



**Protocolos para  
o diagnóstico de  
doenças transmitidas  
por carrapatos pelo  
uso de biologia  
molecular**

*Zoraida del Carmen Fernández Grillo  
Renato Andreotti*





## INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos que transmitem elevado número de agentes etiológicos relacionados a zoonoses, afetando a saúde do homem, bem como dos animais domésticos e silvestres. Depois dos dípteros, os carrapatos são considerados como o segundo grupo em importância como vetores de doenças humanas e os mais importantes vetores de patógenos causadores de doenças de animais domésticos e silvestres (MASSARD; FONSECA, 2004; DE LA FUENTE et al., 2008; ANDREOTTI et al., 2011).

Certas características conferem aos carrapatos extraordinária capacidade de agirem como vetores de doenças, tais como: são persistentes sugadores de sangue, com lento e longo período de alimentação; apresentam grande espectro de hospedeiros, alta longevidade, grande potencial reprodutivo, transmissão transestadial e transovariana, além da alternativa não-virêmica por co-alimentação (MASSARD; FONSECA, 2004).

No Brasil, alguns gêneros da família Ixodidae são vetores de importantes doenças de interesse médico e veterinário. Dentre elas, destacam-se as riquetsioses e as arboviroses por serem consideradas de ameaça global. Abordaremos neste capítulo protocolos para o diagnóstico de algumas doenças causadas por riquetsias e arbovírus, que são transmitidas por carrapatos, com base na amplificação de RNA e DNA.

### As riquetsioses no Brasil

As riquetsioses constituem um grupo de doenças produzidas por bactérias Gram Negativas e intracelulares obrigatórias do gênero *Rickettsia*. Várias espécies desse gênero são relatadas como causadoras de doenças no homem e em outros hospedeiros vertebrados.

A espécie *Rickettsia rickettsii* é a que apresenta maior letalidade no mundo e é a principal causadora da febre maculosa. No Brasil, a febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença reemergente e endêmica, com taxa de mortalidade entre 30%-50%.

No país, o maior número de notificações ocorre na região Sudeste do Brasil, onde se encontram os principais vetores e reservatórios, os carrapatos do Complexo *Amblyomma cajennense*. Porém, outras espécies de carrapatos também têm sido associadas à transmissão dessa bactéria, tais como, *A. aureolatum*, *A. dubitatum* e *Rhipicephalus sanguineus* (SARAIVA et al., 2014; BRITES-NEIO et al., 2013; SZABÓ et al., 2013). O incremento no número de casos notificados, a expansão da área potencial de transmissão e a elevada taxa de mortalidade têm sido observados no país desde 1980.

A infecção é sazonal com a ocorrência de maior número de casos de febre maculosa durante o período de junho a outubro, correspondendo ao aumento da atividade dos carrapatos e, concomitantemente, ao maior contato do homem com estes artrópodes (DEL FIOLE et al., 2010).

A doença pode gerar sintomas variáveis, podendo observar-se comprometimento gastrointestinal, exantema, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, icterícia, manifestações renais, comprometimento pulmonar com outras complicações, manifestações neurológicas, meningite e encefalite.

O diagnóstico é difícil, principalmente nos primeiros dias, quando as manifestações clínicas podem sugerir outras doenças com sintomas similares, como: leptospirose,

dengue, hepatite viral, encefalite, infecções respiratórias, entre outras. Com o surgimento do exantema, o diagnóstico diferencial deve ser feito para outras doenças exantemáticas (BRASIL, 2010).

Os testes de ELISA e de imunofluorescência indireta (IFI), utilizados no diagnóstico sorológico de riquetsioses, apresentam elevada sensibilidade e especificidade. O teste ELISA é mais sensível do que o de IFI na detecção de baixos níveis de anticorpos presentes após a vacinação e durante a convalescência tardia. No entanto, o teste de IFI é a técnica “padrão de ouro” na maioria dos laboratórios (especificamente na detecção de anticorpos IgM) pelo fato de ser uma técnica mais econômica e de simples realização (LA SCOLA; RAOULI, 1997).

O diagnóstico laboratorial também pode ser realizado através do isolamento do agente etiológico, em ovos embrionados, em animais experimentais de laboratório e em linhagens celulares, a partir de amostras de sangue, biópsia de pele, tecido de necropsia e amostras de carrapatos (MELLES et al., 1999). Considerando que as doenças produzidas pelas riquetsias podem não ser diferenciadas através das manifestações clínicas, o isolamento do agente etiológico seguido pela caracterização molecular é de relevância na descoberta de novas cepas circulantes (LA SCOLA; RAOULI, 1997; CHOI et al., 2005). A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e as análises de sequências de bases de fragmentos de genes do agente etiológico têm apresentado resultados eficientes na detecção e caracterização das espécies de riquetsias.

