

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
Centro de Ciências Naturais e Humanas — CCNH

VERONICA NIKOLUK FRIOLANI

Detecção molecular de alphavírus em amostras de cDNA  
do soro de pacientes febris de Marília/SP, com diagnóstico  
clínico de febre da dengue

Santo André — 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
Centro de Ciências Naturais e Humanas — CCNH

VERONICA NIKOLUK FRIOLANI

Detecção molecular de alphavírus em amostras de cDNA  
do soro de pacientes febris de Marília/SP, com diagnóstico  
clínico de febre da dengue

Trabalho de Conclusão de Curso da  
Universidade Federal do ABC – UFABC –  
como requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Aparecida  
Sperança.

Santo André — 2021

## **Folha de assinaturas**

Esse exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, conforme as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única da autora e com a anuência da orientadora. A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo avaliou e aprovou este Trabalho de Conclusão de Curso da aluna VERONICA NIKOLUK FRIOLANI realizada dia 16 de dezembro de 2021

---

**VERONICA NIKOLUK FRIOLANI**

---

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DRA. MARCIA APARECIA SPERANÇA**  
**Universidade Federal do ABC — CCNH — UFABC**

---

**PROFa DRa. Aline Diniz Cabral**  
**Universidade Federal de Uberlândia — UFU**

---

**Mestre Edmar Silva Santos.**  
**Doutorando do curso de Biossistemas**  
**Universidade Federal do ABC**

## Resumo

As arboviroses, viroses transmitidas por artrópodes, são causadoras de importantes doenças infecciosas, sendo a mais prevalente atualmente, a febre da dengue, seguida por febre-amarela, febre do Oropouche e febre do Mayaro. Os vírus da Dengue (DENV), da Febre Amarela (YFV) e o Mayaro (MAYV), podem ser transmitidos pelo mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, cuja presença está associada à ocorrência de febre da dengue em todo o território nacional. A transmissão dos vírus MAY ocorre no ambiente silvestre ou rural em áreas próximas a florestas com participação de primatas não humanos, aves e mosquito *Haemagogus ssp.* O potencial de dispersão desses vírus e a possibilidade de participação de espécies de mosquitos *Aedes* em seu ciclo de transmissão indicam a necessidade de estudos epidemiológicos de MAYV para prevenir os surtos rurais e também possíveis surtos urbanos. Devido à natureza não específica dos sinais e sintomas da febre causada por MAYV, o diagnóstico clínico é difícil e a febre por MAYV pode ser confundida com outras doenças febris como a febre da dengue, febre-amarela, leptospirose e a malária. Além disso, há evidências recentes da circulação concomitante do DENV e MAYV em uma mesma população de Manaus. Durante epidemias de febre da dengue, em cidades com 200.000 habitantes, quando o número de casos de dengue confirmados laboratorialmente atingem 150/100.000 habitantes, a notificação é realizada e os casos novos não são investigados laboratorialmente. Além disso, não há testes de diagnóstico específico para o vírus MAY disponível nas instituições de saúde pública brasileiras, responsáveis pelo diagnóstico de doenças transmitidas por vetores, como o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. Portanto, esse projeto teve por finalidade verificar a presença do MAYV em amostras de soro de pacientes febris com diagnóstico clínico de febre da dengue da cidade de Marília/SP no ano de 2007.

