

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**DETECÇÃO DE BUNYAVÍRUS EM FLEBOTOMÍNEOS
COLETADOS EM DUAS ÁREAS DO ESTADO DO AMAZONAS,
BRASIL**

KATIANNE BARBOSA ALVES DE SOUSA

**Manaus
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

KATIANNE BARBOSA ALVES DE SOUSA

**DETECÇÃO DE BUNYAVÍRUS EM FLEBOTOMÍNEOS
COLETADOS EM DUAS ÁREAS DO ESTADO DO AMAZONAS,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de mestre.
Linha de pesquisa: Biologia de agentes infecciosos e parasitários.

Orientador: Dr. Felipe Gomes Naveca

**Manaus
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725d Sousa, Katianne Barbosa Alves de
Detecção de Bunyavírus em flebotomíneos coletados em duas áreas do Estado do Amazonas, Brasil / Katianne Barbosa Alves de Sousa. 2017
66 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Gomes Naveca
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bunyavírus. 2. Arbovírus. 3. flebotomíneos. 4. Citometria de fluxo. 5. Amazônia. I. Naveca, Felipe Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

*Às pessoas mais importantes da minha vida:
Pai, mãe, filha e irmãos*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me manter sempre de pé, mesmo passando por tantas dificuldades, provações para a realização desse projeto.

Aos meus pais, por aturar várias vezes, meu estresse, mau humor, desespero por ver que nada estava dando certo. Agradeço por esse amor incondicional que sempre tiveram. À vocês devo tudo o que tenho e sou. Amo-os tanto!

Aos meus irmãos Renato, que sempre me ajudou e apoiou e Katiusce, que mesmo tão longe, sempre soube me dizer as palavras de incentivos certas. Ela sempre disse que tudo daria certo no final.

À minha tão amada filha, que sofreu com a ausência, com minha falta de paciência, com toda a sobrecarga que levava para casa. Se hoje estou aqui, é por você, minha pequena.

À toda minha família, minhas avós, meu avô, meus tios, tias, primos e primas, que sempre se fizeram presente em minha vida. Os amo demais.

Ao George, por todo amor e companheirismo. E principalmente por ter estado ao meu lado quando mais precisei, o último ano do mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Naveca, pela oportunidade, paciência, pelo conhecimento ensinado e principalmente por todos os kits utilizados nesse projeto não-financiado...rs

À Dra. Paloma, minha primeira orientadora. Com ela dei meus passos iniciais na vida científica.

Aos colegas de laboratório: Mota e Diego, pela ajuda nas coletas e por terem me proporcionado ótimos momentos. Ao Victor e Valdinete, por terem dividido comigo as melhores lembranças que terei de um tempo bom, que ficará pra sempre em minha memória.

À doutora Michele Bastos, da Fundação de Medicina Tropical por ter cedido as amostras controle.

Aos meus amigos Lenne, Bruna e Lucas, pela paciência e compreensão. Por muitas vezes estive ausente, mas vocês estavam ao meu lado mesmo assim. Ao André Corado, por ter se mostrado um amigo maravilhoso. Dividiu comigo os momentos mais tensos da reta final do mestrado,

À minha turma do mestrado, pela amizade ao longo dos vários meses de disciplinas. Em especial, ao Frank, que se mostrou um grande amigo que levarei para a vida inteira.

À Capes, pela bolsa, extremamente importante...rs

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Epígrafe

" Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo;
não pases, nem te espantes,
porque o Senhor Deus é contigo,
por onde quer que andares. "

(Josué 1, 9)

RESUMO

Arbovírus são um grupo de vírus que apresenta um ciclo biológico bastante complexo, que envolve hospedeiros vertebrados suscetíveis e um ou mais vetor artrópode. Os *Phlebovirus* são arbovírus da família *Bunyaviridae* transmitidos por insetos do gênero *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no velho mundo. Estes insetos são importantes vetores de doenças tropicais, como a leishmaniose e vem causando surtos de síndromes febris pelo mundo. Mesmo com uma vasta fauna de flebotomíneos na região Amazônica poucos estudos tiveram como objetivo principal detectar vírus nestes vetores. Em função do descrito anteriormente o presente trabalho teve como objetivo a detecção de *Bunyavirus* em flebotomíneos coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus e no Ramal Nova Esperança, Manacapuru, Amazonas. Os flebotomíneos foram coletados em armadilhas de luz do tipo CDC adaptadas, além de coletas paralelas com aspiradores manuais. Os espécimes foram agrupados em *pools*, por sexo e armadilha, sendo posteriormente macerados. O material macerado foi inoculado em culturas de células VERO, seguido por técnicas de imunofluorescência indireta para família *Bunyaviridae*. As amostras positivas pela citometria de fluxo foram submetidas a ensaios moleculares, na tentativa de amplificação dos segmentos S e L de *Bunyavirus*. Dos 243 *pools* coletados foi identificada a presença de vírus da família *Bunyaviridae* em 17 *pools* através dos resultados obtidos pela citometria de fluxo, com base no deslocamento de células positivas que variaram entre 1,19 - 71,6%. Nesse projeto foi utilizado pela primeira vez um protocolo para Citometria de fluxo para *Bunyavirus*. Foram aplicadas também metodologias moleculares para detecção de *Bunyavirus*, seguidos de sequenciamento capilar e de Nova Geração. Entretanto, não foi possível a identificação viral por técnicas moleculares. As amostras estão armazenadas para experimentos futuros, na tentativa de elucidar questões como: a circulação de arbovírus de importância médica em flebotomíneos na Amazônia Ocidental Brasileira.

Palavras-chave: Bunyavírus, Arbovírus, flebotomíneos, Citometria de fluxo, Amazônia

ABSTRACT

The arbovirus are virus group with a complex life cycle, once vertebrate hosts as well as arthropod vectors are involved. The *Phlebovirus* are arboviruses of the *Bunyaviridae* family transmitted mainly by *Lutzomyia* insects in the new world and *Phlebotomus* in the old world. These insects are important vectors of tropical diseases, such as leishamianiasis, causing outbreaks of febrile syndromes worldwide. A large fauna of phlebotomus is observed in the Amazon region and a few studies aimed to detect virus at those vectors. The present study aimed to the detection of arboviruses in phlebotomus collected in the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus and at the Ramal Nova Esperança, Manacapuru, Amazonas. The phlebotomus were collected using adapted CDC light traps, including parallel collections with manual aspirators. Specimens were grouped in *pools* by sex and trap, and subsequently macerated. The macerated samples were inoculated into VERO cells, following by indirect immunofluorescence. The positives samples by flow cytometry were submitted to molecular assays, in order to amplify segments S and L of the *Bunyavirus*. Among the collected *pools*, 17 out of 243 were positive by flow cytometry, those samples presented displacement of positive cells within a range 1.19 – 71.6%. Also, molecular methods were applied for detection of *Bunyavirus*, following capillary and next generation sequencing. However, no virus was identified with this techniques. The samples are stored for futures studies, in order elucidate questions related to the presence of medical important arbovirus infecting phlebotomus at the Brazilian Western Amazon.

Keywords: Bunyavirus, Arbovirus, sandfly, flow cytometry, Amazon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke	16
Figura 2	Localização do Ramal Nova Esperança	16
Figura 3	Partícula viral dos <i>Bunyaviridae</i>	19
Figura 4	Imagem de fêmea ingurgitada de <i>N. umbratilis</i>	20
Figura 5	Imagem de um ponto de coleta, no Ramal Nova Esperança	22
Figura 6	Localização do Jardim Botânico- Reserva Florestal Adolpho Ducke	24
Figura 7	Localização dos pontos de coleta do Ramal Nova Esperança	25
Figura 8	Gaiolas entomológicas	26
Figura 9	Triagem do material sob banho de gelo	27
Figura 10	Material macerado sendo recolhido dos microtubos com auxílio de seringas.	29
Figura 11	Imagem da seringa com o filtro de 0,45µm.	36
Figura 12	Análises de Células VERO infectadas com <i>Bunyavirus</i> por citometria de fluxo.	42
Figura 13	Médias de Intensidade de Fluorescência (MFI) em Células VERO infectadas com <i>Bunyavirus</i> analisadas pelo software FlowJo®.	44
Figura 14	Gel da otimização das PCRs, das amostras CARV e CANDV.	45
Figura 15	Gel da otimização da PCR, utilizando cDNA com random primers.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores utilizados na otimização das PCRs.	34
Tabela 2	Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.	35
Tabela 3	Reagentes utilizados para síntese de cDNA.	38
Tabela 4	Volume e concentração final de reagentes utilizados na PCR.	38
Tabela 5	Amostras utilizadas no sequenciamento de Nova Geração.	39
Tabela 6	Identificação dos <i>pools</i> dos flebotomíneos coletados.	41
Tabela 7	Médias de deslocamento de células positivas e intensidade de fluorescência detectadas através da Citometria de Fluxo	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CARV- Vírus Caraparu

CANDV- Vírus Candiru

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar

CN- Controle negativo

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dpi- dias pós inoculação

F- fêmea

FACS- Classificador de células ativado por fluorescência

FING- fêmea ingurgitada

FSC- tamanho celular

ICVT- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

M- macho

MFI- média de intensidade de fluorescência

OROV- Vírus Oropouche

PBS- solução salina tamponada com fostato

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

RT- transcriptase reversa

SFB- soro fetal bovino

SSC- granulidade e complexidade celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	17
2.1 Arboviroses	17
2.2 Família <i>Bunyaviridae</i>	17
2.2.1 Flebovírus	19
2.3 Flebotomíneos.....	20
3 OBJETIVO GERAL.....	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Áreas de estudo	25
4.2 Coleta dos Phlebotominae	28
4.3 Processamento das amostras (TRIAGEM)	29
4.4 Preparação do inóculo- Isolamento viral.....	30
4.5 Inoculação das amostras	30
4.6 Detecção de <i>Bunyavirus</i> por Citometria de Fluxo em cultura de células VERO infectadas.....	32
4.7 Detecção de arbovírus por técnicas moleculares.....	33
4.7.1 Extração de Ácido Ribonucléico viral (RNA viral).....	33
4.7.2 Produção de Ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)	34
4.7.3 Otimização das PCRs.....	35
4.7.4 Reação de Sequenciamento(Sanger)	36
4.7.5 Análise de sequência.....	37
4.8 Sequenciamento de alto desempenho (Ion Torrent) e análises	38
4.8.1 Tratamento da amostra para extração de RNA.....	39
4.8.2 Extração do RNA viral	39
4.8.3 Quantificação do RNA extraído.....	40
4.8.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida da síntese de DNA complementar (cDNA).....	41
4.8.5 Preparo da biblioteca, template e sequenciamento de nova geração	42
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Identificação dos flebotomíneos	46
5.2 Isolamento em cultura celular	48

5.3 Detecção de <i>Bunyavirus</i> em cultura de células VERO infectadas através da Citometria de Fluxo.....	48
5.3 Detecção de arbovírus por técnicas moleculares.....	51
5.4 Caracterização de arbovírus por sequenciamento nucleotídico	53
5.5 Sequenciamento de alto desempenho (Ion Torrent)	53
6. DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus, termo derivado da expressão inglesa “arthropod-borne viruses”, são vírus transmitidos por artrópodes (mosquitos, moscas, carrapatos e flebotomíneos) durante o repasto sanguíneo (Pinheiro et al. 1991; Weaver 1997). Os arbovírus estão classificados taxonomicamente em seis famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Reoviridae* (Go et al, 2014).

Segundo Figueiredo (2007), no país foram isoladas e identificadas mais de 200 diferentes espécies de arbovírus, 1/3 da estatística mundial. Dentre estes, 10 correspondem a flebovírus, de acordo com ICTV (2015).

Os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo observar uma predominância nas regiões tropicais, pois oferecerem condições ecológicas mais favoráveis, devido seu clima quente e úmido (Travassos da Rosa et al.1997). A grande diversidade de vetores hematófagos e possíveis hospedeiros vertebrados silvestres naturais, além das atividades antrópicas intensificadas, resultam em alterações importantes no ambiente natural, acarretando o aparecimento de casos isolados, surtos e epidemias de arboviroses (Travassos da Rosa et al. 1997; Vasconcelos et al. 1998).

Na Amazônia, os arbovírus têm sido isolados em praticamente todos os estados da região. Os flebovírus, na sua maioria, foram isolados e descritos no estado do Pará, pelo grupo de pesquisa em arbovirologia do Instituto Evandro Chagas (Tesh, 1989). A escassez de dados no estado do Amazonas contribui para importância de se investigar a presença de arbovírus da família *Bunyaviridae* em maior detalhe.

Entre os possíveis vetores no novo mundo estão os flebotomíneos (*Lutzomyia*), dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Estes apresentam uma grande importância médico/veterinária, pois são vetores da *Leishmania*, protozoário que causa leishmaniose em mais de 80 países do velho e novo mundo (Depaquit et al 2010).