### As arboviroses no Brasil

Os arbovírus (*Arthropod-borne viruses*) são vírus mantidos na natureza mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis (principalmente mamíferos e aves) e artrópodes hematófagos (mosquitos e carrapatos) (FIGUEIREDO, 2007).

As arboviroses, ou doenças causadas pelos arbovírus, podem ocorrer de forma esporádica, epidêmica ou endêmica, adquirindo características regionais definidas. Estão frequentemente associadas a surtos em populações humanas e representam um problema de saúde pública com impacto econômico e social.

As arboviroses transmitidas por carrapatos podem ser produzidas por vírus pertencentes às famílias Bunyaviridae (gêneros *Bunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*), Flaviviridae, Asfarviridae, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae e Reoviridae (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Dentre os arbovírus da família Bunyaviridae, a maioria dos vírus transmitidos por carrapatos estão dentro do gênero *Nairovirus*. O vírus da Febre Hemorrágica da Criméia-Congo é o de maior importância médica dentro desse grupo. Essa doença produz febre hemorrágica em humanos, com sintomas severos parecidos ao tifo e apresenta taxas de mortalidade superiores a 50%. Esse vírus circula em um ciclo enzoótico carrapato-vertebrado-carrapato. Apesar de já ter sido isolado em pouco mais de três dezenas de espécies de carrapatos pertencentes a sete gêneros diferentes da família Ixodidae, aparentemente os vetores mais eficientes e comuns são *Hyalomma* spp. (LABUDA; NUTTALL, 2004). O movimento dos animais de criação e a migração de aves têm um papel importante no transporte de carrapatos infectados (LANI et al., 2014).

Dentre os flavivírus transmitidos por carrapatos o vírus da encefalite do carrapato (vírus neurotrópico) endêmico da Europa e nordeste da Ásia é o de maior importância epidemiológica. É mantido na natureza entre os carrapatos ixodídeos e os mamíferos silvestres hospedeiros e, eventualmente, as aves migratórias (SÜSS, 2003; LANI et al., 2014; DE LA FUENTE et al., 2015). Os principais vetores são as espécies *Ixodes ricinus*, para o subtipo da Europa, e *Ixodes persulcatus*, para o subtipo da Sibéria (LANI et al., 2014).

Na família Reoviridae, o vírus da febre do carrapato de Colorado pertencente ao gênero *Coltivirus* é responsável pela segunda mais importante infecção causada por arbovírus no oeste do Canadá e dos Estados Unidos – o vírus do Oeste do Nilo está em primeiro lugar. O vetor principal é a espécie *Dermacentor andersoni*, embora também tenha sido isolado em *D. occidentalis*, *D. albipictus*, *D. parumapertus*, *Haemaphysalis leporispalustris* e em espécies de *Otobius*.

Os reservatórios vertebrados são os esquilos, os roedores silvestres e o porco-espinho. O homem pode padecer da doença quando picado pelo carrapato da espécie *D. andersoni* infectado. Como resultado apresentará febre, calafrios, mal-estar, linfadenopatia, dor de cabeça, conjuntivite, fotofobia, náusea, vômitos, astenia, mialgia, fraqueza e, em alguns casos, desenvolve meningite (LANI et al., 2014; RUSI, 2012; LABUDA; NUTTALL, 2004).

A família Asfarviridae possui um único gênero reconhecido, *Asfivirus*, cuja espécie-tipo é o vírus da febre suína africana. É o único arbovírus conhecido com genoma DNA. Esse vírus é transmitido por carrapatos do gênero *Ornithodoros*, mais especificamente pelas espécies *O. moubata*, vetor em algumas regiões da África e sul do Saara, e *O. erraticus*, no sudeste da Europa (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Os principais hospedeiros são o javali, o porco do mato e o porco doméstico. A transmissão entre porcos domésticos pode também ocorrer por contato direto ou ao ingerir carne ou alimentos contaminados. A doença é altamente contagiosa e afeta os suínos de todas as idades. Os sintomas podem variar dependendo do tipo de manifestação (hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica). Na forma hiperaguda a taxa de mortalidade pode alcançar 100% (LABUDA; NUTTALL, 2004).

No Brasil, houve um primeiro surto da doença na localidade de Paracambi, no estado de Rio de Janeiro, em 1978. Os animais se infectaram pela ingestão de restos de comida de aviões procedentes de Portugal e da Espanha, países nos quais a doença existia. A partir daquele momento, 223 novos focos foram relatados em todas as regiões do país (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). Em 1981, o Brasil foi declarado livre da doença (IOKARNIA et al., 2004). Porém, existem no país espécies de carrapato do gênero *Ornithodoros* (*O. talaje*, *O. rostratus*, *O. brasiliensis*, e *O. nattereri*) que, eventualmente, podem participar na transmissão do vírus da peste suína africana (LABUDA; NUTTALL, 2004).

