativos da circulação de flavivírus em culicídeos, no ano de 2012, em Montes Claros, MG.
- Foi detectada uma amostra de roedor, ordem *Calomys sp.*, naturalmente infectada com flavivírus, em Rio Pomba, MG.

## 10 8 PERSPECTIVAS

- Confirmar a presença e identificar os flavivírus presentes nos culicídeos estudados.
- 15 - Confirmar a presença e identificar os flavivírus presentes na amostra do roedor *Calomys sp.*
- Investigar a presença de flavivírus em outros órgãos, como baço, nos pequenos mamíferos da Col-ECOVIR.
- Isolar, sequenciar e caracterizar biológica e molecularmente os vírus  
20 identificados.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESHIN, A. E. et al. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. **Protein Science**, v. **16**, p. 795–806, 2007.
- 5 ALMEIDA, M. A B. et al. Surveillance for yellow Fever virus in non-human primates in southern Brazil, 2001-2011: a tool for prioritizing human populations for vaccination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. **8**, n. 3, p. e2741, mar. 2014.
- 10 ALVAREZ, D. E. et al. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. **Journal of virology**, v. **79**, n. 11, p. 6631–6643, 2005.
- AMÂNCIO, F. F. et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in Southeast Brazil. **Journal of infection and public health**, v. **7**, n. 6, p. 547–52, 2014.
- 15 ARNELL, J. H. Mosquitoes studies (Diptera, Culicidae) XXXII - a revision of the Scapularis group of Aedesv(Ochlerotatus). v. 13, n. 3, p. 1–144, 1976.
- BAKHVALOVA, V. N. et al. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. **Virus research**, v. **140**, n. 1-2, p. 172–8, mar. 2009.
- 20 BALE, J. F. Emerging viral infections. **Seminars in pediatric neurology**, v. **19**, n. 3, p. 152–7, set. 2012.
- BARRETTO, A. et al. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae ). **Parasites & Vectors**, v. **7**, n. 468, p. 1–9, 2014.
- 25 BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **EPIDEMIA DE FEBRE AMARELA SILVESTRE NA REGIÃO DA BACIA DO RIO DOCE - MINAS GERAIS**[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs), 2003.
- BRONZONI, R. V. DE M. et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. **43**, n. 2, p. 696–702, 2005.
- 30 BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P. . (Ed.). . **Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 852–921.
- 35 BUSTIN, S. A et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. **55**, n. 4, p. 611–22, abr. 2009.

- CAMPBELL, G. L. et al. West Nile virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. September, p. 519–529, 2002.
- CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E.; THEILER, M. Isolation of St. Louis encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 3, p. 449, 1964.
- CDC: DENGUE FEVER:** <http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowBookCh4-15/DengueFever.aspx> Acesso em: 13 Jan 2015.
- CDC: DENGUE FEVER:** <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html> Acesso em 13 Jan 2015.
- CDC: YELLOW FEVER:** <http://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html> Acesso em 13 Jan 2015.
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562–608, out. 2011.
- CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2594–2617, 2 dez. 2010.
- COFFEY, L. L. et al. Arbovirus evolution in vivo is constrained. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 19, p. 6970–6975, 2008.
- CONSOLI, R. A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. L. Principais mosquios de importância sanitária no Brasil. **Fiocruz**, v. 1, p. 114–119, 1994.
- CUNNINGHAM, A. A. A walk on the wild side--emerging wildlife diseases. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 331, n. 7527, p. 1214–5, 26 nov. 2005.
- DAVIS, N. C.; SHANNON, R. C. STUDIES ON YELLOW FEVER IN SOUTH AMERICA. **Journal of Experimental Medicine**, v. 50, n. 6, p. 803–808, 1929.
- DE BARROS, V. E. D. et al. An experimental model of meningoencephalomyelitis by Rocio flavivirus in BALB/c mice: inflammatory response, cytokine production, and histopathology. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 2, p. 363–73, ago. 2011.
- DE THOISY, B. et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 157–70, abr. 2009.
- DE THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 7, p. 409–12, jul. 2004.
- DEMARI-SILVA, B. et al. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 174, 2014.