De acordo com Feitosa (2006), tanto a zona franca de Manaus como outros projetos desenvolvimentistas, promoveram a migração da zona rural para a cidade, levando ao surgimento de áreas de invasão urbana, principalmente na periferia. Paes et. al (1998), enfatizaram que na medida que ocorrem essas invasões na periferia da cidade e novos conjuntos habitacionais são construídos, populações de flebotomíneos podem ficar isoladas, devido aos fragmentos de floresta que ficam intercalados com as construções.

Segundo Paes (1991), os flebotomíneos que vivem em ambientes modificados sobrevivem se alimentando do sangue de seus hospedeiros mamíferos e do homem e/ou animais que vivem no peridomicílio. Assim, o surgimento de novos bairros e assentamentos populacionais na cidade de Manaus e seu entorno, avançando em direção à floresta que circunda a cidade, pode representar um aumento no número de casos de doenças, como é o caso da leishmaniose, que podem ser transmitidas por este vetor.

A cada ano as arboviroses acometem número maior de indivíduos, porém, grande parte delas permanece pouco conhecida e sem qualquer tipo de intervenção. Portanto, é de grande relevância detectar arbovírus de importância médica em flebotomíneos em duas localidades onde sua fauna tem sido bastante estudada: 1) uma área que fica às margens do populoso bairro Cidade de Deus, na periferia da cidade de Manaus (Figura 1); 2) Ramal Nova

Esperança (Figura 2), local em fase de crescimento com presença de assentamentos nas suas proximidades.

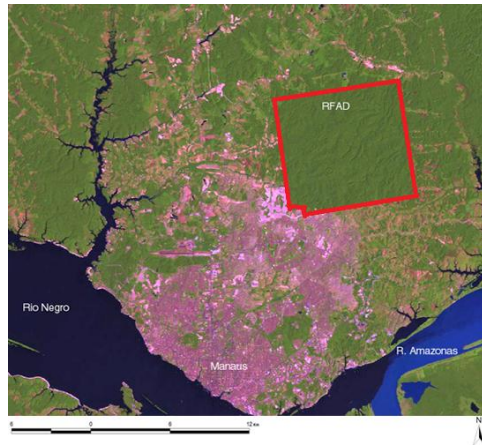


Figura 1: Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke
Fonte: <http://peld.inpa.gov.br/sitios/ducke>

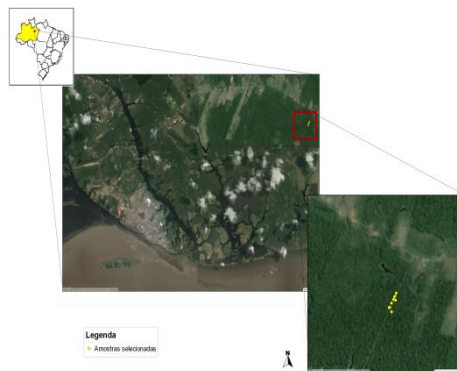


Figura 2: Localização do Ramal Nova Esperança, latitude de 3°17'49" S e longitude de 60°37'28" W

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Arboviroses

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, mantidos na natureza em ciclos, podendo ser enzoóticos e/ou epizoóticos, envolvendo os artrópodes como vetores e os vertebrados como principais hospedeiros suscetíveis e/ou reservatórios (WHO 1967). Este ciclo se completa pela infecção de artrópodes que se alimentam de animais que contêm o vírus na corrente sanguínea, ou animais virêmicos. Pode ocorrer também transmissão vertical, através de uma via transovariana, na qual a fêmea transmite o vírus à sua descendência. (Pinheiro et al. 1997).

A distribuição geográfica dessas doenças está associada à distribuição dos vetores, que predominam nas regiões tropicais, propiciando assim, um aumento no surto dessas doenças, que passam a ser mais comuns nos períodos de chuva (Blair et al. 2000). Este fato não exclui casos de arboviroses em regiões de clima frio, como pode ser observado pelas encefalites japonesa, russa e equina (Pinheiro et al. 1991; Brooks et al. 2000).

A infecção por arbovírus apresenta um quadro clínico muito variável, desde formas benignas, de natureza febril acompanhada ou não de exantemas, até formas mais graves, podendo ou não se caracterizar por manifestações hemorrágicas ou possíveis alterações neurológicas (Weaver 1997; Weaver et al. 2004).

2.2 Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* apresenta 100 espécies reconhecidas pelo ICTV (2015) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> e estão distribuídos em 5 gêneros com diferenças antigênicas e características moleculares: *Orthobunyavirus*,

Nairovirus, *Hantavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*. Os *Phlebovirus* são organizados em nove complexos antigênicos e subdivididos em dois grupos: Sandfly fever, que tem como vetores mosquitos e flebotomíneos; e Uukuniemi, que são transmitidos por carrapatos (Nichol et al 2005).

Alguns gêneros da família *Bunyaviridae* apresentam grande importância médica, como: o *Orthobunyavirus*, composto por 48 espécies segundo o ICTV (2015) e que tem como principal causador de febre aguda em humanos, o vírus Oropouche (Vasconcelos et al, 2011). As 24 espécies do gênero *Hantavirus* não estão associados a um vetor artrópode. São transmitidos a partir de roedores infectados aos seres humanos, principalmente na Ásia e Europa, causando síndrome renal (Iversson 1996). Nas Américas estão associados aos quadros de síndrome cardio-pulmonar graves (Dull et al. 1994). O gênero *Nairovirus*, é composto por 7 espécies e está associado a casos de febre hemorrágica. O gênero *Tospovirus*, contém vírus que são conhecidos por causar doenças em plantas e não em animais (Labuda 1991; Verani et al. 1991).

Os vírus pertencentes a família *Bunyaviridae* são esféricos e envelopados, medem de 80 a 120nm e possuem projeções glicoproteicas na superfície. O RNA genômico é composto por três segmentos com polaridade negativa, denominados segmentos grande - L (do inglês *Large*), contendo aproximadamente seis mil nucleotídeos, que codifica a proteína L. O segmento médio - M (do inglês *Medium*), com aproximadamente quatro mil nucleotídeos, que codifica as proteínas estruturais G1 e G2 do envelope viral e o segmento pequeno - S (do inglês *Small*), que apresenta aproximadamente novecentos

nucleotídeos, responsável por codificar a ribonucleoproteína (Mertz 1997; Schmaljohn 1996; Elliott 1989a; Elliott 1989b; Lees 1986). (Figura 3)

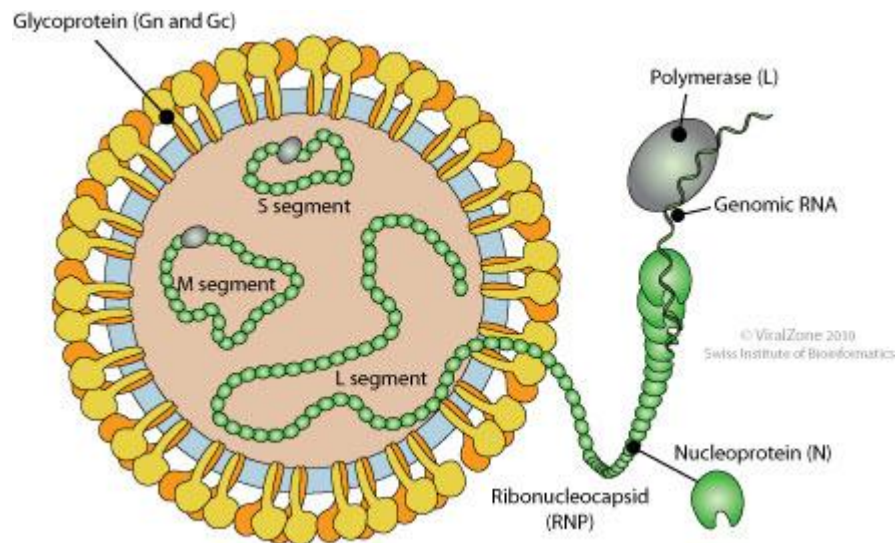


Figura 3: Imagem da partícula viral, podendo observar a estrutura viral com o genoma trisegmentado.

Fonte: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/82.html

2.2.1 Flebovírus

A doença, chamada febre dos flebotomíneos, foi relatada pela primeira vez em 1909, como uma febre causada por um vírus transmitido por flebotomíneos (Doerr et al. 1909 citado por Tesh et al. 1989). Durante a Segunda Guerra Mundial, essa febre tornou-se um grave problema de saúde pública para as forças militares na Índia, Paquistão e Palestina. Segundo Tesh (1989), soldados das tropas britânicas, americanas e alemãs foram infectados no norte da África e no Mediterrâneo. Vários surtos ocorreram na União Soviética durante o período de 1945-1950 (Gaidamovich et al 1974 citado por Tesh 1989), sendo o maior surto descrito na Sérvia em 1948, quando mais de um milhão de pessoas foram afetadas por flebovírus.

A partir de um estudo epidemiológico iniciado em 1976 no Irã, o *Phlebotomus papatasi* foi citado como vetor natural, sendo esse dado

confirmado mais tarde. A prevalência de isolados virais foi observada em humanos e pequenos roedores para vários vírus já conhecidos, completando assim as primeiras observações da circulação viral (Saidi et al. 1977; Tesh et al. 1977).

O gênero *Phlebovirus* apresenta dez espécies (*Bujaru virus*, *candiru virus*, *Chilibre virus*, *Frijole virus*, *Punta Toro virus*, *Rift Valley fever virus*, *Salehabad virus*, *Sandfly fever Naples virus*, *Uukuniemi virus*) (ICTV, 2015), as quais causam nos seres humanos uma variedade de síndromes, que podem ir desde uma doença febril leve até infecções do sistema nervoso central (Braito et al 1998; Depaquit 2010; Papa 2010).

2.3 Flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera e à família Psychodidae. São animais de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm de comprimento. Apresentam corpo delgado e bastante piloso, suas pernas são alongadas e delgadas (Rangel & Lainson 2003) (Figura 4). Possuem um par de asas anteriores e um segundo par reduzido, chamado de halter que é responsável pela estabilidade do seu voo, e são facilmente reconhecidos pelo voo saltitante na superfície de repouso.

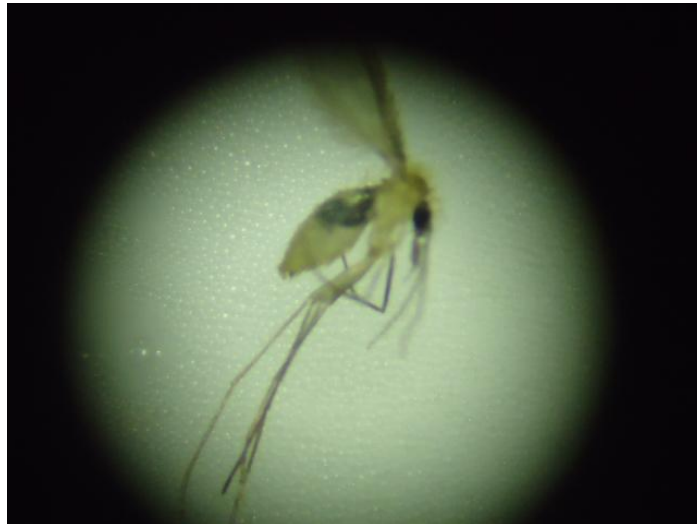


Figura 4: Imagem de fêmea ingurgitada de *N. umbratilis*. Fonte pessoal.

Como os demais dípteros, os flebotomíneos apresentam desenvolvimento holometábolo, possuindo assim em seu ciclo-de-vida, uma fase de ovo, uma fase de larva dividida em quatro ínstaes, uma fase de pupa e a fase adulta (Rangel & Lainson 2003).

Se alimentam na fase imatura principalmente de matéria orgânica presente no solo, onde as larvas se criam. Os adultos, tanto machos quanto fêmeas, têm como principal fonte de alimento os açúcares naturais, como a seiva de plantas, néctar e secreções de afídeos (Oliveira et al. 2000). Essas fontes alimentares são ricas em carboidratos, cuja finalidade é fornecer energia para exercerem as atividades de voo, acasalamento e postura (Oliveira et al. 2001). A fêmea necessita ainda ingerir sangue para viabilizar a maturação dos ovários, tornando-a um possível vetor de grande importância médica/veterinária.

Estudos como os de Endris et al. (1983) e de Tesh & Chaniots (1975), demonstraram a ocorrência de transmissão transovariana de vírus em flebotomíneos, indicando um mecanismo pelo qual os flebovírus podem ser

mantidos na natureza.

De acordo com Castellón (2000), as espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* França, 1924, apresentam grande importância à entomologia médica, do ponto de vista sanitário e de saúde pública, devido ao ato hematofágico das fêmeas e às doenças que podem ser veiculadas. Dentre as espécies encontradas em um levantamento da fauna flebotomínica na Reserva Florestal, a *Lutzomyia umbratilis* foi encontrada com maior abundância (Silva, 1993). Esta espécie é o mais importante vetor de *L. (Viannia) guyanensis*, responsável por casos humanos de leishmaniose tegumentar em áreas da região amazônica.