O *Ihogotovirus*, da família Orthomyxoviridae, é compreendido por seis vírus transmitidos por carrapatos: Araguari, Aransas Bay, Dhori, Jos, Ihogoto e Upolu. No Quênia, na África e na Sicília (Itália) os *Ihogotovirus* têm sido isolados de *Rhipicephalus* spp.; na Nigéria, de *Amblyomma variegatum* e, na Nigéria e Egito, de *Hyalomma* spp. (LABUDA; NUTTALL, 2004).

O vírus Aransas Bay é o único que circula no continente americano, especificamente nos Estados Unidos, e foi isolado em *Ornithodoros* spp. Em 2014 no estado de Kansas, Estados Unidos, foi isolado um novo *Thogotovirus* em paciente picado por carrapatos, que faleceu após apresentar febre, mal-estar, anorexia, dor de cabeça, vômito, diarreia, mialgia artralgia e rash maculopapular nas regiões do abdome, peito e costas. O isolado foi denominado vírus Bourbon que apresentou proximidade filogenética com os vírus Dhoris e Batken (subtipo do vírus Dhoris) (KOSOY et al., 2015; LABUDA; NUTTALL, 2004).

A família Rhabdoviridae compreende seis gêneros e pelo menos seis sorogrupos não classificados em nenhum gênero. Muitos vírus do gênero *Vesiculovirus* são arbovírus, como é o caso do vírus *Isfahan* que já foi isolado de flebotomíneos e de carrapatos da espécie *Hyalomma asiaticum* (em Turcomenistão); assim como o vírus Barur do grupo Kern Canyon vírus, isolado de *Haemaphysalis intermedia* (Índia, Quênia e Somália), e o vírus Sawgrass do grupo Sawgrass vírus, isolado de *Dermacentor variabilis* e *Haemaphysalis leporispalustris* (Flórida, U.S.A.). Até o momento, não há relato de doenças associadas a estes vírus (LABUDA; NUTTALL, 2004).

No Brasil, a maioria das arboviroses que causam doenças em humanos pertence às famílias Togaviridae (gênero *Alphavirus*), Flaviviridae e Bunyaviridae. A circulação ocorre com participação de culicídeos e de vertebrados, incluindo o homem. A transmissão por carrapatos não tem sido relatada, porém, há um relato de isolamento de um *Flavivirus* em carrapatos do Complexo *Amblyomma cajennense* coletados em capivara doente da região de Matão, estado de São Paulo (FIGUEIREDO et al., 1999).

É importante ressaltar que as espécies de argasídeos e de ixodídeos, mencionadas por Labuda; Nuttall (2004) como vetores de arbovírus em diferentes localidades do mundo estão presentes no Brasil. Considerando que no Brasil há as características ambientais favoráveis em grande parte do país e, diversidade de hospedeiros vertebrados disponíveis para os carrapatos, é de grande importância a realização de pesquisas que avaliem a circulação destes agentes patógenos.

O isolamento viral em camundongos recém-nascidos, culturas celulares ou em mosquitos é o método comumente usado no diagnóstico de arbovírus. Entretanto, os métodos moleculares, especificamente baseados em RT-PCR e *Nested-PCR*, para a detecção de genoma viral, têm assumido grande importância nos últimos anos (LA SCOLA et al., 1997).

#### **EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE AGENTES PATÓGENOS EM AMOSTRAS DE CARRAPATOS**

Os carrapatos coletados no campo devem ser previamente identificados e armazenados em álcool 70% em temperatura ambiente ou a  $-80^{\circ}\text{C}$  no freezer, até o processamento.

Com auxílio de um pistilo, cada carrapato é macerado dentro de um microtubo de 1500  $\mu\text{L}$ , parcialmente em gelo, contendo 100  $\mu\text{L}$  de IE (Iris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) e 1  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (20 unidades/mg).

#### **Extração de DNA**

A extração do DNA inclui duas etapas:

1. A lise das células, liberando as moléculas em uma fase aquosa que é separada dos restos celulares por centrifugação.

2. A purificação do DNA, separando-o de outras macromoléculas, tais como proteínas e RNA, utilizando solventes orgânicos (fenol, clorofórmio). O DNA, que permanece na fase aquosa, é precipitado com etanol e, posteriormente, purificado e suspenso em um buffer adequado.

Na sequência, mencionaremos alguns dos procedimentos utilizados para extração de DNA em carrapatos:

#### A. Utilização de kits comerciais

A extração do DNA das riquétsias pode ser feita utilizando os kits comerciais disponíveis, como o *DNAzol* da Invitrogen ou o *DNA easy blood and tissue* da Qiagen, entre outros, seguindo o protocolo do fabricante.