- DRUMOND, B. P. et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of virology**, v. **157**, n. 11, p. 2061–73, nov. 2012.
- 5 FIGUEIREDO, M. L. G. DE et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology journal**, v. **7**, n. 152, 2010.
- FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. **2**, n. 13, p. 1643–9, nov. 2000.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergente arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **40**, n. 2, p. 224–229, 2007.
- 10 FIGUEIREDO, L. T. M. Saint Louis encephalitis virus and other arboviruses in the differential diagnosis for dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **47**, n. August, p. 541–542, 2014.
- FORATINI, O. P.; GOMES, A. D. C. Biting activity of *Aedes scapularis* (Rondani) and *Haemagogus* mosquitoes in Southern Brazil (Diptera: Culicidae).  
15 **Revista de Saúde Pública**, v. **22**, n. 2, p. 84–83, 1988.
- FORATTINI, O. P. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) an anthropic environment: Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. **29**, n. 3, 1995.
- FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; SALLUM, M. A. . Encontro de criadouros de *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) em recipientes artificiais. **Revista de Saúde Pública**, v. **31**, n. 5, p. 519–522, 1997.  
20
- GOMES, A. C. Riquexa e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. **41**, n. 4, 2007.
- 25 GOTO, K. et al. Dengue Hemorrhagic Fever in an Adult Traveler Returning to Japan. **Internal Medicine**, v. **51**, n. 13, p. 1779–1782, 2012.
- GRATZ, N. G. Clinical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medicine Veterinary and Entomology**, v. **18**, p. 215–227, 2004.
- 30 GRAY, T. J.; WEBB, C. E. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. **International Journal of general medicine**, v. 7, p. 193–203, 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. **11**, n. 3, p. 480–96, 1998.
- 35 GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. **951**, n. Dec, p. 13–24, 2001.

- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7–16, dez. 2010.
- 5 HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1–21, jan. 1980.
- HUANG, Y.-J. S. et al. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703–4730, jan. 2014.
- ICTV, 2015**. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em mar, 2015
- 10 JEFFREY ROOT, J. West Nile virus associations in wild mammals: a synthesis. **Archives of virology**, v. 158, n. 4, p. 735–52, 2 abr. 2013.
- JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–3, 21 fev. 2008.
- 15 JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158–61, ago. 2002.
- 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. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 608–637, 2005.
- 20 LAPORTA, G. Z. et al. Spatial distribution of arboviral mosquito vectors ( *Diptera* , *Culicidae* ) in Vale do Ribeira in the South-eastern Brazilian Atlantic Forest. **Caderno de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 229–238, 2012.
- 25 LEVINSON, J. et al. Targeting surveillance for zoonotic virus discovery. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 743–7, maio 2013.
- LIMONGI, J. E. et al. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 155–158, jan. 2013.
- 30 LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae - The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M. et al. (Eds.). . **Virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 734 – 746.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P. . (Ed.). . **Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 810–851.
- 35 LISIEUX, T. et al. Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in São Paulo state, Brazil and the

development of a one-step RT-PCR assay for diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 89–94, 2008.

5 LÖHMUS, M. et al. Rodents as potential couriers for bioterrorism agents. **Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science**, v. 11 Suppl 1, p. S247–57, set. 2013.

LUIZA, C. et al. Genetic characterization of St . Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo , Brazil. v. 101, n. February, p. 57–63, 2006.

10 LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil The emergence of emerging diseases. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 229–243, 2002.

MACKENZIE, J. S. et al. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medical**, v. 10, n. 12 Suppl, p. 98–109, dez. 2004.

15 MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 2, p. 170–9, abr. 2013.

MAIA, F. G. M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 96–7, set. 2014.

20 MASCHERETTI, M. et al. Febre amarela silvestre: reemergência de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2009. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 5, p. 881–889, 2013.

MAY, F. J. et al. Genetic variation of St. Louis encephalitis virus. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 8, p. 1901–10, ago. 2008.

25 MEDEIROS, D. B. A et al. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 8, p. 2237–46, ago. 2007.

30 MEDINA, F. et al. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. **Current protocols in microbiology**, Chapter 15, n. November, p. Unit15D.2, nov. 2012.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–5, dez. 2012.

35 MENDEZ, J.A.; USME-CIRO, J.A.; DOMINGO, C.; REY, G.J.; SANCHEZ, J.A.; TENORIO, A; GALLEGO-GOMEZ, J.C. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, v. 7, n. 226, p. 1-12, 2010.

MILLS, J. N.; CHILDS, J. E. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 529–37, 1998.