Este inseto torna-se infectado durante a noite quando se alimenta em reservatórios primários de *L. (V.) guyanensis*, dentre eles a preguiça (*Choloepus didactylus*) que habita a copa das árvores. É uma espécie bastante antropofílica, encontrada em abundância repousando em troncos de árvores durante o dia, e pode atacar avidamente o homem quando perturbada (Rangel & Lainson 2003).

De acordo com Barretto (1943), a distribuição dos flebotomíneos dá-se de acordo com os limites das regiões faunísticas, as quais podem apresentar espécies vivendo em associação íntima com o homem e os animais domésticos, e outras vivendo em habitats relativamente afastados de suas habitações naturais. O autor complementa relatando a existência de espécies que tem preferência por florestas secundárias, e espécies que vivem em florestas primárias, atacando o homem e os animais domésticos quando estes as penetram. Essa descrição muito se assemelha às características dos locais de estudo deste trabalho (Figura 5).



Figura 5: Imagem de um ponto de coleta, no Ramal Nova Esperança.
Fonte pessoal

3 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de Bunyavírus em flebotomíneos capturados em duas áreas do estado do Amazonas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar taxonomicamente os espécimes de flebotomíneos coletados;
- Isolar arbovírus em cultura de células VERO;
- Avaliar a aplicabilidade da Citometria de Fluxo para detecção de vírus da família *Bunyaviridae* em culturas de células infectadas;
- Aplicar técnicas moleculares para detecção de vírus da família *Bunyaviridae*;
- Utilizar técnicas de sequenciamento capilar e de Nova Geração para detecção e caracterização de vírus da família *Bunyaviridae*.

4 METODOLOGIA

4.1 Áreas de estudo

A Reserva Florestal Adolpho Ducke é uma área de proteção ambiental, situada no perímetro urbano da cidade de Manaus (Amazonas), que está sob responsabilidade do Ministério da Ciência e Tecnologia/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Sua sede principal está localizada no Km 27 da rodovia AM-010 (02°55'S; 50°59'W). É constituída por uma área total de 10.000 hectares, composta por floresta tropical de terra firme. Segundo Cabanillas & Castellón et al (1995), é uma área rica em espécies de flebotomíneos e compreende uma região de ocupação crescente.

O Jardim Botânico de Manaus possui 5 km², distribuídos em uma faixa de 500 m de largura por 6 km de comprimento ao longo da borda sul e 4 km ao longo da banda oeste da Reserva Florestal Adolpho Ducke. (Figura 6)

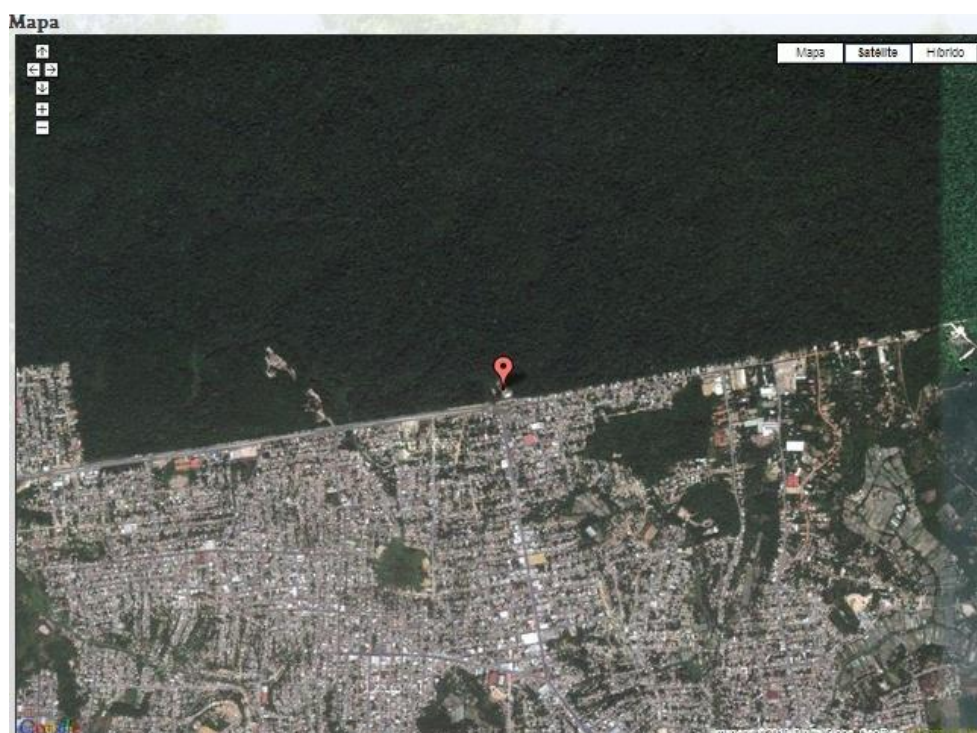


Figura 6: Localização do Jardim Botânico- Reserva Florestal Adolpho Ducke, destaque para a área limítrofe com o bairro Cidade de Deus.

Fonte: <http://jardimbotanicodemanaus.org/doku.php?id=publico:local>

O ramal Nova Esperança consiste em uma área de mata de terra firme ao longo da rodovia Manuel Urbano em Manacapuru, 68 km distante do município de Manaus e localizado à margem esquerda do Rio Solimões, na confluência com a foz do Rio Manacapuru. O município possui 7.335 km², altitude média de 34 m, latitude de 3°17'49" S e longitude de 60°37'28" W. Sua população é de 91.795 habitantes. (IBGE, 2013).

Seu clima é tropical chuvoso e úmido, com temperatura média de 26°C. Dentro do município, a coleta restringiu-se a área de mata: Ramal Nova Esperança, no qual pode-se observar a existência de pequenos assentamentos com plantações de mandioca. Este Ramal tem apresentado um crescimento nas áreas desmatadas, com várias clareiras. (Figura 7).

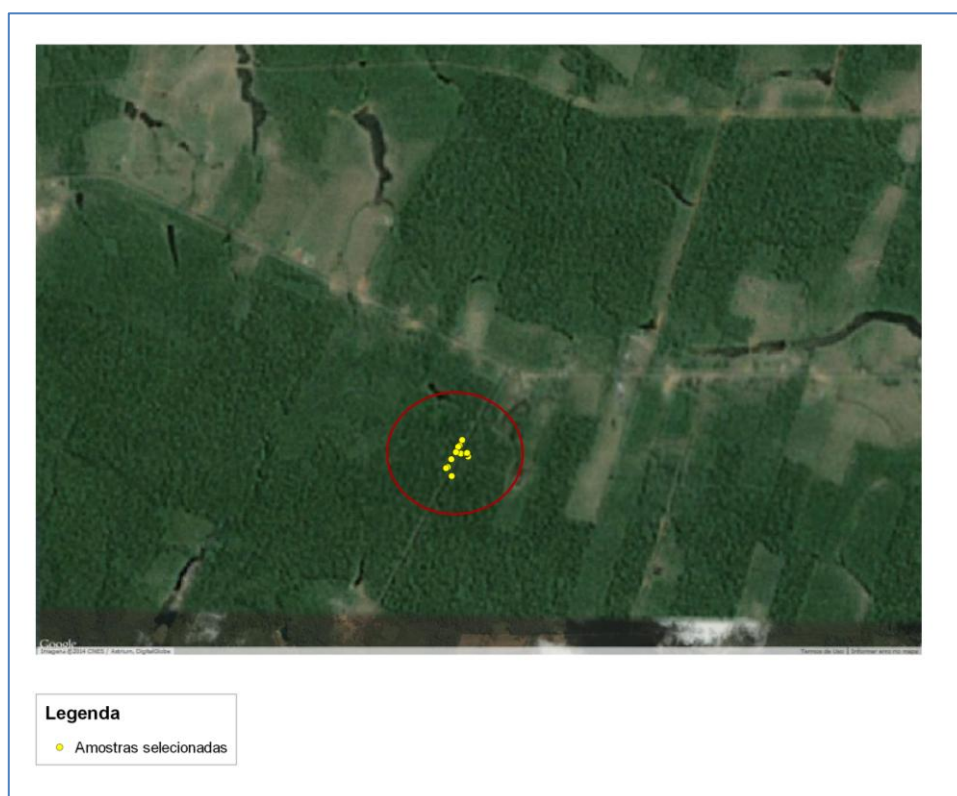
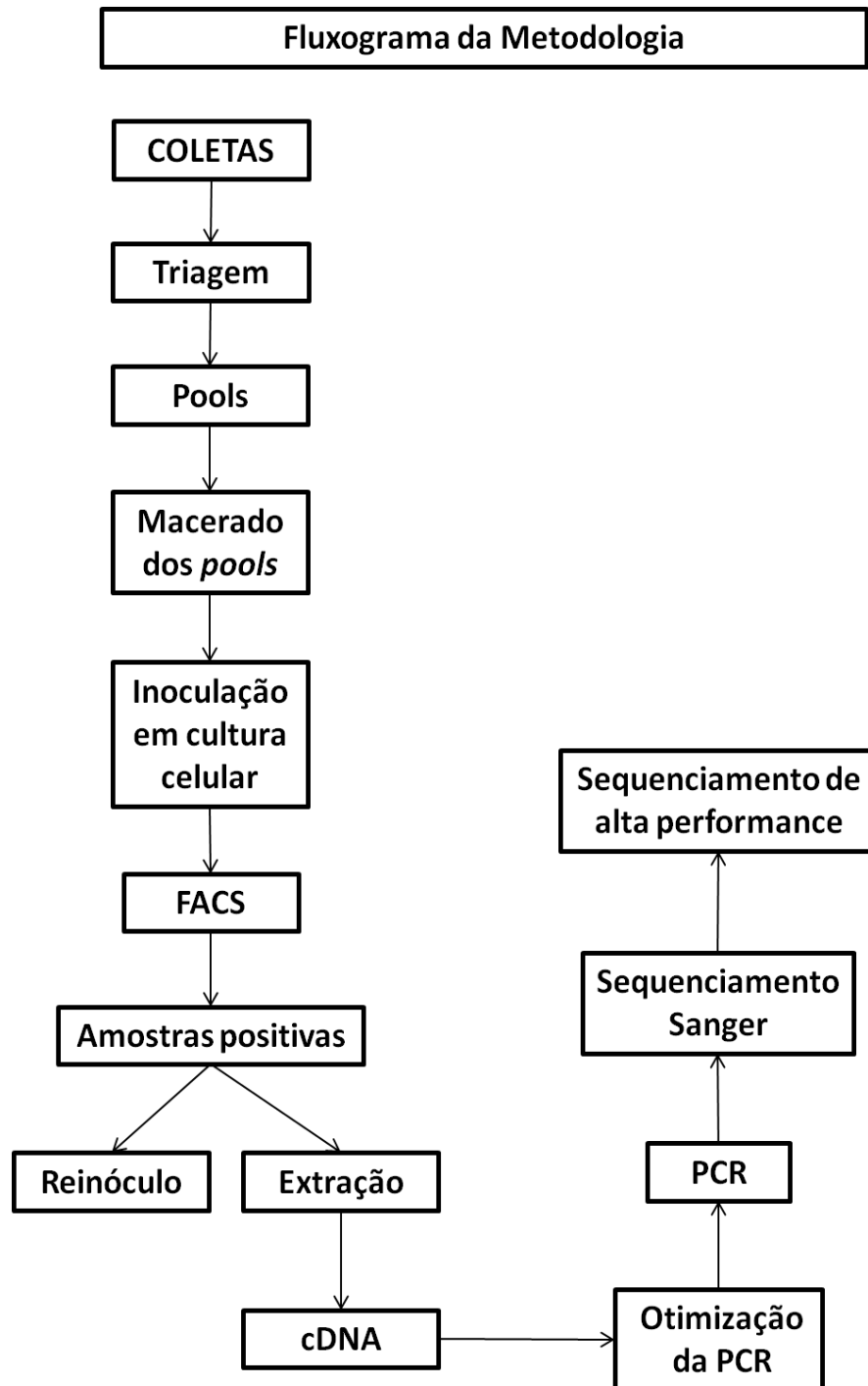


Figura 7: Localização dos pontos de coleta do Ramal Nova Esperança, onde foram realizadas 12 coletas.

As etapas da metodologia deste trabalho seguiram uma ordem de realização, que podem ser melhor compreendidas a partir do fluxograma abaixo.



4.2 Coleta dos Phlebotominae

Duas coletas entomológicas (identificadas como C1 e C2) foram realizadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke pela entrada localizada na R. Uirapuru, bairro Cidade de Deus, Manaus - AM, utilizando armadilhas de luz, do tipo CDC, colocadas às 16:00 horas e retiradas às 08:00 horas do dia seguinte, distribuídas aleatoriamente, com aproximadamente 20 metros de distância entre cada uma e altura média de 2 metros. Foram realizadas coletas paralelas na base das mesmas árvores no momento da retirada das armadilhas, utilizando aspiradores manuais. Os indivíduos coletados foram transferidos para gaiolas entomológicas (Figura 8), levados para o laboratório e mantidos vivos até a etapa de triagem.