## Abstract

Arboviruses, viruses transmitted by arthropods, cause important infectious diseases. The most prevalent arboviruses in Brazil are dengue fever, followed by yellow fever, Oropouche fever and Mayaro fever. Dengue (DENV), Yellow Fever (YFV) and Mayaro (MAYV) viruses can be transmitted by the same vector, the *Aedes aegypti* mosquito female, whose presence is associated with the occurrence of dengue fever throughout the national territory. The transmission of MAY viruses occurs in the wild or rural environment in areas close to forests with the participation of non-human primates, birds and the mosquito *Haemagogus* ssp. The potential for dispersal of these viruses and the possibility of participation of *Aedes* mosquito species in their transmission cycle indicate the need for epidemiological studies of MAYV to prevent rural outbreaks and also possible urban outbreaks. Due to the non-specific nature of the signs and symptoms of MAYV fever, clinical diagnosis is difficult and MAYV fever can be confused with other febrile illnesses such as dengue fever, yellow fever, leptospirosis, and malaria. Furthermore, there is recent evidence of the concomitant circulation of DENV and MAYV in the same population of Manaus. During dengue fever epidemics, in cities with 200,000 inhabitants, when the number of laboratory-confirmed dengue cases reaches 150/100,000 inhabitants, notification is carried out and new cases are not investigated in the laboratory. In addition, there are no specific diagnostic tests for the MAY virus available in Brazilian public health institutions responsible for diagnosing vector-borne diseases, such as the Adolfo Lutz Institute in São Paulo. Therefore, this project aimed to verify the presence of MAYV in serum samples from febrile patients with a clinical diagnosis of dengue fever in the city of Marília/SP in 2007

## **Sumário**

<b>Folha de assinaturas</b>	3
<b>Resumo</b>	3
<b>Sumário</b>	5
<b>Introdução e Justificativa</b>	7
<b>Objetivo</b>	9
<b>Material e Métodos</b>	10
<b>Cronograma</b>	11
<b>Resultados e Discussão</b>	12
<b>Bibliografia</b>	14

## Introdução e Justificativa

Um exorbitante número de espécies de arbovírus tem sido isolado em diferentes áreas da Amazônia brasileira, principalmente no estado do Pará, entre os anos de 1954 e 1998. Das 187 diferentes espécies de arbovírus isoladas, 32 são patogênicas para humanos causando febre, febre exantemática, doenças hemorrágicas e encefalites. Dentre esses, os vírus da Dengue, Febre Amarela, Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV) são os mais relevantes para a saúde pública por terem potencial de causar epidemias com alta morbidade e mesmo a morte de seres humanos (Vasconcelos, 2001).

A transmissão dos vírus Mayaro (MAYV) ocorre no ambiente silvestre ou rural em áreas próximas a florestas. O ciclo silvestre do vírus inclui vertebrados como primatas não humanos sendo seu principal vetor o mosquito *Haemagogus ssp.* As aves podem ser hospedeiros secundários, constituindo importante fonte de disseminação do vírus (Calisher et al., 1974; Vasconcelos et al. 1998). Os casos de febre causados por MAYV são esporádicos e ocorrem em pessoas com história de atividades recentes dentro ou próximas a florestas.

MAYV foi isolado pela primeira vez do sangue de cinco pacientes febris, da Ilha de Trinidad, em 1954 (Anderson et al, 1957). No Brasil, o primeiro isolamento do vírus ocorreu em 1955 a partir de amostras de sangue de vários pacientes febris com cefaléia de uma comunidade vivendo às margens do rio Guamá no estado do Pará (200Km á leste da cidade de Belém) (Causey et al., 1958). Posteriormente, outros surtos de febre por MAYV ocorreram em comunidades rurais da América do Sul em diferentes regiões do Brasil incluindo Pará, Goiás, Tocantins (Vasconcelos et al. 1998), Bolívia (Schaeffer et al, 1959), Peru (Tesh et al., 1999), Guiana Francesa (Talamini et al., 1998) e Venezuela (Torres et al., 2004). Recentemente, três casos de infecção por MAYV contraídos no estado brasileiro de Mato Grosso do Sul foram relatados em São Paulo (Coimbra et al., 2007), indicando que esse vírus possa estar presente em regiões não Amazônicas do Brasil e um diagnóstico específico é imprescindível para conhecer sua epidemiologia. Nesse aspecto é importante considerar que o MAYV pode ser potencialmente transmitido por espécies de mosquito do gênero

*Aedes* (Smith & Francy, 1998), o que corresponde a um potencial risco de ocorrência de surtos urbanos de febre por MAYV.