#### B. Utilizando protocolo de lise com isotiocianato de guanidina (G1) e fenol (SANGIONI et al., 2005)

- Preparar a solução de isotiocianato de guanidina (G1), misturando: 5 mL de  $\text{Iris-HCl}$  1 M, 10 mL de EDIA 0,5 M, 60 mg de isotiocianato de guanidina, 100 mL de água miliQ.
- Misturar partes iguais da solução G1 e de fenol, um dia antes de realizar o procedimento, e incubar a 4°C, *overnight*.
- Acrescentar um volume de 450  $\mu\text{L}$  da solução G1+fenol gelada em cada amostra macerada e incubar em banho de gelo por 10 minutos, agitando em vortex por 10 segundos cada 2 minutos.
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, homogeneizando a amostra em vortex por 10 minutos e incubando-a em gelo por mais 2 minutos.
- Colocar os tubos em centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C.
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo e adicionar 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, homogeneizando por inversão manual dos tubos, 10 vezes e, incubando a -20°C *overnight*.
- Centrifugar, após o período de incubação, a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e adicionar 800  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, em seguida, centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- Secar o precipitado em termobloco a 37°C por 1 hora ou a 56°C por 15 minutos. Ressuspender o sedimento em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril e reidratar o DNA obtido em termobloco a 56°C por 15 minutos.
- Quantificar as amostras por espectrofotometria (no comprimento de onda de 260 nm) e, finalmente armazenar em freezer a -20°C.

#### Extração de RNA em Trizol (Invitrogen, UK)

- Macerar as amostras de carrapatos com pistilo, utilizando a solução TE + Proteinase K, da mesma forma que foi descrito para a extração de DNA.
- Acrescentar, após o macerado da amostra, 600  $\mu\text{L}$  de Trizol e incubar na temperatura ambiente por 5 min.
- Adicionar um volume de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio na homogeneização, e agitar com as mãos de forma vigorosa por 15 segundos. Em seguida, incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar os tubos contendo as amostras a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A mistura gera três fases: a basal vermelha fenol-clorofórmio, a interfase e a superior, aquosa. O RNA se encontrará na fase aquosa.
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo, inclinando o microtubo 45° e pipetando cuidadosamente e evitando entrar em contato com a fase orgânica (basal/interfase).
- Adicionar 0,5 mL de isopropanol 100% à fase aquosa coletada, e incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar novamente, a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo possível observar um *pellet* gelatinoso.
- Remover o sobrenadante, e lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 75%. Armazenar o tubo à -20°C *overnight*.
- Agitar no vortex brevemente e centrifugar a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Descartar o líquido e secar o *pellet* à temperatura ambiente por 5-10 minutos. Não secar totalmente a amostra porque o *pellet* pode perder a solubilidade.
- Ressuspender o RNA em água livre de RNase, ou solução de SDS 0,5%, ou DEPC, pipetando várias vezes até dissolver bem. Incubar em banho Maria ou termobloco a 55-60°C por 10-15 minutos, ou a 37°C por 30 minutos.
- Quantificar por espectrofotometria (no comprimento de onda de 260 nm) e armazenar a -80°C.

### PROTOSCOLOS DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE FRAGMENTOS DE GENES PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RIQUÊTSIAS E ARBOVÍRUS

A PCR e a transcriptase reversa seguida da PCR (RT-PCR), são técnicas em biologia molecular que permitem amplificar poucas cópias de um fragmento de ácido nucleico (o DNA é o molde no caso da PCR e, o RNA no caso da RT-PCR) para obter numerosas (milhares) de cópias desses fragmentos.

A técnica de sequenciamento permite conhecer a ordem das bases nucleotídicas contidas nos produtos obtidos da PCR e da RT-PCR. Posteriormente, usando softwares especializados (BLAST, CLUSTAL, entre outros) é possível analisar tais sequências e compará-las com outras disponíveis nas bases de dados (GenBank, entre outras), para assim verificar a identidade da sequência alvo.

#### Detecção de *Rickettsia* sp. utilizando a técnica da PCR

- Testar as amostras de carrapatos homogeneizadas com os primers CS-78F (5'-GCAAGTATCGG1GAGGA1G1AA1-3') e CS-323R (5'-GCTTCC1T1AAAAT1CAA1AAA1CAGGA1-3') que amplificam um fragmento de 401pb do gene que codifica a citrato sintase (*gltA*), sequência conservada em *Rickettsia* sp. (LABRUNA et al., 2004), e os primers 17KDF (5'-GGAACCAGGCGG1A1GAA1AA-3') e 17KDR (5'AC1TGCCA1AG1CCG1CAGG-3') que amplificam um fragmento de 407 pb do gene gênero específico *htrA*.
- Realizar a PCR, já padronizada, em um volume final de reação de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM), 0,5 µL de cada primer a



10  $\mu\text{M}$  (0,2  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$  (1 U), 19,05  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  de DNA (aproximadamente 200 ng).