Doze coletas (identificadas do C3 ao C14) foram realizadas no Ramal Nova Esperança, utilizando armadilhas de luz, adaptadas para base de árvore, tendo início às 9:00 e terminando às 11:00, horário de descida dos espécimes da copa das árvores. Foram escolhidas árvores de grande porte, com raízes tabulares, ou com o tronco mais largo, ambiente ideal para encontrar os espécimes.

Em todas as coletas, as gaiolas foram transportadas em baixa temperatura, diretamente para o laboratório.



Figura 8: Gaiolas entomológicas. Fonte pessoal

4.3 Processamento das amostras (TRIAGEM)

Os flebotomíneos capturados foram retirados das gaiolas entomológicas com auxílio de um capturador manual e adormecidos em refrigerador, sendo posteriormente colocados em placa de petri, sob banho de gelo para identificação dos espécimes seguido da organização dos *pools* (Figura 9).



Figura 9: Triagem do material sob banho de gelo. Fonte pessoal.

Os flebotomíneos foram identificados por gênero ou espécie. Para identificação foi utilizada a chave taxonômica de Galati (*in* Rangel & Lainson 2003) e Young & Duncan (1994). A identificação dos espécimes de *Nyssomyia umbratilis* foi feita utilizando microscópio estereoscópico, a partir de características morfológicas, uma vez que Pessoa e colaboradores, 2007 encontraram cerca de 80% da fauna coletada em bases de árvore composta pela espécie utilizada nesse trabalho. As demais espécies foram compostas por cerca de 15% de espécies do gênero *Psathyromyia*. *Lutzomyia rorotaensis* e outras espécies compuseram o restante. *N umbratilis* se distingue, no aspecto macroscópico, visto em microscópio estereoscópico, das outras espécies encontradas em base de árvore na Amazônia central, pelo seu

tamanho diminuto em comparação às outras espécies de flebotomíneos dendróbatas, coloração clara, palpômero 5 menor que a combinação dos palpômeros 3+4, que os distingue de *L. rorotaensis*, que também é uma espécie diminuta, mas de coloração geral do corpo escura e com o 5º palpômero muito longo. O escuto de *N. umbratilis* é mais pigmentado do que *N. anduzei*, que é mais claro, e por vezes também é coletado em base de árvore.

Os indivíduos foram agrupados em *pools* de machos, fêmeas ingurgitadas e fêmeas não ingurgitadas. Os *pools* foram separados e identificados por local e data de coleta, contendo 20 indivíduos cada, acondicionados em microtubos de 1,5ml, mantidos em freezer -80°C até a etapa de inoculação em cultura celular.

4.4 Preparação do inóculo- Isolamento viral

Foram utilizados frascos para cultivo celular estéreis de 25cm² para preparação e manutenção da monocamada celular, formada por células VERO (células de rim de macaco verde - *Cercopithecus aethiops*). A cada frasco foi adicionado o volume de 5ml de meio mínimo essencial (MEM - Gibco), enriquecido com 2% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) para manutenção e 10% para crescimento, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/ mL), fungizona (2,5 µg/ mL). Posteriormente, os frascos foram incubados a 37°C até a formação de uma monocamada celular semi-confluyente.

4.5 Inoculação das amostras

Para a inoculação, foram utilizadas placas de 24 poços, montadas previamente, nas mesmas condições da manutenção da cultura celular. Para

cada poço (1mL) foram utilizadas 80.000 células, contadas pelo MOXI Z (ORFLO), contador de células automático.

Para a maceração foi preparado o meio MEM Hank's, acrescido de 15% de soro fetal bovino (Gibco), para um volume de 800µl para cada *pool*. Os *pools* de flebotomíneos estavam organizados em microtubos de 1,5mL mantidos em -80°C até a etapa de maceração. Foram adicionados 200µl do meio com SFB em cada *pool*. A maceração foi realizada por esferas de aço inoxidável (*stainless steel beads*) de 5mm, no *TissueLyser LT Adapter- 12 tubes* (QIAGEN) por 5 min a 40 oscilações/min de agitação, colocando gelo no compartimento dos tubos, para manter a baixa temperatura. Após a maceração, foi acrescentado o volume complementar de meio de cultura (600 µl). Posteriormente, os tubos contendo o macerado foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos, a 4°C. Foram recolhidos 400µl do sobrenadante (puxando o ar primeiro), usando seringa de 1mL identificadas para seu respectivo *pool*. As seringas com o material de inoculação também foram mantidas em banho de gelo (Figura 10).



Figura 10: Material macerado sendo recolhido dos microtubos com auxílio de seringas.

O material de manutenção celular das placas foi retirado e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS 1X. O material das seringas foi filtrado, individualmente, diretamente no respectivo poço. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 680g, a 25°C, por 30 minutos (**Shell vial**). Em seguida, foram incubadas por 30 minutos, sendo homogeneizadas aos 15 minutos. Após a incubação, o material inoculado foi retirado e cada poço foi lavado com PBS 1X, seguido do acréscimo do meio de manutenção, contendo antibióticos e antimicóticos e enriquecido com 2% de SFB, como descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 37°C e observadas diariamente, até possível aparecimento de efeito citopático.

As amostras inoculadas que apresentaram modificação na morfologia celular (possível efeito citopático), ou que após 10 dias de inoculado não apresentaram alteração celular, tiveram o sobrenadante recolhido, com auxílio de uma pipeta. Foram separados aproximadamente 500µl desse sobrenadante e transferidos para um criotubo, contendo 10% de glicerol e armazenado em -80°C para um futuro reinóculo. O restante do material celular foi solto, utilizando raspador de célula (*scraper*), homogeneizado e dividido, uma parte para extração e a outra utilizada no procedimento de Citometria de fluxo.

4.6 Detecção de *Bunyavirus* por Citometria de Fluxo em cultura de células VERO infectadas

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada em laser biofísico empregada para obtenção de características físicas e químicas das células, além de ser utilizada na contagem e separação de células, na qual é avaliada a emissão de fluorescência celular (Bogh e Duling, 1993; Givan, 2004).

A citometria de fluxo foi realizada por imunofluorescência indireta com utilização de anticorpos monoclonais para detecção de *Bunyavirus* e anticorpos anti-IgG de camundongo marcados com o fluorocromo FITC (Becton–Dickinson, Califórnia). Amostras controles, sem a presença do inóculo foram utilizadas para caracterização da população celular.

Os procedimentos de fixação e marcação foram realizados com utilização de solução *Facs Cytotfix/Cytoperm* e *Facs Cytoperm/Cytowash* (Becton–Dickinson, Califórnia), respectivamente de acordo com Medina e colaboradores, 2012, e posteriormente realizada leitura em citômetro de fluxo. Para cada inóculo foi adquirido um número mínimo de 10.000 eventos, ou volume final para detecção e identificação de *Bunyavirus*, devido a diferença de quantidade de material na retirada das células da placa. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando o software Diva (v.6.1.1).

4.7 Detecção de arbovírus por técnicas moleculares

4.7.1 Extração de Ácido Ribonucléico viral (RNA viral)

O RNA viral foi extraído utilizando o kit comercial *QIAmp RNA viral Mini* (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante. Foram pipetados 560µL de Tampão AVL contendo RNA carreador em um microtubo de 2mL, em seguida, adicionado 140µL da amostra ao tubo anterior e misturado por vórtex 15s. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente (25°C) durante 10 min, seguidos de centrifugação para remover gotas da tampa. Foi adicionado 560µL de Etanol (96-100%) a amostra e misturado por vórtex 15s. Centrifugado brevemente para remover gotas da tampa. Foi transferido 630µL da solução do passo anterior para uma coluna do kit. A tampa do tubo foi fechada e

centrifugada a 6.000g (8.600 RPM) 1 min. A coluna foi colocada em um tubo coletor novo e o tubo utilizado com o filtrado foi descartado. A centrifugação foi repetida, desta vez com a tampa do tubo aberta. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, ao qual foi adicionado 500µL de tampão AW1, centrifugado a 6000g (8.600 RPM) durante 1 minuto. O líquido e o tubo coletor foram descartados. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor, seguida da adição de 500µL de tampão AW2 e centrifugada a 16.000g (14.000 RPM) durante 3 minutos. O líquido foi descartado. A coluna foi colocada no mesmo tubo coletor e centrifugada durante 1 minuto. O líquido e o tubo coletor foram descartados. Uma etapa de centrifugação com a tampa dos tubos aberta foi inserida para eliminar resquícios de etanol. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5ml, à qual foi pipetada 60µL do tampão AVE (temperatura ambiente), incubada a temperatura ambiente 1 minuto com a tampa fechada. Os tubos com as colunas foram centrifugados a 6000g (8.600 RPM) durante 1 minuto. O material extraído foi estocado a -80°C até a realização das etapas seguintes.

4.7.2 Produção de Ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

O ácido desoxirribonucleico complementar foi produzido a partir das amostras controle de CARV (antígeno inativado do vírus Caraparu) e CANDV (antígeno inativado do vírus Candiru). Foram preparados dois mixes: um contendo os iniciadores reversos BUNS para o segmento S dos Bunyavirus e NPHLEBO -1 para o segmento L dos Phlebovirus, no qual foram utilizados 1µl [10 pmol] do iniciador reverso para cada alvo mais 8µl da amostra viral, para um volume final de 20µl. E o segundo contendo vários alvos, como: CM3W - Alphavirus; Flav200- Flavivirus; BUNS e NPHLEBO -1, no qual foram utilizados 1µl [10 pmol] do iniciador reverso mais 8µl da amostra, para um volume final de

20µl. Foi realizado também a síntese do DNA complementar usando iniciadores randômicos para as mesmas amostras. A mistura do iniciador com a amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos, seguido de 2 minutos em banho de gelo. A síntese do cDNA foi realizada para um volume final de 20 µL, contendo 2µL de RNA viral, tampão 1X, 0,5mM de dNTP mix, 0,1M DTT, 40U de inibidor de RNase (Promega) e 200U da enzima transcriptase reversa (*Superscript III Reverse Transcriptase*; Invitrogen). A RT foi processada no termociclador segundo o programa composto por 5 minutos a 50°C, 55°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. Esse material foi utilizado para otimização das PCRs.

4.7.3 Otimização das PCRs

Para a etapa de otimização da PCR, foram utilizadas duas amostras de antígeno inativado dos vírus Candiru (cepa 22511) e Caraparu (cepa BeAn 3994), cedidas pela pesquisadora da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Dra. Michele de Sousa Bastos.

Foram realizadas reações em cadeia da polimerase na tentativa de amplificar os segmentos S e L para padronizar a reação de PCR (Tabela 1). As PCRs foram realizadas para um volume final de 25µl, composta por 0,5 µL do cDNA e 24,5 µL do mix de PCR com as seguintes concentrações: tampão 1X , $MgCl_2$ a 1,5 mM, 0,4 µM de cada iniciador, 0,2uM de dNTPs (Invitrogen), 1U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). As PCRs com os iniciadores BUNS e BUNC foram realizadas de acordo com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos [94°C por 30 segundos; 58°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto]₂₀, [94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto]₂₀, 72°C por 10 minutos, de acordo com Dunn et al, 1994; Moreli et al, 2001; Weidmann et

al, 2003, com adaptações. As PCRs com os iniciadores NPHLEBO +1 e NPHLEBO -1 foram realizadas de acordo com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos [94°C por 30 segundos; 55°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto]₄₅, 72°C por 10 minutos, segundo Sánchez- Seco et al, 2003.

Tabela 1: Inciadores utilizados na otimização das PCRs.

Nome do Primer	Sequência 5' - 3'	Alvo	Fragmento pb	Gênero	
NPHLEBO 1-	ARTTRCTNGWNAGCYTTNARNGTNGC	Segmento L	528	Phlebovirus	
NPHLEBO 1+	ATGGARGGNTTTGTNWSNCNNCC				
NPHLEBO 2-	TCYTCYTRTTYTRARRTARCC	Segmento L	222		
NPHLEBO 2+	WTNCCNAANCCNYMSAARATG				
TR_Phlebo_S	CACCTCCACCAGCRAAGCCT	Segmento S	93		
TR_Phlebo_AS	TTYAGATTGGGGAACCTTG				
N_Phleb_F	TTTGCTTATCARGGNTTTGATGC	Segmento S	370		
N_Phleb_R	GCAAAGCTDGGRTGCATCA				
Bun-C	AGTAGTATACTCCAC	Segmento S	654 - 900		Orthobunyavirus
Bun-S	AGTAGTGTGGCTCCAC				
Ortho_Simbu_F	TTCTTCCTCAAYCARAMGAAGG	Segmento S	405	Orthobunyavirus	
Ortho_Simbu_R	CATRAARTTNACRTCCAT				
TR_BUNW_S	GGATCACTTGGGAATGATGGAG	Segmento S	93	Bunyamwera	
TR_BUNW_AS	TTGCTAAGGGGTAGAATCTG				
TR_BUN2_S	CGGAGTGGAAATGTACCTGG	Segmento S	86	Outros Orthobunya	
TR_BUN2_AS	ACATACCAATCGTCAAAGGG				

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado previamente com gel-Red®. Em seguida, foram retirados do gel e purificados usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, catálogo: [A9281](#)), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7.4 Reação de Sequenciamento(Sanger)

Para as reações de sequenciamento foram utilizados os mesmos iniciadores utilizados na PCR, sendo utilizados em reações individualizadas, utilizando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, catálogo: [4337455](#)). Para o sequenciamento foram utilizados

aproximadamente de 5-20 ng de DNA das amostras controle. O volume final da reação foi de 10µl (Tabela 2).