MAYV possui um genoma de RNA de orientação positiva de cerca de 11.500nt, não segmentado, o qual recebe uma cauda de poliadeninas na extremidade 3' e capeamento na extremidade 5'. O vírus possui simetria icosaédrica e envelope lipoproteico oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira onde se inserem as glicoproteínas E1 e E2 sob a forma de heterodímeros (Mezencio et al., 1990; Mezencio & Rebello, 1993). Os dois primeiros terços da sequência de RNA genômico à 5' corresponde ao locus da polimerase e codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1-4). Essas são responsáveis pela síntese de RNA de orientação negativa que servirá de molde para a produção de RNA genômico de orientação positiva e de um RNA subgenômico (26S), correspondendo ao último terço da sequência de RNA genômico viral. Essa porção codifica proteínas estruturais sob a forma de poliproteína, a qual após clivagem, origina a proteína do capsídeo (C – 34KDa), as glicoproteínas E2, E3, proteína 6K e glicoproteína E1 (Strauss & Strauss, 1994; Lavergne et al., 2006). A análise filogenética baseada na sequência que codifica as proteínas E1 e E2 de 60 isolados naturais de MAYV de diferentes regiões geográficas (Brasil, Peru, Venezuela, Trinidad, Panamá, Argentina e Colombia) demonstrou a existência de dois genótipos simpátricos na região Amazônica, denominados L (limited) e D (widely dispersed) (Powers et al., 2006). Os autores discutem a possibilidade da ocorrência de ciclos diferentes de transmissão de MAYV, sendo o genótipo D possivelmente relacionado à dispersão do vírus por aves migratórias. O potencial de dispersão desses vírus e a possibilidade de participação de mosquitos do gênero *Aedes* em seu ciclo de transmissão indicam a necessidade de estudos epidemiológicos de MAYV para prevenir os surtos rurais e também possíveis surtos urbanos.

Recentemente, o MAYV causou uma epidemia em Manaus, segundo uma pesquisa que será publicada pela "*Vector Borne and Zoonotic Disease*". Nesse estudo foi verificado que, de 600 amostras de sangue de indivíduos febris durante uma epidemia de dengue, em 33 havia a presença de MAYV, com quatro casos de hemorragia leve nunca antes descrita (COISSI 2011).



No Estado de São Paulo, quando há epidemias de dengue grande porte, onde o número de casos atinge o limite estabelecido pela saúde pública, os casos novos passam a ser notificados de acordo com o critério clínico-epidemiológico e não há mais confirmação laboratorial ([http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/deng07\\_n2012.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/deng07_n2012.htm)). No caso da cidade de Marília no interior do Estado de São Paulo, objeto do presente estudo, com 230.000 habitantes, o limite para a notificação compulsória é a de 150 casos/100.000 habitantes (SAÚDE 2011).

Devido à falta de confirmação laboratorial dos casos febris humanos em cidades com epidemia de febre da dengue, é possível a presença de outras doenças infecciosas comuns em estações quentes e chuvosas, como a febre causada por MAYV, leptospirose e febre amarela, as quais apresentam sintomas parecidos com os sintomas da febre da dengue e não são investigadas. Apesar de o MAYV ser endêmico em regiões onde não há muita urbanização pode ser transportado de uma cidade para outra quando a pessoa infectada sai do local onde foi infectado. No ano de 2007, três casos de Mayaro foram detectados no Estado de São Paulo (Terezinha Lisieux M. COIMBRA 2007). Como o mosquito *Ae. aegypti* pode ser um dos vetores de MAYV, e este vetor pode ser encontrado facilmente em qualquer região brasileira, o vírus tem potencial para provocar epidemias. Além disso, já foi descrito, no Brasil, a co-circulação de MAYV e DENV (COISSI, 2011). Portanto, este projeto tem por objetivo investigar a presença do arbovirus MAY em amostras de cDNA obtidas do soro de pacientes notificados compulsoriamente com febre da dengue, durante epidemia de dengue na cidade de Marília, São Paulo, no ano de 2007.

## **Objetivo**

Este projeto tem por objetivo investigar a presença do arbovírus Mayaro em amostras de cDNA obtidas do soro de pacientes notificados compulsoriamente com febre da dengue, durante epidemia de dengue na cidade de Marília, São Paulo, no ano de 2007.