5 **Ministério d Saúde, 2014:** <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15965-ministerio-da-saude-confirma-primeiro-caso-de-febre-do-nilo>. Acesso em 10 jan. 2015

10 **MS 2010a-** Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. Assunto: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima /Brasil. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_denv\\_4reveduardo2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4reveduardo2.pdf) Acesso em Jan 2015

15 **MS 2010b-** Ministério Da Saúde. NOTA TÉCNICA N.º 118 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. Identificação de Áreas de Maior Vulnerabilidade para Ocorrência de Dengue no período de Transmissão 2010/2011 com vistas a subsidiar a intensificação das ações de controle. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_aval\\_vul\\_epid\\_dengue\\_verao\\_10\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_aval_vul_epid_dengue_verao_10_11.pdf). 20 Acesso Jan 2015

MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P. Experimental Transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 21, n. 1, p. 34–37, 1984.

20 MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P.; MILLER, B. R. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquitos species from the epidemic zone im Brazil. **Revista de Saúde Publica**, v. 20, n. 3, p. 171–177, 1986.

MONATH, T. P. Yellow fever : an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. August, p. 11–20, 2001.

25 MONATH, T. P.; CETRON, M. S.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine. In: PLOTKIN SA, ORENSTEIN WA, O. P. (Ed.). . **Vaccines**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2008. p. 959–1055.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 176–8, jan. 2007a.

30 MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84–6, set. 2007b.

35 NEWMAN, C. M. et al. *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 8, p. 1099–105, ago. 2011.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 9, p. 1376–81, set. 2005.

- OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **107**, n. 11, p. 723–30, nov. 2013.
- 5 OSANAI, C. H; ROSA, A. P; TANG, A. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **25**, n.1, p. 53-4, 1983
- PADGETT, K. A et al. West Nile virus infection in tree squirrels (Rodentia: Sciuridae) in California, 2004-2005. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. **76**, n. 5, p. 810–3, maio 2007.
- 10 PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal , Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **105**, n. 6, p. 829–833, 2010a.
- 15 PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. PRELIMINARY INVESTIGATION OF CULICIDAE SPECIES IN SOUTH PANTANAL , BRAZIL AND THEIR POTENTIAL IMPORTANCE IN ARBOVIRUS TRANSMISSION \*. v. **52**, n. 1, p. 17–23, 2010b.
- 20 PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **52**, n. 1, p. 17–24, fev. 2010c.
- 25 PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **106**, n. 4, p. 467–74, jun. 2011.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. **8**, n. 2, p. e2706, fev. 2014.
- 30 PÉREZ-RAMÍREZ, E.; LLORENTE, F.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M. Á. Experimental infections of wild birds with West Nile virus. **Viruses**, v. **6**, n. 2, p. 752–81, fev. 2014.
- PFEFFER, M.; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. p. 1–15, 2010.
- 35 PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. et al. (Eds.). . **Virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747 – 794.
- PLATT, K. B. et al. Detection of dengue virus neutralizing antibodies in bats from Costa Rica and Ecuador. **Journal of Medical Entomology**, v. **37**, p. 965–67, 2000.

- RIBEIRO, M.; ANTUNES, C. M. D. F. Febre amarela: Estudo de um surto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 523–531, 2009.
- 5 ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–5, 2005.
- ROCHE, B.; GUÉGAN, J.-F. Ecosystem dynamics, biological diversity and emerging infectious diseases. **Comptes rendus biologies**, v. 334, n. 5-6, p. 385–92, maio 2011.
- 10 RODRIGUES, S. G. et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 10, p. 2420–7, out. 2010.
- ROMANO, A. P. M. et al. Yellow Fever Outbreaks in Unvaccinated Populations, Brazil, 2008-2009. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. 18–21, 15 2014.
- ROSA, R. et al. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2537, nov. 2013.
- ROSEN, L. SEXUAL TRANSMISSION OF DENGUE VIRUSES BY. v. 37, n. 20 February, p. 398–402, 1987.
- ROSSI, S. L.; ROSS, T. M.; EVANS, J. D. West Nile virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 47–65, mar. 2010.
- SALKELD, D. J.; PADGETT, K. A; JONES, J. H. A meta-analysis suggesting that the relationship between biodiversity and risk of zoonotic pathogen 25 transmission is idiosyncratic. **Ecology letters**, v. 16, n. 5, p. 679–86, maio 2013.
- SALL, A. A et al. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. **Journal of virology**, v. 84, n. 2, p. 765–72, jan. 2010.
- 30 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. In: **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. thrid ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001. p. 5.1–5.90.
- SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro , Brazil. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 7–10, 2011.
- 35 SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112669, jan. 2014.