Tabela 2: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento

Reagente	Volume na reação
BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems)	0.3 µL
Tampão para BigDye 5x	2 µL
Iniciador a 3,3 µM (Senso ou Anti-senso)	1 µL

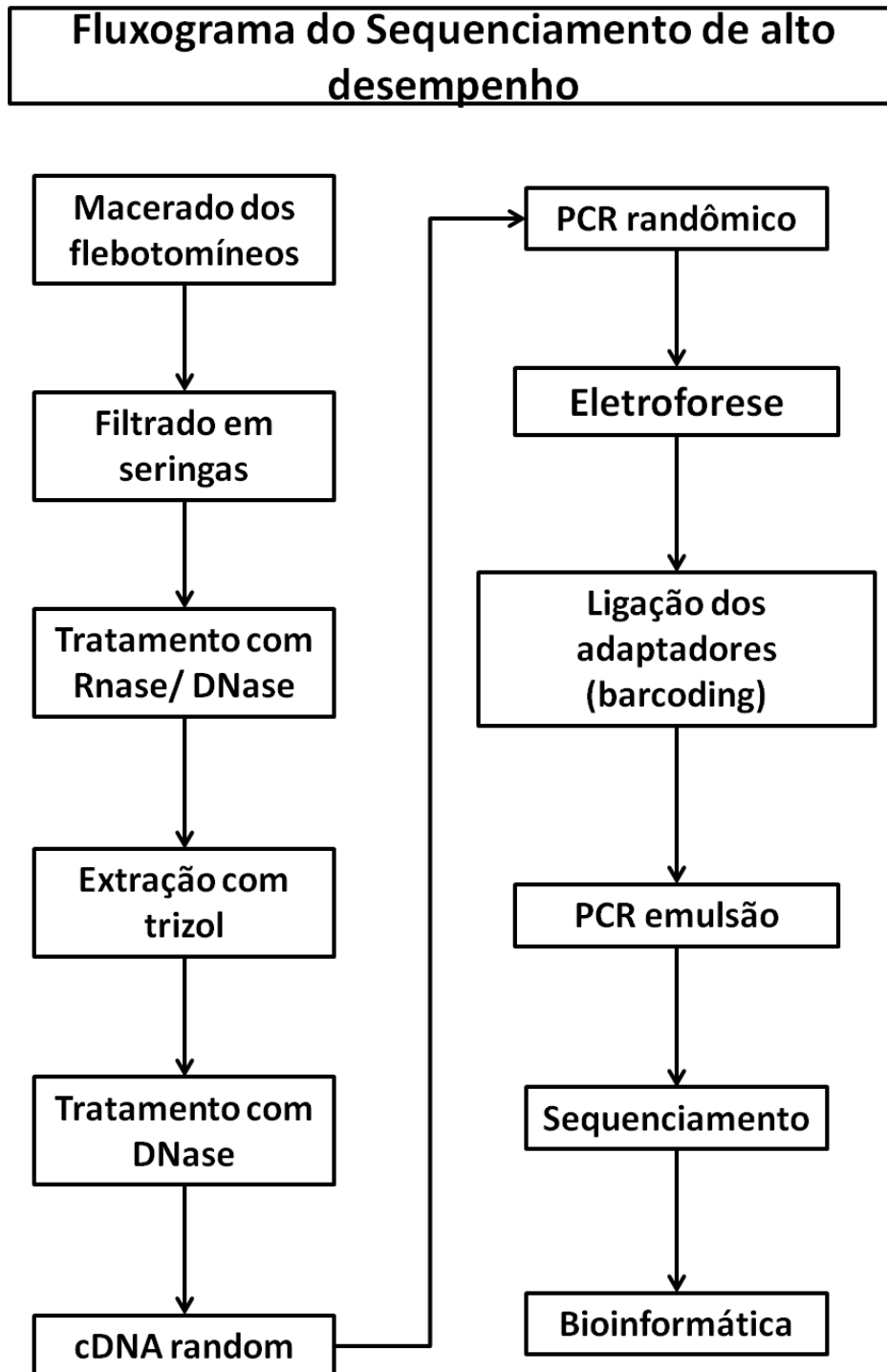
Após término da reação de sequenciamento foram realizadas as etapas de purificação dos produtos, seguindo o protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio (*Applied Biosystems*) recomendado pelo fabricante.

4.7.5 Análise de sequência

As sequências nucleotídicas foram inicialmente analisadas pelo software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, v5.3.1), posteriormente a montagem dos *contigs* foi realizada com a utilização do software Geneious (Biomatters, v6.0.5). As sequências alinhadas foram submetidas para pesquisa de nucleotídeos nos bancos de dados do GenBank+DDBJ+EMBL, com utilização da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) e o algoritmo Megablast.

4.8 Sequenciamento de alto desempenho (Ion Torrent) e análises

A etapa de sequenciamento de alta performance foi realizada de acordo com o fluxograma abaixo, a partir do macerado dos flebotômíneos das amostras que foram positivas na citometria de fluxo.



4.8.1 Tratamento da amostra para extração de RNA

Aproximadamente 200 μL do sobrenadante da cultura celular foi diluído com 600 μL de água ultra-pura, posteriormente sendo filtrado através de filtro 0,45- μm (Figura 11), seguida de centrifugação a 22.000 g por duas horas a 8°C. O precipitado foi dissolvido em 200 μL de água ultrapura suplementado com 2% soro humano, sendo posteriormente submetido para tratamento com nucleases. Foram adicionados às amostras 5 μL de tampão Turbo (10X), 14 μL (14 U) de DNase RQ1(Promega) e 0,5 μL de RNase (1mg/mL)(Ambion), homogeneizado e incubado a 37°C por 2 horas para remoção de ácido nucleico provenientes de células eucarióticas (Victoria et al, 2008).

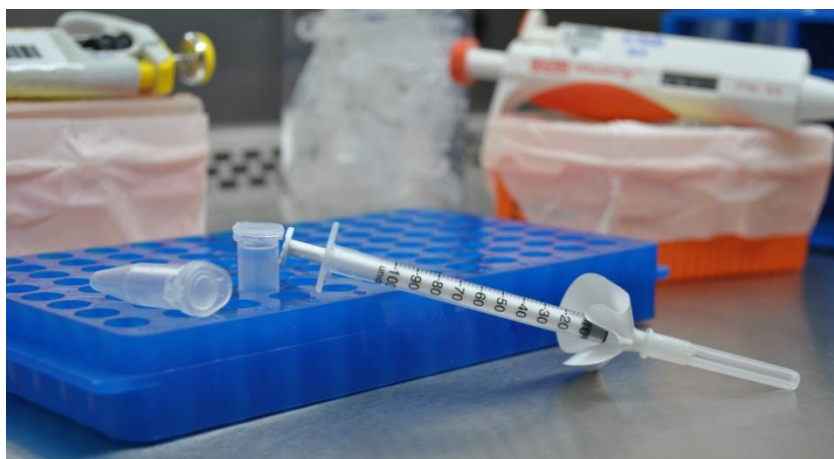


Figura 11: Imagem da seringa com o filtro de 0,45- μm .

4.8.2 Extração do RNA viral

Após tratamento das amostras, foram adicionados 200 μL de solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,4) para posterior realização da extração de RNA através do método do reagente Trizol[®] LS (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, a partir dos flebotomíneos macerados. A cada amostra foram adicionados 50 μl de água livre de nuclease, homogeneizado por inversão, em seguida foram adicionados 300 μl de Trizol, seguido de incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, e posterior

adição de 80 µl de Clorofórmio, homogeneizado por inversão 30 vezes. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 10min, seguido de uma etapa de centrifugação a 12.000 x g (10.850 rpm) por 15 minutos à 4°C. A fase límpida ou aquosa foi coletada, contendo o RNA e transferido para um novo tubo. Foram adicionados 200µl de isopropanol (absoluto) gelado ao material coletado, em seguida, homogeneizado por inversão 30 vezes e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugado a 12.000 x g (10.850 rpm) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente com auxílio de pipeta. Foram adicionados 400µL de etanol 75 % (gelado) diluído em água livre de nucleases. O pellet foi solto cuidadosamente e centrifugado a 7500 x g (8.600 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com pipeta para remover todo resíduo de etanol. Os tubos ficaram em temperatura ambiente por 15 minutos para secar. O material foi ressuscitado em 30 µl de água livre de nucleases e adicionada de 40 U de inibidor de RNase e incubado a 56°C por 10 min. Após a extração, o material extraído foi submetido ao novo tratamento com DNase: ao qual foi adicionado ao RNA extraído (~ 50uL) 2uL (2 U) de DNase RQ1 (Promega) e 3uL de tampão Turbo (10x) (Promega), homogeneizado suavemente e incubado a 37°C por 90 minutos e adicionado 5uL de inibidor de DNase e homogeneizado. Incubado a 65°C por 10 minutos. As amostras tratadas foram utilizadas em seguida na etapa de RT-PCR.

4.8.3 Quantificação do RNA extraído

O RNA viral extraído foi quantificado em espectrofotômetro de microvolume, em comprimentos de onda de 260 a 280 nm, sendo gerada a quantificação em ng/µL e determinação da pureza através da absorbância

260/280 nm com razão ideal igual ou aproximado a 2. O material extraído foi imediatamente utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA).

4.8.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida da síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA para o sequenciamento de Nova Geração foi realizada através da reação de transcrição reversa com utilização da *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Applied Biosystems)* de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador com extremidade 3' aleatória (5'GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNNNNNNNNNNNN-3'), segundo Allander et al, 2005; Djikeng et al, 2008; Victoria et al, 2009, com modificações. Foram utilizados 2µl do iniciador (10µM) mais 8µl da amostra. A mistura do iniciador com a amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos, seguido de 2 minutos em banho de gelo. Posteriormente foram adicionados os demais reagentes da reação para um volume final de 50 µl (Tabela 3).

Tabela 3: Reagentes utilizados para síntese de cDNA com utilização da SuperScript III One-Step with Platinum Taq HF

Reagente	Volume na reação
2X Reaction Mix	25 µL
Platinum Taq HIFI Mix	1 µL
H ₂ O qsp	-

A PCR foi realizada com utilização da *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)* de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 5 µL da primeira PCR para volume de 50 µL contendo iniciador específico 5'GCCGGAGCTCTGCAGATATC-3' (Tabela 4).

Tabela 4: Volume e concentração final de reagentes utilizados para a amplificação com utilização da Taq Platinum HIFI Mix

Reagente	Volume na Reação	Concentração Final
10x HIFI Buffer	5 µL	1X

MgSO (50 mM)	2 µL	2 mM
dNTP Mix (10 mM)	1 µL	0,2 µM
Iniciador (10 µM)	4 µL	0,8 µM
Taq HIFI (5 U/µL)	0,2 µL	1 Unidade
CDNA	5 µL	
Total	50 µL	

4.8.5 Preparo da biblioteca, template e sequenciamento de nova geração

As amostras que apresentaram alguma alteração na inoculação, acreditando ser um possível efeito citopático, foram organizadas e agrupadas de acordo com o local da coleta e sexo dos espécimes no *pool* (Tabela 5) a fim de otimizar gastos com reagentes e tentar aumentar a eficiência na detecção do material genético viral. Essas amostras foram selecionadas para o estudo metagenômico.

Tabela 5: Identificação das amostras utilizadas no sequenciamento de Nova Geração.

Metagenômica	Identif. PCR	cDNA (agrupados)	Coleta	Número pool	Sexo	Extração (separados)	Local Coleta
I	pMET 1	cMET 1	C10	4	M	C10 4M	Ramal Nova Esperança
			C11	20	M	C11 20M	
	pMET 2	cMET 2	C11	30	M	C11 30M	
			C13	12	M	C13 12M	
II	pMET 3	cMET 3	C12	3	F	C12 3F	
			C12	4	F	C12 4F	
	pMET 4	cMET 4	C14	3	F	C14 3F	
			C14	4	F	C14 4F	
III	pMET 5	cMET 5	C11	10	FING	C11 10 Fing	
IV	pMET 6	cMET 6	C1	1	F	C1 1F	
			C2	9	F	C2 9F	
	pMET 7	cMET 7	C2	11	F	C2 11F	
			C2	12	F	C2 12F	
V	pMET 8	cMET 8	C1	5	M	C1 5M	
VI	pMET 9	cMET 9	C12	3	F	C12 3F	Amostras de cultura
			C12	4	F	C12 4F	
	pMET 10	cMET 10	C14	3	F	C14 3F	
			C14	4	F	C14 4F	
VII	BR MET 1	BR MET 1	Branco 1			BR 1	
	BR MET 2	BR MET 2	Branco 2			BR 2	
VIII	MAYV	MAYV	MAYV			MAYV	

O preparo das amostras foi configurado segundo Coffey e colaboradores 2013, com alterações quanto a tecnologia de sequenciamento utilizada, assim como o uso de enzimas semelhantes no preparo da segunda fita de cDNA. De posse das amostras agrupadas (Tabela acima), as mesmas foram processadas para a eliminação de restos celulares e maioria das partículas microbiológicas maiores, ambos em dois processos, uma centrifugação a 12k por 5 min e uma filtragem em poros de 0,45um. Após essa remoção, o produto sofreu uma digestão enzimática para degradação de DNAs e RNAs não encapsulados por 12h, seguidos de uma extração de RNA por Trizol (conforme recomendações do fabricante) para obter o material genético de amostras virais encapsuladas.