## **Material e Métodos**

### **Amostras de soro humano.**

As amostras de soro humano utilizadas no estudo foram obtidas, durante o período de epidemia de dengue ocorrida de fevereiro a junho de 2007, de indivíduos com sintomas agudos de febre da dengue, encaminhados ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília após terem sido atendidos nas unidades do Sistema Único de Saúde e/ou no Hospital das Clínicas de Marília. Como durante a epidemia desse período no ano de 2007 o número de casos atingiu mais de 500 casos/100.000 habitantes, todos os pacientes com sintomas de dengue foram notificados sem exame laboratorial específico.

### **Padronização da técnica de detecção do arbovírus Mayaro por PCR e análise de amostras humanas.**

A partir de 140µl de uma amostra de cultura de células C6/36 de *Aedes albopictus* infectadas com o arbovírus Mayaro e, com efeito citopático, foi obtido o RNA total com o emprego do kit da Qiagen® para extração de RNA de vírus a partir de amostras de fluidos segundo instruções do fornecedor. Posteriormente, 5µl do RNA total obtido foi utilizado em reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV da Promega e 100ng de oligonucleotídeos aleatórios de seis bases, de acordo com instruções do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado em reação de PCR com a enzima GoTaq DNA polymerase da Promega segundo instruções do fornecedor, e os oligonucleotídeos MC2w/MC3w para amplificação de um fragmento de DNA de 434pb correspondente a proteína não estrutural 1 (NSP1) de alphavirus, descrito por Bronzoni e colaboradores (Bronzoni, Moreli et al. 2004). Foram feitos testes com diferentes diluições de cDNA e 8µL do produto de cada reação de PCR foram corados com GelRed, resolvidos em gel de agarose a 1% e visualizados em sistema de análise de imagem Gel Logic 212 Pro da Carestream, após exposição a luz UV. As condições de reação utilizadas foram: 94°C 3', 40 ciclos de 94°C 1', 51°C 1' e 72°C por 1'; 1 ciclo de 72°C 7' e, por fim, as amostras foram mantidas à 12°C. Como controle negativo foi utilizada água no lugar de cDNA na reação de PCR. Após realizar a padronização da

reação, as mesmas condições foram utilizadas para o teste de diagnóstico de alphavirus a partir de 1uL das amostras de cDNA obtidas a partir do RNA de soro de pacientes da cidade de Marília/SP com diagnóstico compulsório de febre da dengue, coletadas no ano de 2007. Em cada teste de diagnóstico por PCR realizado, foram adicionados um controle positivo e um controle negativo da reação.

## **Cronograma**

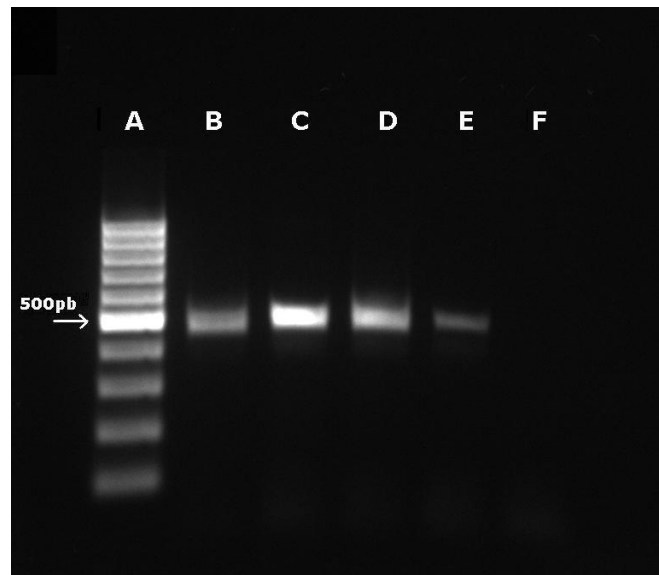
Com o propósito de facilitar a organização do projeto e contribuir para que os objetivos sejam alcançados, sua execução foi dividida basicamente em três etapas:

- 1ª Etapa: Nesta etapa foi feita a padronização da técnica de detecção de alphavirus.
- 2ª Etapa: Neste período foi realizada a investigação da presença de alphavirus a partir das amostras de cDNA obtido do soro de pacientes com diagnóstico compulsório de febre da dengue.
- 3ª Etapa: Os resultados foram preparados para apresentação no Simpósio de Iniciação Científica.