- As temperaturas recomendadas, para a amplificação de ambos os fragmentos (*gltA* e *htrA*) são as seguintes: aquecimento inicial por 5 minutos a 95°C para desnaturar o DNA molde e ativar a polimerase, 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.
- Avaliar as amostras que resultem positivas com primers que amplificam fragmentos dos genes que codificam proteínas externas de membrana das riquetsias, *ompA* (fragmento de 631 pb) [Rr190.70p- 5'-AIGGCGAAIAIATTCICCAAAA-3' e Rr190.602n- 5'-AGIGCAGCAITCGCICCCCCI-3'], e *ompB* (fragmento de 862 pb) (B3-190.59- 5'CCGCAGGGTIGGIAACIGC-3' e B4-190.807- 5'-CCITTTIAGAITACCGCCIAA-3') (LABRUNA et al., 2004).
- No caso dos primers que amplificam a sequência do gene *ompA*, realizar a PCR em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ , 19,05  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA. As temperaturas recomendadas na termociclagem são: aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos (LABRUNA et al., 2004).
- Preparar para a amplificação da sequência do gene *ompB* uma reação com volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo 25 pmol de cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de dNTP, 1U de Elongase (Gibco), 2  $\mu\text{L}$  do tampão A e 8  $\mu\text{L}$  do tampão B.
- As temperaturas recomendadas são: 95°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto. Extensão final a 68°C por 1 minuto 30 segundos (ROUX; RAOULI, 2000).
- Analisar, posteriormente, um volume de 15  $\mu\text{L}$  dos produtos das PCRs em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e fotodocumentar em transluminador com luz ultra-violeta.

### Detecção de arbovírus utilizando a técnica da RT-PCR

Inicialmente, recomenda-se realizar as RT-PCRs utilizando primers específicos para gênero, para posteriormente realizar a identificação do agente etiológico usando os primers espécie-específicas. Os primers gênero-específicos são mencionados a seguir:

- Alphavirus* (M2W-F 5'-YAG-AGC-DIT-ITC-GCA-YSI-RGC-HW-3'; M3W-R 5'-ACA-TIA-ANK-GNG-ING-IRI-CRA-ANC-CDA-YCC-3') que produzirá fragmentos de 434 pb da proteína não estrutural 1 (PFEFFER et al., 1997).
- Flavivirus* (FUIRC- 5'-IAC-AAC-AIG-AIG-GGA-AAG-AGA-GAG-AA-3'; FGI 5'-ICA-AGG-AAC-ICC-ACA-CAI-GAG-AIG-IACI-3'; FG2 5'-IGI-AIG-CIG-AIG-ACA-CAG-CAG-GAI-GGG-ACA-C-3') que gerará fragmentos de 958 pb do gene NS5 (CHANG et al., 1994; KUNO et al., 1998; FULOP et al., 1993).
- Bunyavirus* (BUN-S 5'-AGI-AGI-GIG-CIC-CAC-3'; BUN-C 5'-AGI-AGI-AIA-CIC-CAC-3'; BS-S 5'-GIG-GGG-ICC-AAI-ITG-C-3'; BS-C 5'-IGA-ACC-CIA-IGC-AIC-I-3') que gerará fragmentos com mais de 700 pb (MORELI et al., 2002).

### Detecção de *Alphavirus* utilizando a reação de seminested-RT-PCR (PFEFFER et al., 1997)

- Realizar a reação de RT-PCR em microtubo de 0,2 µL contendo: 1 µmol de cada primer M2W e cM3W, 5 µL de RNA molde, 10 mM de KCl, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM de Iris-HCl pH 8,8, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) de Triton X-100, 1 µg de albumina de soro bovino, 200 µmol de dNTP, 20 U de inibidor de RNase, 50 mM ditiotreitol, 1,25 U de Taq polimerase, 2,5 U de TaqExtender PCR additive y 1,8 U de transcriptase reversa, em 100 µL de volume total.
- Executar a reação de RT a 50°C por 45 minutos seguidos por incubação a 94°C por 2 minutos, 50°C por 4 minutos e 72°C por 4 minutos.
- Realizar a PCR em 35 ciclos de incubação a 94°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. A elongação final deve realizar-se por 10 minutos para garantir a completa extensão dos produtos amplificados.
- Analisar a amplificação realizando eletroforese em gel de agarose (2%) e visualizar as bandas em transiluminador UV.

### Detecção de *Bunyavirus* utilizando a reação de RT-Nested-PCR (MORELI et al., 2001)

- Preparar uma mistura de 45 µL para a realização da reação RT: 5 µL de RNA molde, 0,05 mM de dNTPs, 4,5 µL do tampão (10 mM de Iris, pH 8,9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl e 0,3 M do primer BUN-C).
- Cobrir a mistura com 2 gotas de óleo mineral e aquecer a 95°C por 3 minutos, para alinhar o RNA. Colocar no gelo por 5 minutos.
- Após redução da temperatura, adicionar 10 U de inibidor de RNase e incubar por 1 hora a 37°C.
- Para a reação de PCR, adicionar no microtubo 1 U de Taq polimerase, 0,3 µM dos primers (BUN-S e BUN-C) e, 0,5 µL do tampão mencionado previamente. Adicionar água tratada com DEPC até completar 50 µL.
- Para a reação de nested-PCR, adicionar 1 µL do produto obtido na RT-PCR, 1 U da Taq polimerase, 0,5 µL do tampão mencionado previamente, 0,3 µM dos primers BS. Adicionar água tratada com DEPC até completar 50 µL.
- Observar e analisar os produtos amplificados em transiluminador UV, após realizar eletroforese em gel de agarose 1,5%.