Após o RNA viral ser extraído, o mesmo foi processado para produzir a primeira fita de DNA complementar (cDNA) com uso de SSIII e iniciadores randômicos (nucleotídios conhecidos e específicos na porção 5' e calda de 15 N's na porção 3'). Estes últimos foram utilizados para gerar qualquer primeira fita de cDNA sem a necessidade de conhecimento do material genético em estudo. A segunda fita de cDNA foi elaborada com a utilização da enzima *Klenow large fragment* com uma segunda adição de iniciador randômico no mesmo microtubo do 1cDNA. Posteriormente, o 2 cDNA foi purificado e por fim amplificado numa reação de PCR com uso de iniciadores idênticos a parte específica dos iniciadores randômicos, seguidos de uma nova purificação para eliminação de restos de material usado numa PCR.

O produto da PCR, chamado de pré biblioteca, foi utilizado no preparo da biblioteca do ION - PGM (*Ion Torrent Personal Genome Machine*) propriamente dita, com adição dos adaptadores A e P1, seleção do tamanho a ser sequenciado de acordo com a química de sequenciamento de 200bp, e por fim amplificado e purificado.

Considerando os fragmentos amplificados e purificados, foram fracionados e ligados adaptadores (barcodes) únicos por amostra e selecionados fragmentos de 330 pares de bases de bases (devido a adição dos adaptadores).

O sequenciamento nucleotídico foi realizado, com a utilização da biblioteca pronta, em duas etapas: amplificação clonal mais enriquecimento e sequenciamento. A primeira foi feita para amplificar a biblioteca em esferas utilizadas nesta tecnologia de sequenciamento. E a segunda utilizou essas

esferas enriquecidas prontas para o sequenciamento por “síntese”, onde base a base, a detecção do sinal elétrico emitido pela variação de pH foi detectada por semicondutores.

Para cada amostra, análises de qualidade foram realizadas para remoção de sequências muito curtas, sendo processadas com software Geneious 7.0, usando seus algoritmos de alinhamento para buscar por *contigs*, finalizando com a remoção de quimeras para definição da identidade da sequência.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação dos flebotomíneos

Foram coletadas 4900 espécimes de *Nyssomyia umbratilis*, agrupados em 243 pools, sendo 12 da Reserva Florestal Adolpho Ducke e 231 do Ramal Nova Esperança- Manacapuru (Tabela 6).

Tabela 6: Pools dos flebotomíneos coletados. As Siglas de C1 a C14 representam o número da coleta. Sendo as colunas C1 e C2 da Reserva Florestal Adolpho Ducke e as demais do Ramal Nova Esperança.

Coletas entomológicas													
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
1 F	8M	1M	1F	1F	1F	1F	1F	1F	1F	1F	1F	1F	1F
2 M	9F	2M	2F	2F	2FING	2F	2F	2F	2FING	2F	2F	2F	2F
3 M	10M	3M		3FING	3M	3F	3F	3F	3M	3F	3F	3F	3F
4 M	11F	4M		4M	4M	4F	4F	4F	4M	4F	4F	4F	4F
5 M	12F	5M		5M	5M	5F	5F	5F	5M	5F	5F	5F	5F
6 M		6M		6M	6M	6F	6F	6F		6F	6FING	6F	6F
7 M		7M		7M		7F	7FING	7F		7FING	7FING	7F	7F
		8M		8M		8FING	8FING	8F		8FING	8M	8F	8F
		1F				9M	9M	9F		9FING	9M	9F	9FING
		2F				10M	10M	10F		10FING	10M	10FING	10FING
		3F				11M	11M	11F		11FING	11M	11FING	11M
		4F				12M	12M	12F		12M	12M	12M	12M
		5FING				13M	13M	13F		13M	13M	13M	13M
		6FING				14M	14M	14F		14M	14M	14M	14M
		7FING				15M	15M	15FING		15M	15M	15M	15M
		8FING				16M	16M	16FING		16M	16M	16M	16M
		9FING				17M		17FING		17M	17M	17M	17M
		10FING				18M		18FING		18M	18M	18M	18M
		11FING				19M		19FING		19M	19M	19M	19M
		12FING				20M		20FING		20M		20M	20M
		13FING				21M		21M		21M		21M	21M
		14FING				22M		22M		22M		22M	22M
		15FING						23M		23M		23M	23M
		16FING						24M		24M			24M
		17M						25M		25M			
		18M						26M		26M			
		19M						27M		27M			
		20M						28M		28M			
		21M						29M		29M			
		22M						30M		30M			
		23M						31M					
		24M						32M					
		25M						33M					
		26M						34M					
		27M						35M					
		28M						36M					
		29M						37M					
		30M						38M					

5.2 Isolamento em cultura celular

Dos 243 *pools* coletados e inoculados em culturas de células VERO, um total de 69 foram retirados com 5-6 dpi, pois a monocamada celular apresentava uma diferença morfológica, aparentando ser um efeito citopático.

5.3 Detecção de *Bunyavirus* em cultura de células VERO infectadas através da Citometria de Fluxo

O ensaio de imunofluorescência indireta foi realizado para detecção de *Bunyavirus* em *pools* de flebotomíneos inoculados em células VERO e analisados através da citometria de fluxo. Dos 243 *pools* que foram inoculados em placas de 24 poços com aproximadamente 90% de confluência celular, correspondendo a aproximadamente 80.000 células, 205 *pools* foram submetidos à citometria de fluxo.

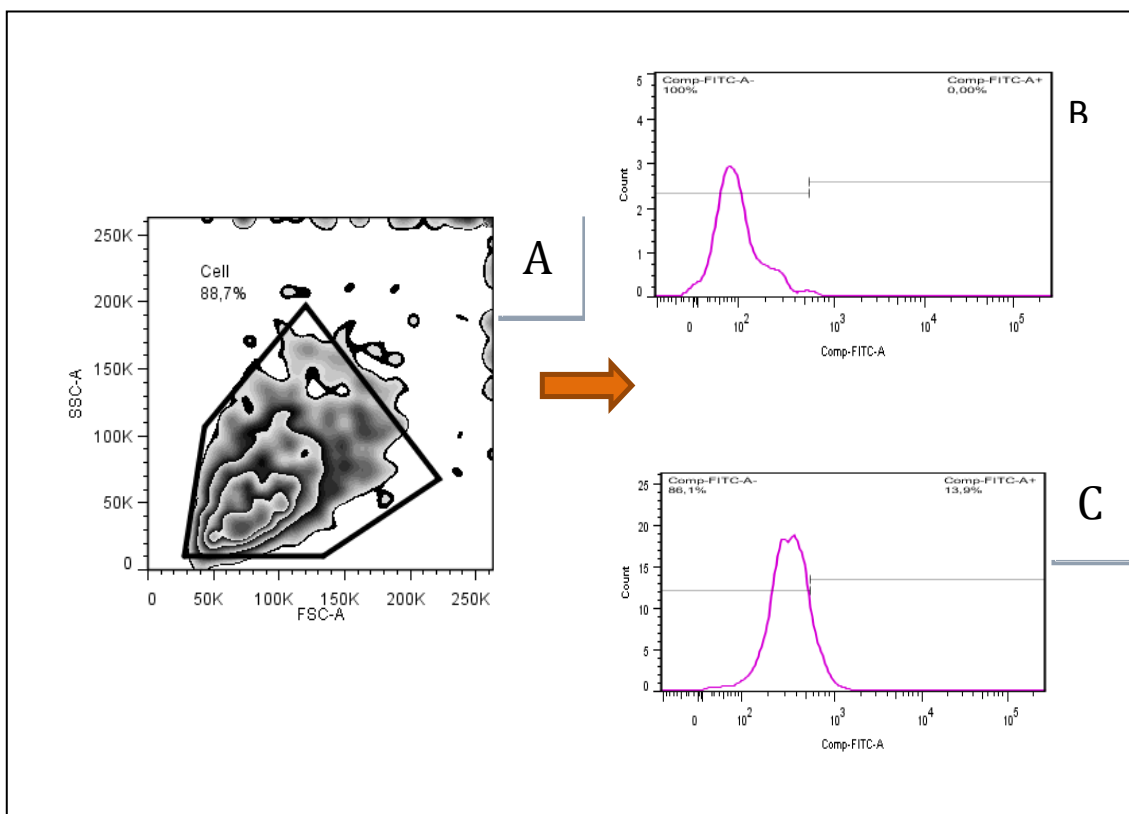


Figura 12.: Análises de Células VERO infectadas com Bunyavirus por citometria de fluxo. (A) Determinação do tamanho e complexidade das células VERO. (B) Média de intensidade de Fluorescência de células VERO não infectadas como controle negativo do ensaio. (C) Média de intensidade de Fluorescência de células VERO infectadas com Bunyavirus

As células VERO foram caracterizadas através da triagem inicial quanto ao tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) (Figura 12- A). Posteriormente, as populações celulares foram identificadas e delimitadas. Em seguida, passaram por análise das emissões de fluorescência pelo conjugado anticorpo-fluoróforo-FITC (Figura 12).

Os resultados da citometria de fluxo foram analisados com base nos parâmetros morfométricos determinados com auxílio do software FlowJo[®] versão 7.6.5. As médias de intensidade de fluorescência (MFI) dos anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com FITC foram analisadas com objetivo de determinar a positividade das amostras. O deslocamento de células positivas, detectado pela citometria de fluxo, alcançou variações entre 1,19 – 71,6 % de células positivas infectadas (Tabela 7). Embora a quantidade mínima de deslocamento de células tenha sido observada na amostra C6-4M com 1,19% das células, a mesma amostra apresentou uma MFI significativa de 22,8 quando comparado ao controle negativo do ensaio (Tabela 7; Figura 12).

Tabela 7: Médias de deslocamento de células positivas e intensidade de fluorescência detectadas através da Citometria de Fluxo

Amostras	Deslocamento de células (%)	MFI
C3-5F	4,25	23,8
C3-20M	3,86	20,5
C5-6M	4,9	23,2
C6-4M	1,19	22,8
C9-8F	2,81	20,5
C9-33M	11,7	37,6
C10-4M	10,1	38,8
C11-10Fing	28,4	64,5
C11-20M	57	130
C11-30M	46,5	90,8
C12-3F	62,5	684
C12-4F	36,2	641
C12-12M	21,1	411
C13-6F	12,9	252
C13-12M	71,6	577
C14-3F	64,3	133
C14-4F	71	209

MFI - Média de Intensidade de Fluorescência

As MFI das amostras positivas para infecção por *Bunyavirus* (Tabela 7) apresentaram intensidade de fluorescência igual ou superior a 2 vezes mais intensidade quando comparadas aos controles negativos (CN) do ensaio (Figura 13). Deste modo, as amostras C12-3F e C12-4F apresentaram elevadas MFI com MFI = 684 e 641 (Figura 13D), similarmente observadas com as amostras C13-6M, C13-12M, C14-3F e C14-14F (Figura 13A, 13E e 13F). As amostras C3-5F, C3-20M, C5-6M, C6-4M, C9-8F e C9-33M apresentaram similares níveis de MFI entre as amostras (amostras essas conduzidas em único ensaio) (Figura 13B). Entretanto C10-4M, C11-10Fin, C11-20M e C11-30M, amostras de um mesmo ensaio, apresentaram diferentes MFI, sugerindo assim, que os diferentes percentuais de células fluorescentes (deslocamento de células) podem representar a quantidade de vírus presente na amostra.