SANTOS, R. L. C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 671–673, 2003.

5 SCHUH, A. J. et al. Phylogeography of Japanese encephalitis virus: genotype is associated with climate. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 8, p. e2411, jan. 2013.

**Sciencemag**, 2013: <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>. Acesso em 20 jan. 2015

10 SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–7, fev. 2011.

SOARES, C. N. et al. Is West Nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 68, n. 5, p. 761–3, out. 2010.

15 SOPER, F. L. The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. **American journal of public health**, v. 53, p. 7–16, 1963.

STRAATMANN, A. et al. EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS DA CIRCULAÇÃO DO ARBOVÍRUS ROCIO ( FLAVIVIRIDAE ) NA BAHIA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 511–515, 1997.

20 SU, C.-L. et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus in mosquitoes in Taiwan during 2005-2012. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3122, out. 2014.

SUTHAR, M. S.; PULENDRAN, B. Systems analysis of West Nile virus infection. **Current opinion in virology**, v. 6, p. 70–5, jun. 2014.

25 SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 280–286, jun. 2014.

30 TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983–9, 29 jul. 2001.

35 TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.

TEMPORÃO, J. et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 938–40, 2011.

- TERZIAN, A. C. B. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 3, p. 291–300, mar. 2011.
- 5 VANDEGRIFT, K. J.; WALE, N.; EPSTEIN, J. H. An ecological and conservation perspective on advances in the applied virology of zoonoses. **Viruses**, v. 3, n. 4, p. 379–97, abr. 2011.
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 1578–84, set. 2004.
- 10 VASCONCELOS, PFC, TRAVASSOS DA ROSA, APA, PINHEIRO, FP, TRAVASSOS DA ROSA, J. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 289–302.
- VASILAKIS, N. et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. **Journal of virology**, v. 81, n. 17, p. 9591–5, set. 2007.
- 15 VILELA, A. P. P. P. et al. Dengue Virus 3 Genotype I in Aedes aegypti Mosquitoes and Eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 2005–2006, jun. 2010.
- VILLABONA-ARENAS, C. J. et al. Detection Of Four Dengue Serotypes Suggests Rise In Hyperendemicity In Urban Centers Of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 3–5, 2014.
- 20 VOROU, R. M.; PAPAVALASSIOU, V. G.; TSIODRAS, S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. **Epidemiology and infection**, v. 135, n. 8, p. 1231–47, nov. 2007.
- WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789–801, out. 2004.
- 25 WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328–45, fev. 2010.
- 30 **WHO**: World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Comprehensive guidelines. New Delhi, India: WHO Regional Publication, SEARO, No. 29;1999. p. 134
- ZHOU, Y. et al. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. **Journal of virology**, v. 81, n. 8, p. 3891–903, abr. 2007.

**APÊNDICE A – Total de culicídeos coletados em Montes Claros, Minas Gerais, de fevereiro a abril de 2012, dados por coleta**

Mês	Espécie	FÊMEA		MACHO		Sem indicação de sexo*	N° pool
		N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	
FEV	<i>Aedes scapularis</i>					5	MOC 13
FEV	<i>Aedes scapularis</i>					19	MOC 14
FEV	<i>Psorophora ferox</i>					1	MOC 15
FEV	<i>Psorophora lanei</i>					3	MOC 17
FEV	<i>Psorophora ferox</i>					1	MOC 18
FEV	<i>Psorophora albigenu</i>					1	MOC 20
FEV	<i>Aedes scapularis</i>					75	MOC 23
FEV	<i>Psorophora ferox</i>					2	MOC 27
FEV	<i>Aedes scapularis</i>					34	MOC 29
FEV	<i>Aedes scapularis</i>	40					MOC 50
FEV	<i>Aedes scapularis</i>	20	x				MOC 58
FEV	<i>Aedes scapularis</i>					3	MOC 66
MAR	<i>Aedes aegypti</i>			8			MOC 12
MAR	<i>Aedes aegypti</i>	1					MOC 40
MAR	<i>Aedes aegypti</i>	15					MOC 56
MAR	<i>Aedes aegypti</i>			3			MOC 71
ABR	<i>Aedes aegypti</i>						MOC 39
ABR	<i>Aedes aegypti</i>			1			MOC 63
ABR	<i>Aedes aegypti</i>	3					MOC 52