## Resultados e Discussão

A primeira etapa do projeto consistiu na padronização da técnica de detecção de alphavirus segundo método de Bronzoni e colaboradores. Para realizar a padronização do método de detecção do alphavirus, foi inicialmente feita uma cultura de um isolado do arbovírus Mayaro obtido a partir do soro de um paciente de Acrelândia em 2004, disponível no laboratório, para extração de RNA total e obtenção de cDNA. A partir de diferentes diluições do cDNA obtido da cultura de Mayaro foi feita a reação de PCR conforme descrito por Bronzoni e colaboradores. Os resultados observados na figura 1 demonstram que a metodologia empregada permite a detecção do fragmento esperado de 434pb correspondente a NSP1 de alphavirus a partir de cDNA diluído 100 vezes.

Portanto, a mesma metodologia passou a ser empregada para a detecção de alphavirus a partir de amostras de cDNA de RNA do soro de pacientes de Marília, coletadas em 2007, com diagnóstico clínico de febre da dengue. Foram avaliadas 500 amostras com resultado negativo para a presença do arbovírus Mayaro.



**Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo os produtos da reação de RT/PCR para a padronização do diagnóstico do vírus Mayaro utilizando RNA extraído do sobrenadante da cultura do vírus em células C6/36. Para a reação de RT/PCR foram utilizadas as enzimas MMLV e GoTaq DNA polymerase da Promega, respectivamente. A reação de PCR foi realizada com os oligos MC2w/MC3w os quais amplificam um fragmento de 434pb correspondente ao gene que codifica a NSP1 de alphavirus. A – marcador de peso molecular; B – 2uL de cDNA; C-1uL de cDNA; D – 1uL de cDNA diluído 10 vezes; E – 1uL de cDNA diluído 100 vezes; F- controle negativo.**

A partir desses resultados negativos podemos concluir que durante a epidemia de Dengue em Marília no ano de 2007 ainda tínhamos poucos casos ou uma baixa circulação de MAYV na região e a probabilidade de encontrar uma amostra positiva para DENV e MAYV era muito baixa.

Em 2012 ocorreu surto de dengue no estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil, quando 44.814 casos foram relatados, 96,2% atribuídos ao DENV-4 e 3,8% ao DENV-1. As amostras foram coletadas entre janeiro a maio de 2012, período do ano que oferece condições ambientais favoráveis à proliferação do vetor e à atividade dos arbovírus. MAYV foi detectado em 15 (2,5%) de 604 pacientes. Dos 15 pacientes positivos para MAYV, 12 (80%) também foram positivos para DENV-4. Em 2016, ocorreu um surto em Morropon,

Piura — Peru, foram detectados 86/496 (17,3%) casos de MAYV, dos quais 54 eram mono infecção por MAYV e 32 co-infecção por DENV, correspondendo a 10,9% e 6,4%, respetivamente. O Peru possui o 2º maior número de casos notificados na América Latina atrás apenas do Brasil. Estes estudos confirmam por diagnóstico molecular a co-infecção de DENV e MAYV em diferentes locais e períodos, tal qual a premissa deste estudo.

A metodologia padronizada neste estudo poderá ser utilizada para investigação de infecção por MAYV, importante arbovirose em países da América Latina, incluindo diferentes regiões do Brasil.