### RT-PCR para a detecção de *Flavivirus* (BALEOTTI et al., 2003)

- Realizar a reação de RT em volume total de 12 µL. Adicionar na mistura ~1,5 µg de RNA molde, 0,5 µL (100 U) de transcriptase reversa, 1 µL (36 U) de inibidor de RNase, 1 µL (100 mM) do primer reverso (FUIRC), 1 µL (0,1 mM) de cada dNTPs, 4 µL de 5X tampão (250 mM Iris pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl, 50 mM DTT).
- Incubar a mistura a 37°C por 1 hora.
- Realizar a reação de PCR em volume de 50 µL, contendo: 3,5 µL da mistura RT, 1,25 µL (1 U) de Taq polimerase, 1 µL (0,1 mM) de cada dNTP, 1 µL (100 mM) do primer forward (FG1), 1 µL (100 mM) do primer reverso (FUIRC), 5 µL de 10X tampão

[(Iris-HCl 75 mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM)] e 37,5 µL de água tratada com DEPC.

- Realizar a amplificação nas seguintes temperaturas: 25 ciclos de, 94°C por 1 minuto, 45°C por 3 minutos e 72°C por 1 minuto.

#### Reação Duplex-RT-PCR para *Alphavirus* e *Flavivirus* (BRONZONI et al., 2005)

- A mistura para a reação RT deve conter: 8 µL de RNA molde, 4 µL do tampão (250 mM Iris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 1,5 µL de ditiotreitól (0,1M), 1 µL de cada primer reverse cM3W e FG2 (100 e 15 µM, respectivamente), 1 µL de dNIPs (250 µM cada um), 20 U de inibidor de RNase, 200 U da transcriptase reverse, água até completar 20 µL.
- Incubar a mistura a 42°C por 50 min e a 95°C por 5 min para inativar a enzima transcriptase reverse.
- A mistura para a reação de PCR deve conter: 8 µL de cDNA, 5 µL de tampão 10 X PCR (200 mM Iris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL da mistura dNIP (200 pmol) 1 µL dos primers forward M2W e FG1 (50 e 15 µM, respectivamente), 1 U da Taq DNA Polimerase, água até completar 50 µL.
- Realizar a amplificação da seguinte forma: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min, extensão final a 72°C por 5 min, manter a 4°C.
- Analisar os produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose 2% e visualizar em transiluminador UV.
- Para a identificação específica de *Flavivirus* e *Alphavirus*, realizar a reação de Nested-PCR utilizando os primers internos para cada espécie (Tabelas 3.1 e 3.2).
- A mistura de nested-PCR deve conter: 1 µL do produto amplificado na primeira PCR, 5 µL de tampão 10X PCR (200 mM Iris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL da mistura dNIP (200 µM cada um), µL Taq polimerase.
- No caso da nested-PCR para *Alphavirus*, adicionar 1 µL de primer reverse gênero específico cM3W na concentração de 100 µM, 1 µL do primer forward espécie específico (nEEE, nVEE, nWEE, nMAY, nAURA, na concentração 50 µM).

TABELA 3.1. Primers específicos para *Alphavirus* (PFEFFER et al., 1997)

ALPHAVIRUS	PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO
Encefalite equina venezuelana	nVEE (+) ACG-GAG-GTA-GAC-CCA-TCC-GA	400 pb
Encefalite equina do Leste	nEEE (+)CCA-CGG-TAC-CGT-TGC-C	124 pb
Encefalite equina do Oeste	nWEE (+) GGC-GGC-AGA-CCT-GCT-GGA-A	208 pb
Aura	nAURA (+) TCA-ATG-CAC-CTT-CGA-CCA	86 pb
Mayaro	nMAY (+) GGA-AGT-TGG-CCA-AGG-C	

TABELA 3.2. Primers específicos para *Flavivirus* (BRONZONI et al., 2005)

FLAVIVIRUS	PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO
Febre Amarela	nYF (-) TCA-GAA-GAC-CAA-GAG-GTC-ATG-T	253 pb
Sant Louis	nSLE (-) ATT-CTT-CTC-TCA-ATC-TCC-GT	232 pb
Ilhéus	nILH (-) TCC-ACC-GCT-GAT-CTG-AGC-CCG-TGA	474 pb
Rocio	nROC (-) TCA-CTC-TTC-AGC-CTT-TCG	

- Na reação nested-PCR para *Flavivirus*, adicionar 1 µL do primer FGI (15 µM) e 1 µL do primer reverse espécie específico (nYF, nSLE, nILH, nROC, na concentração 15 µM).
- Água até completar 50 µL.