## Continuação APÊNDICE A

Mês	Espécie	FÊMEA		MACHO		Sem indicação de sexo*	N° pool
		N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	
ABR	<i>Aedes aegypti</i>	1					MOC 53
ABR	<i>Limatus durhamii</i>					1	MOC 9
ABR	<i>Aedes aegypti</i>			6			MOC 37
ABR	<i>Aedes aegypti</i>			10			MOC 67
ABR	<i>Aedes albopictus</i>	3					MOC 72
ABR	<i>Limatus durhamii</i>			1			MOC 38
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			8			MOC 68
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	47					MOC 1
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			61	x		MOC 4
ABR	<i>Aedes scapularis</i>					919	MOC 16
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	156	x				MOC 19
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			236			MOC 22
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			150	x		MOC 23
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			23			MOC 25
ABR	<i>Psorophora ferox</i>	1	x				MOC 26
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			59	x		MOC 28
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			116			MOC 30
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	89					MOC 31

## Continuação APÊNDICE A

Mês	Espécie	FÊMEA		MACHO		Sem indicação de sexo*	N° pool
		N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	
ABR	<i>Aedes aegypti</i>	1					MOC 35
ABR	<i>Psorophora sp.</i>			10			MOC 36
ABR	<i>Psorophora ferox</i>	1					MOC 41
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	42	x				MOC 45
ABR	<i>Aedes sp.</i>			2			MOC 46
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	46	x				MOC 49
ABR	<i>Psorophora ferox</i>	2					MOC 54
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			20	x		MOC 57
ABR	<i>Aedes aegypti</i>	1					MOC 59
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			122			MOC 61
ABR	<i>Aedes scapularis</i>					51	MOC 73
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			71	x		MOC 74
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			83	x		MOC 75
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			71			MOC 77
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			43	x		MOC 79
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	440					MOC 81
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	125	x				MOC 2
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	63	x				MOC 3

## Continuação APÊNDICE A

Mês	Espécie	FÊMEA		MACHO		Sem indicação de sexo*	N° pool
		N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	139	x				MOC 7
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			105	x		MOC 8
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	120	x				MOC 21
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			78	x		MOC 44
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			38	x		MOC 47
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			136	x		MOC 51
ABR	<i>Psorophora ciliata</i>	1					MOC 60
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			18	x		MOC 62
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			31	x		MOC 65
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	71					MOC 78
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	58	x				MOC 80
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	15					MOC 6
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			3			MOC 35
ABR	<i>Psorophora ciliata</i>			2	x		MOC 48
ABR	<i>Psorophora ciliata</i>	1					MOC 69
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			13			MOC 32
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	32					MOC 76
ABR	<i>Psorophora ferox</i>					1	MOC 10

## Continuação APÊNDICE A

Mês	Espécie	FÊMEA		MACHO		Sem indicação de sexo*	N° pool
		N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	Larva	N° mosquitos coletados	
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			1			MOC 11
ABR	<i>Aedes scapularis</i>					5	MOC 34
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	1					MOC 42
ABR	<i>Aedes albopictus</i>					2	MOC 55
ABR	<i>Aedes scapularis</i>			2			MOC 64
ABR	<i>Aedes scapularis</i>	24					MOC 43
ABR	<i>Psorophora ferox</i>					4	MOC 70

\* Culicídeos coletados na fase adulta e que durante o manuseio foram danificados, impedindo a determinação do sexo do espécime.

APÊNDICE B – Detecção molecular de *Flavivirus* em *pools* de culicídeos coletados em Montes Claros, MG.

Pool	ESPÉCIE	MÊS COLETA	SEXO	ESTÁGIO		TOTAL INDIVÍDUOS/Pool	RESULTADO PCR			
				larva	adulto		DENV	YFV	ROCV	SLEV
MOC1 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC1 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC1 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC2 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC2 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC3 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC3 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC 4C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M	x		20	neg	-	-	-
MOC6 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	15	neg	neg	<b>POS</b>	neg
MOC7 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC7 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC7 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC 8A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M	x		20	neg	-	-	-
MOC 9	<i>Limatus durhamii</i>	abr	NI*		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 10	<i>Psorophora ferox</i>	abr	NI*		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC12 A	<i>Aedes aegypti</i>	mar	M		x	8	neg	neg	neg	neg
MOC 15	<i>Psorophora ferox</i>	fev	NI*		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 17	<i>Psorophora lanei</i>	fev	NI*		x	3	neg	neg	neg	neg
MOC 18	<i>Psorophora ferox</i>	fev	NI*		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC19 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-