## Bibliografia

- Aguilar-Luis, M.A., del Valle-Mendoza, J., Sandoval, I. et al. A silent public health threat: emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. *BMC Res Notes* 14, 29 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05444-8>
- Ana Cecília Ribeiro Cruz, e. a. (Novembro de 2009). Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, pp. 2517-2523.
- Anderson CR, Downs WG, Wattley GH, Ahin NW and Reese AA. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad. *Amer J Trop Med Hyg* 6: 1012-1016.
- Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. (2005). Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol* 43(2):696-702.
- Calisher CH, Gutierrez E, Maness KS, Lord RD. (1974). Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana. *Bull Pan Am Health Organ* 8:243-248.
- Causey OR, Maroja O and Azevedo MC. (1958). Epidemia pelo vírus Mayaro no Estado do Pará. *Ver Serv Esp Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 10(1): 152-154.
- Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. (s.d.). *Estudo filogenético do Vírus Dengue - 2, Estado de São Paulo, 2010*. Acesso em 29 de 04 de 2012, disponível em Instituto Adolfo Lutz - Laboratório de Saúde Pública: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=8&Itemid=28](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=8&Itemid=28)
- Coimbra TLM, Santos CLS, Suzuki A, Petrella SM, Bisoridi I, Nagamori AH, Marti AT, Santos RN, Fialho DM, Lavigne S, Buzzar MR and Rocco IM. (2007). Mayaro vírus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo* 49(4):221-224.
- COISSI, J. (19 de 02 de 2011). Acesso em 2012, disponível em Folha.com: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/878131-manauas-tem-surto-de-virus-semelhante-ao-da-dengue.shtml>.
- Lavergne A, Thoisy B, Lacoste V, Pascalis H, Pouliquen J-F, Mercier V, Tolou H, Dussart P, Morvan J, Talarmin A, Dazanji M. (2006). Mayaro vírus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Res* 117, 283-290.
- Mezencio JM, de Souza W, Fonseca ME, Rebello MA. (1990). Ultrastructural study of Mayaro virus replication in BHK-21 cells. *Arch Virol* 114(3-4):229-35.

- Mezencio JM, Rebello MA. (1993). Mayaro vírus proteins. Mem Inst Oswaldo Cruz 88(2):299-304.
- Pinheiro FP & LeDuc JW. (1986). Mayaro vírus disease. In: Monath TP ed. The arbovirus epidemiology and ecology, Boca Raton, CRC, v3, p137-150.
- Powers AM, Aguilar PV, Chandler LJ, Brault AC, Meakins TA, Watts D, Russell KL, Olson J, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa A, Weaver SC and Tesh RB. (2006). Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. Am J Trop Med Hyg 75(3): 461-469.
- SAÚDE, M. D. (2011). PORTARIA Nº 104, DE 25 DE JANEIRO DE 2011. *PORTARIA Nº 104, DE 25 DE JANEIRO DE 2011* .
- Schaeffer M, Gajdusek DC, Lenna AB, Eichenwald H. (1959). Epidemic jungle fevers among Okinawan colonists in the Bolivian rain forest. I. Epidemiology. Am J Trop Méd Hyg 32:854-861.
- Strauss JH and Strauss EG. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiol Rev 58:491-562.
- Talarmin A, Chandler LJ, Kazanji M, de Thoisy B, Debon P, Lelarge J, Labeau B, Bourreau E, Vié JC, Shope RE, Sarthou JL. (1998). Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. Am J Trop Med Hyg. 59(3):452-6
- Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, Ramirez G, Vasquez B, Hayes CG, Rossi CA, Powers AM, Hice CL, Chandler LJ, Cropp BC, Karabatsos N, Roehrig JT, Gubler DJ. (1999). Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. Clin Infect Dis 28(1):67-73.
- Torres JR, Russell KL, Vasquez C, Barrera R, Tesh RB, Salas R and Watts DM. (2004). Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. Emerging Infect Dis 10(7): 1304-1306.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, Dégallier N and Travassos da Rosa ES. (1998). Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC and Travassos da Rosa JFS Eds., p. 72-99. Belém, Instituto Evandro Chagas.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N and Travassos da Rosa JFS. (2001). Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. Cad Saúde Pública 17(Supl): 155-164.
- Vasconcelos PFC. (2003). Diagnosis of viral disease. The Lancet 361:1589.



Zuchi, Nayara et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2014, v. 109, n. 06, pp. 820-823. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0074-0276140108>>. Epub 19 Aug 2014. ISSN 1678-8060. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140108>.

---