#### Detecção de *Bunyavirus* usando RT-PCR segundo Zhang et al. (2011)

- A reação pode ser realizada usando o kit Quant OneStep RT-PCR (QiagenBiotech) e os primers Stest-F1, 5'-ATG-ACA-GAG-IGG-ACC-AGG-ATT-3' e Stest-R1, 5'-AAG-GAT-TC-CCI-IGG-CCI-ACA-3'. Os componentes da reação Mix são: 10 µL de tampão 5X OneStep RT-PCR, 4µL da enzima OneStep mix, 2 µL do primer Stest-F1 (10 µM), 2 µL do primer Stest-R1 (10 µM), 5 µL do molde de RNA, e água destilada livre de RNase para um volume total volume de 50 µL. A amplificação será realizada incubando os tubos a 50°C por 30 min, aquecendo a 95°C por 15 min e realizando 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg, 72°C por 40 seg, com extensão final a 72°C por 10 min. Analisar os produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de agarose 2%.

#### Detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus* usando o protocolo da Promega, Access RT-PCR System (<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/0/access-rtpcr-system-protocol/>).

- Em um microtubo de 0,5 mL adicione os seguintes reagentes: 10 µL Tampão da reação AMV/1fl 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM espermidina e 50 mM DTT] na concentração final 1X, 1 µL da mistura de dNTPs, 10 mM cada dNTP, 2 µL de MgSO<sub>4</sub>, 25 mM (concentração final 1 mM), 50 pmol de cada primer, forward e reverse 50 pmol (concentração final 1 µM), 1 µL de Transcriptase Reversa AMV, 5U/µL (concentração final 0,1U/µL), 1 µL de 1fl DNA Polimerase, 5u/µL (concentração final 0,1 u/µL), amostra de RNA (concentração final 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> cópias), água livre de nucleases, para volume final de 50 µL.
- As temperaturas da termociclagem recomendadas pelo kit são as seguintes: Para a RT, 1 ciclo de 45°C por 45 min (retrotranscrição), 1 ciclo de 94°C por 2 min (inativação da RT e RNA/cDNA/denaturação do primer. Para a PCR, 40 ciclos de: 94°C por 30 seg (denaturação), 60°C por 1 min (anelamento), 68°C por 2 min (extensão), 68°C por 7 min (extensão final).

### Sequenciamento dos produtos amplificados

- Purificar as amostras que resultem positivas na amplificação com os genes *ompA* e *ompB*, utilizando o kit Purelink™ (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.
- Inserir o produto de DNA amplificado e purificado no vetor pGEM-1 Easy (Promega, Madison, EUA), conforme protocolo do fabricante: misturar 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer (Promega, Madison, EUA), 14 DNA ligase, 1 µL pGEM-1 Easy (50 ng), 3 µL do produto purificado da PCR, 1 µL 14 DNA ligase, e incubar a reação *overnight* a 24,6°C.
- Transformar por choque térmico em *Escherichia coli* quimicamente competentes da linhagem TOP 10F<sup>+</sup>.
- Expandir as colônias positivas em meio LB líquido e extrair os plasmídeos recombinantes utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante.
- Para confirmação do tamanho do inserto das colônias recombinantes recomenda-se realizar uma PCR utilizando-se o par de primers que amplifica o fragmento de interesse.
- Realizar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo com 10 µL dos produtos da PCR e examinar em luz UV.
- Utilizar os clones dos genes, obtidos a partir da clonagem das amostras, para sequenciamento.
- Submeter as sequências obtidas ao programa BLAST do GeneBank para determinar similaridades com outras espécies.

### PROTOCOLO RECOMENDADO PELA WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA PESTE SUÍNA AFRICANA (AGÜERO et al., 2003)

- Preparar a amostra segundo usando o *kit High Pure PCR Template Preparation*, que permite avaliar vírus RNA e DNA.
- Preparar um homogeneizado 1/10 do material (carrapato) em PBS, centrifugar a 12.000 g X 5 minutos. Extrair o ácido nucléico do sobrenadante.
- Preparar as soluções da seguinte forma:
- Dissolver a proteinase K em 4,5 mL de água estéril e alíquotar em tubos de 500 µL. Armazenar a -20°C.
- Preparar o tampão de remoção de inibidores adicionando 20 mL de etanol absoluto ao tubo original.
- Preparar o tampão de lavado adicionando 80 mL de etanol absoluto ao tubo original.
- Pipetar 200 µL da amostra em tubo de 1,5 mL. Adicionar 200 µL do tampão de união e 40 µL da proteinase K. Misturar imediatamente. Incubar por 10 minutos a 72°C.
- Centrifugar rapidamente para retirar as gotas que ficaram na tampa do tubo.
- Adicionar 100 µL de isopropanol.
- Colocar o tubo de filtrado em um tubo coletor e pipetar a amostra no reservatório. Centrifugar por 1 minuto a 8.000 x g.