## Continuação APÊNDICE B

Pool	ESPÉCIE	MÊS COLETA	SEXO	ESTÁGIO		TOTAL INDIVÍDUOS/Pool	RESULTADO PCR			
				larva	adulto		DENV	YFV	ROCV	SLEV
MOC19 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	neg	neg	neg
MOC 20	<i>Psorophora albigena</i>	fev	NI*		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC21 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC22 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	20	neg	-	-	-
MOC22 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 26	<i>Psorophora ferox</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 27	<i>Psorophora ferox</i>	fev	NI*		x	2	neg	neg	neg	neg
MOC30 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC31 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC31 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC31 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC35 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 36	<i>Psorophora sp.</i>	abr	M		x	10	neg	neg	neg	neg
MOC37 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	M		x	6	neg	neg	neg	neg
MOC 38	<i>Limatus durhamii</i>	abr	M		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC39 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC40 A	<i>Aedes aegypti</i>	mar	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC43 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC43 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	4	neg	neg	neg	neg
MOC44 A	<i>Aedes scapularis</i>	fev	M	x		20	neg	-	-	-

## Continuação APÊNDICE B

Pool	ESPÉCIE	MÊS COLETA	SEXO	ESTÁGIO		TOTAL INDIVÍDUOS/Pool	RESULTADO PCR			
				larva	adulto		DENV	YFV	ROCV	SLEV
MOC45 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC45 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC45 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		12	neg	-	-	-
MOC46 A	<i>Aedes albopictus</i>	abr	M		x	2	neg	neg	neg	neg
MOC 48	<i>Psorophora ciliata</i>	abr	M		x	2	neg	neg	neg	neg
MOC49 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC49 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC50 A	<i>Aedes scapularis</i>	fev	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC50 B	<i>Aedes scapularis</i>	fev	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC52 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	F		x	3	neg	neg	neg	neg
MOC53 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 54	<i>Psorophora ferox</i>	abr	F		x	2	neg	neg	neg	neg
MOC55 A	<i>Aedes albopictus</i>	abr	NI*		x	2	neg	neg	neg	neg
MOC56 A	<i>Aedes aegypti</i>	mar	F		x	15	<b>POS</b>	neg	neg	neg
MOC 57A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC59A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 60	<i>Psorophora ciliata</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC61 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC63 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	M		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC64 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	2	neg	-	-	-

## Continuação APÊNDICE B

Pool	ESPÉCIE	MÊS COLETA	SEXO	ESTÁGIO		TOTAL INDIVÍDUOS/Pool	RESULTADO PCR			
				larva	adulto		DENV	YFV	ROCV	SLEV
MOC67 A	<i>Aedes aegypti</i>	abr	M		x	10	neg	neg	neg	neg
MOC 69	<i>Psorophora ciliata</i>	abr	F		x	1	neg	neg	neg	neg
MOC 70	<i>Psorophora ferox</i>	abr	NI*		x	4	neg	neg	neg	neg
MOC71 A	<i>Aedes aegypti</i>	mar	M		x	3	neg	neg	neg	neg
MOC72 A	<i>Aedes albopictus</i>	abr	F		x	3	neg	neg	neg	neg
MOC 74A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC76 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC76 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	12	neg	neg	neg	neg
MOC77 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	M		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC78 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC78 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC78 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC78 D	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	11	neg	neg	neg	neg
MOC80 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F	x		20	neg	-	-	-
MOC81 A	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 B	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 C	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 D	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 E	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 F	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg

## Continuação APÊNDICE B

Pool	ESPÉCIE	MÊS COLETA	SEXO	ESTÁGIO		TOTAL INDIVÍDUOS/Pool	RESULTADO PCR			
				larva	adulto		DENV	YFV	ROCV	SLEV
MOC81 G	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 H	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81I	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81J	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81K	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81L	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81 M	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81N	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81O	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81P	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC81Q	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81R	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81S	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81T	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81U	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg
MOC 81V	<i>Aedes scapularis</i>	abr	F		x	20	neg	neg	neg	neg

(\*) Sexo não informado. (-) pool não testado. (Neg) negativo. (Pos) positivo. (Abr) abril. (Fev) fevereiro. (F) fêmea. (M) macho.