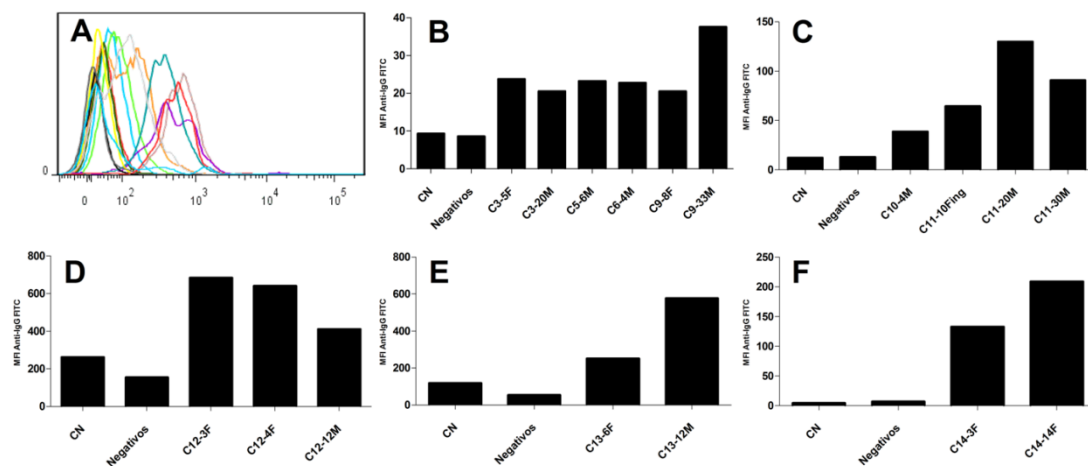


Figura 13: Médias de Intensidade de Fluorescência (MFI) em Células VERO infectadas com *Bunyavirus* analisadas pelo software FlowJo®. (A) Histograma de médias de intensidade de fluorescência (MFI) em amostras positivas para *Bunyavirus* comparadas ao controle negativo (linha preta). (B – F) MFI em amostras positivas comparadas aos respectivos controles negativos (CN); (Negativos)- média de MFI entre as amostras negativas.

5.3 Detecção de arbovírus por técnicas moleculares

Como resultado das otimizações das PCRs utilizando as amostras de antígeno inativado do CARV e CANDV, com iniciadores para o segmento S e L dos *Bunyaviridae*, no qual pode-se observar nas colunas 1 e 8 peso molecular de 100pb, 2 e 3 amostras CANDV e CARV com o cDNA realizado com o mix de 4 iniciadores (Alpha, Flavi, Bun e NPhlebo), respectivamente; 4- amostra controle de OROV; 5 e 6 amostras de CANDV e CARV com o cDNA realizado com os iniciadores BUN e NPhlebo, respectivamente; 7- branco da PCR. Nas colunas 2, 3 e 6 apresentaram fragmento amplificado na altura esperada, aproximadamente 700 pb (Figura 14).

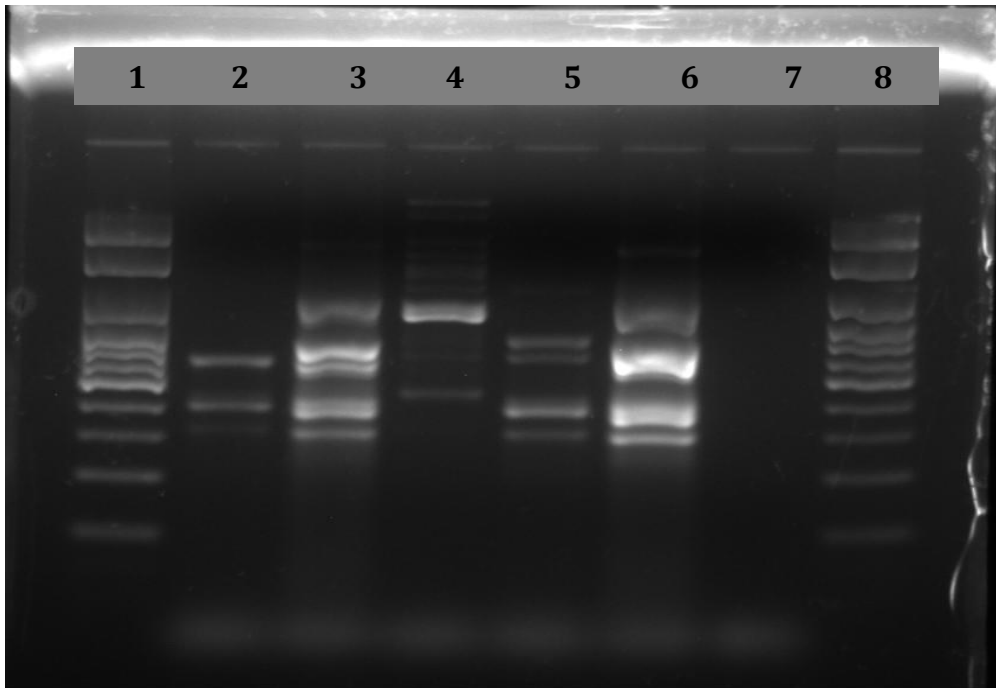


Figura 14: Gel da otimização das PCRs, das amostras CARV e CANDV. 1- PM; 2- CANDV; 3- CARV; 4- OROV; 5- CANDV; 6- CARV; 7- BR; 8- PM.

Posteriormente foram realizadas PCRs das amostras, cujos cDNA foram sintetizados com iniciadores randômicos, de acordo com trabalhos anteriores realizados, a qual foram aplicadas as amostras de CANDV e CARV. Neste gel, as amostras foram aplicadas da seguinte maneira: nas colunas 1 e 14 peso molecular de 100 pb; 2 e 3 amostras CANDV e CARV (iniciadores NPhlebo 1+ e 1-), respectivamente; 5 e 6 CANDV e CARV (iniciadores NPhlebo F e R), respectivamente; 8 e 9 CANDV e CARV (iniciadores BUN S e BUN C), respectivamente; 11 e 12 CANDV e CARV (iniciadores Ortho- Simbu F e R), respectivamente; 13- branco da PCR. Contudo, somente as amostras que foram utilizadas os iniciadores BUN S e C apresentaram amplificação na altura esperada, de aproximadamente 700 pb. A amostra da coluna 12 também apresentou amplificação, porém com altura inferior ao esperado (Figura 15).

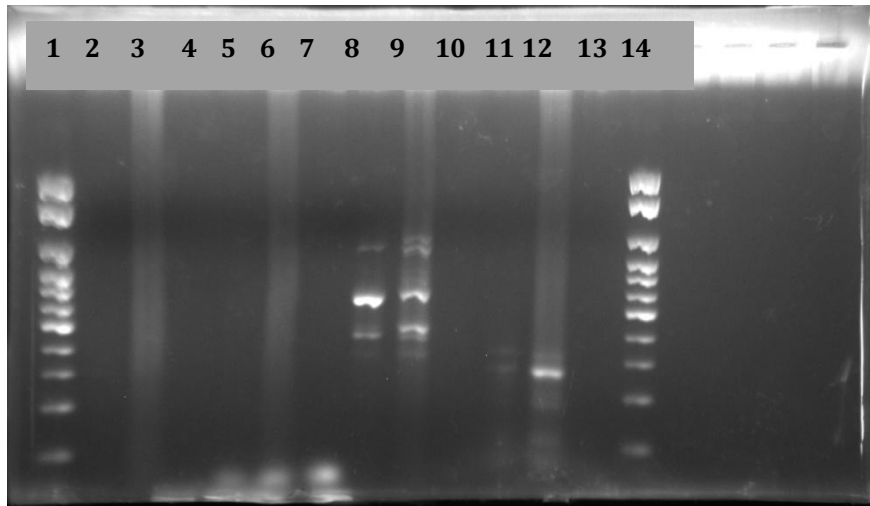


Figura 15: Otimização da PCR, utilizando cDNA com random primers

5.4 Caracterização de arbovírus por sequenciamento nucleotídico

Não obtivemos nenhuma amostra positiva para arbovírus pelo sequenciamento nucleotídico.

5.5 Sequenciamento de alto desempenho (Ion Torrent)

Não obtivemos nenhuma amostra positiva para *Bunyavirus* pelo sequenciamento de alto desempenho.

6. DISCUSSÃO

Estudos como os de Feitosa 2006 em áreas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, e Silva 2007 no Ramal Nova Esperança, Manacapuru; evidenciaram uma fauna flebotomínica diversificada e abundante, sendo os da espécie *Nyssomia umbratilis* os mais prevalentes.

Castellón e colaboradores (2000) sugerem que a urbanização dos flebotomíneos vem ocorrendo devido ao fluxo e a expansão existente da cidade e do ambiente rural, favorecendo a permanência das espécies de flebotomíneos que melhor se adaptaram às modificações ambientais.

A citometria de fluxo tem possibilitado um grande avanço para a virologia humana, sendo utilizada para estudos de interação vírus-célula e detecção de partícula viral (Wattre, 1993; Brussaard et al., 2003; Sivaraman et al., 2012). As metodologias desenvolvidas pela citometria apresentam maior sensibilidade e precisão quando comparadas a outros ensaios, como: cultura de células (Veal et al., 2000), detecção do vírus Dengue em cultura de células (Kao et al., 2001; Medina et al, 2012), na qual apresenta maior sensibilidade quando comparada a imunofluorescência convencional. De acordo com Kao et al, 2001, cultura de células C6/36 inoculadas com o vírus Dengue com multiplicidade de infecção de 0,01 foram detectadas pela citometria de fluxo 16 horas após a inoculação, enquanto pela imunofluorescência convencional foram detectadas somente após 26 horas de inoculação. O nível de sensibilidade das metodologias empregadas pela citometria de fluxo e ensaios de RT- Nested-PCR podem ser similares (Kao et al, 2001). Outra vantagem em utilizar a técnica, consiste na precisão na coleta do percentual de células infectadas por vírus de forma objetiva e com alto rendimento devido ao sistema de detecção empregado,

enquanto resultados da microscopia de fluorescência são avaliados e interpretados de forma qualitativa e subjetiva (Sivaraman et al., 2012).

Em ensaios de imunofluorescência direta para detecção de *Flavivirus* em células de mosquitos C6/36, amostras com títulos inferiores a 1×10^4 partículas/mL não têm sido detectadas, considerando como limite de detecção pela citometria de fluxo (Lambeth et al., 2005). Amostras positivas apresentaram deslocamento de células de 0,2 a 25%, correspondendo às células infectadas pelo vírus (Lambeth et al., 2005). Assim como, em estudos anteriores (Kao et al., 2001; Sivaraman et al., 2013), foi possível detectar amostras positivas para infecção viral a partir de 1% de células infectadas. Nos resultados do presente estudo, 17 *pools* apresentaram resultado positivo para *Bunyavirus*, apresentando uma média de deslocamento de células de 1,19 - 71,6 (Tabela 7).

Estudo anteriormente realizado apresentou similaridade quanto ao deslocamento de células infectadas por vírus entre diferentes diluições das amostras virais inoculadas (Marie et al., 1999). Portanto, as amostras do presente estudo que apresentaram baixo percentual de deslocamento células positivas, como C6-4M (1,19%), C9-8F (2,81%), C3-20M (3,86%) apresentaram MFI significativos quando comparados aos controles negativos do respectivo ensaio, sugerindo assim, a presença de diferentes títulos virais nas presentes amostras.

A correlação linear entre células infectadas e níveis de intensidade de fluorescência foram observadas (Sivaraman et al., 2013), assim como no presente estudo, no qual a amostra C11-20M comparada às amostras C10-4M, C11-10Fing e C11-30M (Tabela 7 ; Figura 13C), uma maior média de

intensidade de fluorescência (MFI) está correlacionada a um maior número de deslocamento de células positivas.

Para a detecção de *Bunyavirus* a citometria de fluxo tem sido utilizada através do ensaio de imunofluorescência indireta com utilização do anticorpo policlonal anti-Rift valley vírus a partir de amostras já confirmadas (Harmon et al., 2012). No presente estudo, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-Bunya, recomendado para detecção de diferentes membros pertencentes aos *Bunyavirus*, apresentando uma maior especificidade de detecção do grupo pesquisado.

Os vírus pertencentes à família *Bunyaviridae* são caracterizados por apresentar uma grande variedade nucleotídica em seu segmento S quanto ao número de variações nucleotídicas existentes entre os vírus. Com base nos sequenciamentos nucleotídicos realizados entre os diferentes *Bunyavirus*, os segmentos S, M e L apresentam similaridades contendo sequências complementares nas extremidades 3' e 5' não traduzidas, como CUUUGUGU-3' and 5'-ACACAAAG (Yu et al., 2011; Li et al., 2011; Swei et al., 2013). Contudo, diferentes estudos moleculares têm sido realizados com utilização dos iniciadores BUN para ensaios de RT-PCR, sendo testados sobre 21 membros do gênero *Bunyavirus*. Entre os membros foram observados diferentes tamanhos de produtos com 700 – 1.1000 nucleotídeos amplificados na RT-PCR (Dunn et al., 1994; Moreli et al., 2002). Entre os diferentes membros da família *Bunyaviridae*, foram observadas amplificação do segmento S entre vírus pertencentes a diferentes sorocomplexos, como grupo Bunyamwera, Simbu e California (Dunn et al., 1994). No presente estudo as condições e ciclagens dos ensaios de RT-PCR foram inicialmente realizados

conforme descrito anteriormente (Dunn et al., 1994; Moreli et al., 2001; Weidmann et al., 2003), contudo foram observados produtos amplificados de aproximadamente 700 pares de bases (pb) entre vírus pertencentes aos grupos Simbu (vírus Caraparu) e ao Phlebovirus (vírus Candiru), assim como foram observados amplificação de fragmento de aproximadamente 1.000 pb para vírus Oropouche.