- Descartar o tubo coletor e colocar o tubo de filtrado em novo microtubo de 1,5 mL.
- Para eluir o ácido nucléico, adicionar 50 µL de água estéril pré-aquecida (70°C) no reservatório. Centrifugar por 1 minuto a 8000 x g e armazenar a -20°C até seu uso.
- Preparar a mistura para a PCR com: 2,5 µL de 10 X PCR tampão II (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,25 µL de cada primer (na concentração 20 pmol/µL) [forward PPA-1 (5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3'), 0,25 µL do primer reverso (5'-CCC-IGA-AIC-GGA-GCA-TCC-1-3')], 0,125 µL de Taq Gold DNA polimerase (5 U/µL).
- Adicionar 23 µL da reação de mistura de PCR e 2 µL da amostra em tubo de PCR de 0,2 mL.
- Correr no termociclador seguindo o seguinte programa: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Finalizar com 1 ciclo a 72°C por 7 minutos.
- No final do programa, remover os tubos do termociclador e adicionar 2,5 µL do 10 x tampão de corrida em cada tubo (0,2% xileno cianol, 0,2% azul bromofenol, 30% glicerol).
- Analisar as amostras em gel de agarose 2%, voltagem 150-200 volts por 30 minutos (utilizar tampão TAE 50X).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; DOWD, S. E.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Microbiology**, v.11, n. 1, p. 1-11, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. J.; BARBIERI, A. R.; LABRUNA, M. B. Environmental infestation and Rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 367-372, 2013.
- BRONZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. 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.
- CHANG, G. J.; TRENT, D. W.; VORNDAM, A. V.; VERGNE, E.; KINNEY, R. M.; MITCHELL, C. J. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR enzyme-linked immunosorbent assay to detect and characterize flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 477-483, 1994.
- CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. S.; LEE, K. H.; BAIK, H. S.; CHOI, M. S.; KIM, I. S.; JANG, W. J. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. **Clinical and Diagnosis of Laboratory Immunology**, v. 12, n. 6, p. 756-763, 2005.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 6938-6946, 2008.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; BREY, R. Flying ticks: anciently evolved associations that constitute a risk of infectious disease spread. **Parasites & Vectors, on line**, v. 8, p. 538 (11 páginas), 2015.
- DEL FIOLE, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, 461-466, 2010.

- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 6, p. 613-619, 1999.
- FULOP, L.; BARRET, A. D. T.; PHILLIPOTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R. W. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. *Journal of Virological Methods*, v. 44, n. 2-3, p. 179-188, 1993.
- KOSOY, O. I.; LAMBERT, A. J.; HAWKINSON, J.; PASTULA, D. M.; GOLDSMITH, C. S.; HUNT, D. C.; STAPLES, J. E. Novel Thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerging Infectious Disease*, v. 21, n. 5, p. 760-764, 2015.
- LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.
- LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. *Parasitology*, v. 129, Supplement S1, p. 221-245, 2004.
- LANI, R.; MOGHADDAM, E.; HAGHANI, A.; CHANG, L. Y.; ABUBAKAR, S. Tick-borne viruses: A review from the perspective of therapeutic. *Ticks and Tick Borne Diseases*, v. 5, n. 5, p. 457-465, 2014.
- LA SCOLA, B. L.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.
- MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.
- MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; NEGRETE, Y.; COLOMBO, E. R. S. Isolation of *Rickettsia* in vero cell culture. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 5, p. 469-473, 1999.
- MORELI, M. L.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Identification of Simbu, Califórnia and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 108-113, 2001.
- PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R. M.; KAADEN, O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 57, n. 6, p. 709-718, 1997.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, Pt. 4, p. 1449-1455, 2000.
- RUST, R.S. Human arboviral encephalitis. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 19, n. 3, p. 130-151, 2012.
- SARAIVA, S. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerging Infectious Disease*, v. 20, n. 9, p. 1504-1510, 2014.
- SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; MÁRCIO, A. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. *Emerging Infectious Disease*, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.
- SÜSS, J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, v. 1, Supplement 1, p. 19-35, 2003.
- SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, n. 27, p. 1-9, 2013.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J.; DE BARROS, S. S.; RIET-CORREA, F. O surto de peste suína africana ocorrido em 1978 no município de Paracambi, Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 223-238, 2004.
- ZHANG, Y. Z.; ZHOU, D. J.; XIONG, Y.; CHEN, X. P.; HE, Y. W.; SUN, Q.; YU, B.; LI, J.; DAI, Y. A.; TIAN, J. H.; QIN, X. C.; JIN, D.; CUI, Z.; LUO, X. L.; LI, W.; LU, S.; WANG, W.; PENG, J. S.; GUO, W. P.; LI, M. H.; LI, Z. J.; ZHANG, S.; CHEN, C.; WANG, Y.; DE JONG, M. D.; XU, J. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, v. 32, n. 3, p. 209-220, 2011. (In Chinese with English summary).