**APÊNDICE C – Pequenos mamíferos pertencentes à Coleção-ECOVIR utilizados neste trabalho e resultados do qPCR.**

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0009	<i>Necromys lasiurus</i>	25/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0010	<i>Necromys lasiurus</i>	25/10/2012	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0011	<i>Monodelphis americana</i>	25/10/2012	Mata	Sherman	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0012	<i>Calomys sp</i>	25/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	<b>POS</b>
PRONEM 0013	<i>Calomys sp</i>	26/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0014	<i>Necromys lasiurus</i>	26/10/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0015	<i>Necromys lasiurus</i>	26/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0016	<i>Oligoryzomys sp</i>	26/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0017	<i>Calomys sp</i>	26/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0018	<i>Necromys lasiurus</i>	26/10/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0019	<i>Oligoryzomys sp</i>	26/10/2012	Peridomicílio	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0020	<i>Calomys sp</i>	27/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0021	<i>Calomys sp</i>	27/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0022	<i>Akodon sp</i>	27/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0023	<i>Calomys sp</i>	27/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0024	<i>Calomys sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	-	-
PRONEM 0025	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Gaiola	Chão	M	-	-
PRONEM 0026	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0027	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0028	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0029	<i>Necromys lasiurus</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0030	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0031	<i>Calomys sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0032	<i>Akodon sp</i>	28/10/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0045	<i>Akodon sp</i>	12/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0046	<i>Calomys sp</i>	12/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0047	<i>Calomys sp</i>	12/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0048	<i>Calomys sp</i>	12/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0049	<i>Akodon sp</i>	13/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0050	<i>Oligoryzomys sp</i>	13/12/2012	Peridomicílio	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0051	<i>Akodon sp</i>	13/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0052	<i>Oligoryzomys sp</i>	13/12/2012	Mata	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0053	<i>Calomys sp</i>	14/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0054	<i>Calomys sp</i>	14/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0055	<i>Calomys sp</i>	14/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0056	<i>Calomys sp</i>	14/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0057	<i>Didelphis aurita</i>	15/12/2012	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0058	<i>Calomys sp</i>	15/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0059	<i>Akodon sp</i>	15/12/2012	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0060	<i>Calomys sp</i>	15/12/2012	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0061	<i>Oligoryzomys sp</i>	05/02/2013	Peridomicílio	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0062	<i>Didelphis aurita</i>	05/02/2013	Peridomicílio	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0063	<i>Didelphis aurita</i>	05/02/2013	Peridomicílio	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0064	<i>Didelphis aurita</i>	06/02/2013	Peridomicílio	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0065	<i>Akodon sp</i>	07/02/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0066	<i>Calomys sp</i>	07/02/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0067	<i>Akodon sp</i>	07/02/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0068	<i>Akodon sp</i>	07/02/2013	Pasto	Gaiola	Chão	NI*	-	-
PRONEM 0069	<i>Calomys sp</i>	08/02/2013	Pasto	Sherman	Chão	NI*	-	-
PRONEM 0070	<i>Calomys sp</i>	08/02/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0080	<i>Calomys tener</i>	09/04/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0081	<i>Calomys tener</i>	09/04/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0082	<i>Didelphis aurita</i>	09/04/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0083	<i>Nectomys squamipes</i>	09/04/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0084	<i>Calomys tener</i>	10/04/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	-	-
PRONEM 0085	<i>Akodon cursor</i>	10/04/2013	Mata	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0086	<i>Calomys tener</i>	10/04/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0087	<i>Akodon sp</i>	10/04/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0088	<i>Didelphis aurita</i>	11/04/2013	Mata	Gaiola	Subosque	M	-	-
PRONEM 0089	<i>Didelphis aurita</i>	12/04/2013	Mata	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0096	<i>Necromys lasiurus</i>	25/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0097	<i>Calomys tener</i>	25/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0098	<i>Necromys lasiurus</i>	25/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0099	<i>Calomys tener</i>	25/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0100	<i>Calomys tener</i>	25/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0101	<i>Nid*</i>	25/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	NI*	-	-
PRONEM 0102	<i>Calomys tener</i>	25/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0103	<i>Calomys tener</i>	25/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0104	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0105	<i>Necromys lasiurus</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0106	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0107	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0108	<i>Didelphis aurita</i>	26/06/2013	Mata	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0109	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0110	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0111	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0112	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0113	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0114	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0115	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0116	<i>Akodon sp</i>	26/06/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0117	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0118	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0119	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	-	-
PRONEM 0120	<i>Calomys tener</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0121	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	26/06/2013	Pasto	Sherman	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0122	<i>Nid*</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	NI	-	-
PRONEM 0123	<i>Akodon sp</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0124	<i>Necromys lasiurus</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0125	<i>Akodon sp</i>	27/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0126	<i>Calomys tener</i>	27/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0127	<i>Necromys lasiurus</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0128	<i>Calomys tener</i>	27/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0129	<i>Calomys tener</i>	27/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0130	<i>Akodon sp</i>	27/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0131	<i>Calomys tener</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	-	-