Apesar da amplificação das amostras controles (CARV e CANDV) utilizando os iniciadores BUN C e BUN S, um dos mais utilizados para detecção de arbovírus da família *Bunyaviridae*, o sequenciamento nucleotídico revelou um resultado diferente do esperado, pois as sequências obtidas corresponderam à sequências com alta similaridade de genes de *Mus musculus* e *Homo sapiens*. Forshey, 2014 questiona o fato da maioria (>90%) das sequências genômicas disponíveis no GenBank serem oriundas de um único trabalho publicado por Nunes et al em 2005. Nesse trabalho, Forshey e colaboradores em 2014, atentaram para uma possível necessidade de validação dos resultados obtidos por Nunes e colaboradores (2005) através do sequenciamento nucleotídico utilizando os iniciadores BUN-C e BUN-S, uma vez que inúmeras reações e condições foram realizadas na tentativa de amplificação do segmento S de *Orthobunyavirus* sem sucesso. A possibilidade dos iniciadores BUN não apresentarem especificidade para os respectivos vírus torna-se ainda mais forte quando há a ausência de estudos realizados utilizando a mesma metodologia, além de divergências com sequenciamento realizado com mesma espécie viral utilizada anteriormente (Forshey et al., 2014).

Nossos resultados corroboram aos de Forshey, uma vez que, inúmeras tentativas foram feitas a fim de padronizar a reação para a detecção de *Bunyavirus* por RT-PCR convencional, utilizando os iniciadores BUN-C e BUN-S, nas quais nenhum resultado de sucesso foi obtido.

CONCLUSÕES

- Há uma quantidade significativa de flebotomíneos (*Nyssomyia umbratilis*), conhecidos por transmitir patógenos humanos, circulando tanto na Reserva Florestal Adolpho Ducke, periferia do município de Manaus, quanto no ramal Nova Esperança, Manacapuru. Sugerindo que mais estudos são necessários para investigar possíveis surtos de leishmaniose e de possíveis quadros febris, causados por arbovírus nesses locais.
- Os Iniciadores utilizados como referência por Nunes et al, 2005 precisam ser validados para amplificação do segmento S dos *Bunyaviridae*.
- A Citometria de fluxo pode ser considerada uma ferramenta confiável na detecção de partículas virais em cultura de células infectadas. Alertando para a importância de mais exploração, uma vez que até a realização deste trabalho, não havia na literatura nenhum protocolo descrito para detecção de *Bunyavirus* em flebotomíneo.
- O resultado para Sequenciamento de Nova Geração não foi o esperado, mas as amostras estão armazenadas para a realização de experimentos futuros.

REFERÊNCIAS

Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:12891-6

Barretto, M.P. 1943. Observação sobre a biologia em condições naturais, dos flebotomos do estado do São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Concurso à docência livre da cadeira de parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. 162pp.

Blair, CD; Aldeman, ZN; Olson, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin. Microbiol. Rev*, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

Braitto A., Corbisiero R., Corradini S., Fiorentini C. & Cifolini M. (1998). Toscana virus infections of the central nervous system in children: A report of 1 cases. *J. Pediatr.* 132: 144-148.

Bogh L.D., Duling T.A. (1993). Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. *Clin. Lab. Sci.* 6:167-73

Braitto A., Corbisiero R., Corradini S., Marchi B., Sancasciani N., Fiorentini C. & Ciufolini M. (1997). Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: A serological study. *Eur J Epidemiol.* 13: 761-76.

Brooks, GF; Butel, JS; Morse, AS. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P.375-393, 2000.

Brussaard C.P. (2004). Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1506-13.

Cabanillas MRS, Castellón EG 1995. Estudo sobre abrigos naturais dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) na Reserva Florestal Ducke Manaus, AM, Brasil. *Bol Dir Nac Malariol San Amb V:* 63-75.

Castellón EG, Fé NF, Buhrnheim PF, Fé FA.2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Amazônia. 11. Listagem das espécies coletadas na bacia

petrolifera no Rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. Revta. Bras. Zool. 17 (2): 455-462.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Arbovirus catalog search. Division of Vector-borne infectious diseases. Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/arbocat/search.asp>, acessado em: 18.02.2013.

Depaquit, J et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill. 2010; 15 (10):pii=19507.

Djikeng A., Halpin R., Kuzmickas R., Depasse J., Feldblyum J., Sengamalay N., Afonso C., Zhang X., Anderson N.G., Ghedin E., Spiro D.J. (2008) Viral genome sequencing by random priming methos. BMC Genom. 9:5.

Doer, R. Franz, K., Taussing, S. Das Papatacifieber, Deuticke, Leipzig, 1909.

Dull SM et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome: recognition and emergency department management. Ann Emerg Med 24: 530-536, 1994.

Dunn E.F., Pritlovet D.C., Elliott R.M. (1994). The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway Bunyaviruses: sequence determination and analysis. J. Gen. Virol. 75:597-608.

Elliott, RM. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyawera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. Virology 173: 426-436, 1989a.

Elliott, RM. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyawera virus, the prototype of family Bunyaviridae,. J Gen Virol 70: 1280-1285, 1989b.

Endris RG, Tesh RB, Young DG. Transovarial Transmission of Rio Grande vírus (Bunyaviridae: Phlebovirus) by the sand fly, *Lutzomyia anthophora*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(4), pp. 862-864. 1983.

Feitosa, MGC, Castellón, EG. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de

Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. *Acta Amazonica*. Vol. 36(4): 539 – 548. 2006

Figueiredo, LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2):224-229, mar-abr, 2007.

Gaidamovich, S. Ya, Kurakhmedova, Sh. A. Hemagglutinating properties of viruses of the phlebotomus fever group. *Arch. Ges. Virusforsch*, 45, 177, 1974.

Givan A.L. (2004). Flow cytometry: an introduction. *Method. Mol. Biol.* 263:1-32

Go, YY, Balasuriya, UBR, Lee C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res* 2014; 3:58-77.

IBGE, 2013. <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=130250> (Acessado em 07/03/2014)

Iversson, L. Doença huana por hantavirus. In: Veronesi R & Focaccia R, eds. *Tratado de infectologia*, Atheneu, São Paulo, p. 219-228, 1996.

Kao C.L., Wu M.C., Chiu Y.H., Lin J.L., Wu Y.C., Yueh Y.Y., Chen L.K., Shaio M.F., King C.C. (2001) Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J. Clin. Microbiol.* 39:3672-77.

Labuda, M., 1991. Arthropod vectors in the evolution of Bunyaviruses. *Acta Virol.* 35: 98-105.

Lark L Coffey et al., “Enhanced Arbovirus Surveillance with Deep Sequencing: Identifying,” *Virology* 448, no. C (January 5, 2014): 146–58, doi:10.1016/j.virol.2013.09.026.

Lees, JF et al. Nucleotide sequence analysis of the Bunyawera virus M RNA segment: Conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. *Virology* 148: 1-4, 1986

Medeiros DBA, Diniz JAP, Chiang JO, Pinheiro CL, Silva DEA, Vasconcelos PFC. Characterization of Rio Preto Virus: a new possible arbovirus isolated from phlebotomine sand flies. Disponível em: http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/eventos/posteres/2004/env_15/03.pdf, acessado em 20.02.2013.

Medina F, Medina J.F., Colon C., Vergne E., Santiago G. A., Munoz-Jordan J.L. (2012). Dengue virus: Isolation, propagation, quantification, and storage. *Cur. Proto. Microbiol.* 27:15D.2.1-15D.2.24.

Mertz, GJ. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses and hantaviruses. In: Richaman DD; Whitley RJ & Hayden FG, eds. *Clinical virology*, Churchill- Livingtone, New York, p.943-972,1997.

Miller BR 2008. Arboviruses. In: BWJ Mahy, MHV Van regenmortel, *Encyclopedia of Virology*, Academic Press, Oxford, p 170-176.

Moreli M.L., Aquino V.H., Cruz A.C., Figueiredo L.T. (2002). Diagnosis of Oropouche Virus infection by RT-Nested-PCR. *J. Med. Virol.* 66:139-42.

Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, Goldbach R, Plyusin A, Schmaljohn C, Tesh RB, 2005. Family *Bunyaviridae*. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. San Diego, London: Elsevier Academic Press, 695-716.

Oliveira SMP, Moraes BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, d'Almeida JM, Asensi MD, Rubens PM, Brazil RP 2000. Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Diptera: Psychodidae) provenientes de campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 319-322.

Oliveira SMP, Morais BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, Vilela ML, Brazil RP, d'Almeida JM, Arseni MD, Rubens PM 2001. Microbiota do trato digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentados com sangue e com sangue e sacarose. *Cad S Públ* 17: 229-232.

Paes, M. G. 1991. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera: Psychodidae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazonas – Brasil). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 128pp.

Paes, M.G.; Barros, M.L.B.; Toledo, L.M. 1998. Considerações sobre a produção da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas. In: Rojas, L. I. (Ed.) Espaço e doenças: um olhar sobre o Amazonas. Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 175pp

Papa, A. Velo, E. Bino, S. A novel flebovirus in Albanian sandflies. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 582-587. 2010.

Pinheiro, F.P.; Travassos da Rosa, A.P.A. Arboviroses. Doenças Infecciosas e parasitárias. 8 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. Cap. 19. P.156-165.

Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. Febre por Oropouche. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico. Leão, R. N. Q. (ed.). Belém, Editora CEJUP, 1997. p. 285-298.

Rangel EF & Lainson R. 2003. Ecologia das Leishmanioses. In Rangel E F, Lainson R (orgs), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz , Rio de Janeiro 291-309.

Saidi S., Tesh R., Javadian E., Sahabi Z & Nadim A. (1977) Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. II. The Prevalence of Human and Animal Infection with Five *Phlebotomus* Fever Virus Serotypes in Isfahan Province. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 288-293.

Sanchez- Seco MP, Echevarria JM, Hernandez L, Estevez D, Navarro- Mari JM, Tenorio A, 2003. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested- PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 71: 140-149.

Schmaljhon CS. Bunyaviridae: the viroses and their replication. In: Fields B; Knipe DM & Howley, eds. *Fundamental virology*, Lipincott-Raven, Philadelphia, p. 649-673, 1996.

Silva, B. M. Levantamento da fauna flebotômica da Reserva Florestal Ducke, usando diferentes tipos de armadilhas e iscas. Manaus, Dissertação (Mestrado Entomologia), INPA/UFAM, 1993, pp. 116.

Sivaraman D., Yeh H.Y., Mulchandani A., Yates M.V., Chen W. (2013). Use of flow cytometry for rapid, quantitative detection of poliovirus-infected cells via TAT peptide-delivered molecular beacons. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:696-700

Tesh, R. B, Chaniotis, B.N. 1975. Transovarial transmission of viroses by phlebotomine sandflies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 266: 125-134.

Tesh R., Saidi S., Javadian E. & Nadim A. (1977). Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 282-287.

Tesh R., Boshell J., Young D., Morales A., Ferro C., Corredor A., Modi G., Travassos da Rosa A., McLean R., Rodríguez C. & Gaitan M. (1989). Characterization of five new Phleboviruses recently isolated from sand flies in tropical America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 529-533.

Travassos da Rosa, A.P.A., Travassoso da Rosa, J.F.S., Vasconcelos, P.F.C., Pinheiro, F.P. Arboviroses. *In: Doenças Infecciosas e Parasitárias*. LEÃO, R.N.Q. (ed.), Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997, p. 207-226.

Vasconcelos, P. F. C. et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C. & Travassos da Rosa, J. F. S.,(ed.). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998.p 72-100.

Veal D.A., Deere D., Ferrari B., Piper J., Attfield P.V. (2000). Fluorescence stainin and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods.* 243:191-210.

Verani P., Nicoletti L., Ciufolini M. & Balducci M. 1991. Viruses transmitted by sandflies in Italy. *Parassitologia* (Suppl. 1). 33: 51-518.

Victoria J.G., Kapoor A., Dupuis K., Schnurr D.P., Delwart E.L. (2008). Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues. *Plos Pathog.* 26:4(9):e

Victoria J.G., Kapoor A., Li L., Blinkova O., Slikas B., Whang C., Naeem A., Zaidi S., Delwart E. (2009). Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J. Virol.* 83:4642.

Young DG, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 54: 881

Wattre P. (1993). Contribution of flow cytometry in virology. *Ann. Biol. Clin.* 51:1-6

Weaver, S.C. Vector biology in arboviral pathogenesis. *Viral Pathogenesis*. New York: Lippincott Raven, 1997. Cap.14 p. 329-352.

Weaver, S.C.; Barrett, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev.* V.2, p.789-801, 2004.

Weidmann M., Rudaz V., Nunes M.R., Vasconcelos P.F., Hufert F.T. (2003). Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41:3299-305.

WHO 1967. Arboviruses and human disease. Report of a WHO scientific group. World Health Organization Technical Report Series. 369: 1-8.