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0132	<i>Calomys tener</i>	27/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0133	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	27/06/2013	Mata	Sherman	Subosque	F	neg	neg
PRONEM 0134	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	27/06/2013	Mata	Sherman	Subosque	F	-	-
PRONEM 0135	<i>Akodon sp</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0136	<i>Oligoryzomys sp</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0137	<i>Akodon sp</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	-	-
PRONEM 0138	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0139	<i>Caluromys sp</i>	28/06/2013	Mata	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0140	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0141	<i>Necromys lasiurus</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	-	-
PRONEM 0142	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0143	<i>Necromys lasiurus</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0144	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0145	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0146	<i>Akodon sp</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0147	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	NI*	-	-
PRONEM 0148	<i>Calomys tener</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-
PRONEM 0149	<i>Akodon sp</i>	28/06/2013	Pasto	Sherman	Chão	NI*	-	-
PRONEM 0150	<i>Akodon sp</i>	28/06/2013	Pasto	Gaiola	Chão	NI*	-	-

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0165	<i>Akodon sp</i>	26/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0166	<i>Akodon cursor</i>	26/08/2013	Mata	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0167	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0168	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0169	<i>Guerlinguetus ingrami</i>	26/08/2013	Mata	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0170	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0171	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0172	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0173	<i>Akodon cursor</i>	26/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0174	<i>Akodon cursor</i>	26/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0175	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0176	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0177	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	-	-
PRONEM 0178	<i>Juliomys sp</i>	27/08/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0179	<i>Oligoryzomys sp</i>	27/08/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0180	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	27/08/2013	Mata	Sherman	Subosque	F	neg	neg
PRONEM 0181	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Mata	Gaiola	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0182	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0183	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0184	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0185	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0186	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0187	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0188	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0189	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0190	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0191	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0192	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0193	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0194	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0195	<i>Akodon cursor</i>	27/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0196	<i>Necomys lasiurus</i>	28/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0197	<i>Necomys lasiurus</i>	28/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0198	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0199	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0200	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0201	<i>Akodon cursor</i>	28/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0202	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0203	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0204	<i>Akodon cursor</i>	28/08/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0205	<i>Calomys tener</i>	28/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0206	<i>Didelphis aurita</i>	28/08/2013	Mata	Gaiola	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0207	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	28/08/2013	Mata	Gaiola	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0208	<i>Akodon cursor</i>	28/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0209	<i>Oxymycterus</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0210	<i>Akodon cursor</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0211	<i>Calomys tener</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0212	<i>Juliomys sp</i>	29/08/2013	Mata	Sherman	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0213	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	29/08/2013	Mata	Sherman	Subosque	M	-	-
PRONEM 0214	<i>Calomys tener</i>	29/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	M	-	-
PRONEM 0215	<i>Akodon cursor</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	-	-
PRONEM 0216	<i>Akodon cursor</i>	29/08/2013	Mata	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0217	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	29/08/2013	Mata	Gaiola	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0218	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	29/08/2013	Mata	Sherman	Subosque	M	neg	neg
PRONEM 0219	<i>Necromys lasiurus</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0220	<i>Calomys tener</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg
PRONEM 0221	<i>Akodon cursor</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	F	neg	neg

## Continuação APÊNDICE C

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	ARMADILHA	POSIÇÃO	SEXO	qPCR FLAVI-1	qPCR FLAVI-2
PRONEM 0222	<i>Necromys lasiurus</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0223	<i>Necromys lasiurus</i>	29/08/2013	Pasto	Gaiola	Chão	M	neg	neg
PRONEM 0224	<i>Calomys tener</i>	29/08/2013	Pasto	Sherman	Chão	F	-	-

(NI) Não informado. (Nid) Não identificado. (-) teste não realizado. (neg) amostra negativa. (POS) amostra positiva. (F) fêmea. (M) macho