

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD**

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**ANTONIO JOSÉ LEÃO CARDOSO**

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE), EM UMA COMUNIDADE RURAL NA AMAZÔNIA  
CENTRAL BRASILEIRA**

**MANAUS – AM**

**2019**



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**ANTONIO JOSÉ LEÃO CARDOSO**

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:**  
**PSYCHODIDAE), EM UMA COMUNIDADE RURAL NA AMAZÔNIA**  
**CENTRAL BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia, área de concentração Ciências Biológicas III.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. FELIPE GOMES NAVECA**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FELIPE ARLEY COSTA PESSOA**

**MANAUS – AM**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C268i

Cardoso, Antonio José Leão

Investigação de vírus em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em uma comunidade rural na Amazônia Central Brasileira. / Antonio José Leão Cardoso. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

79 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca.

Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa.

1. Flebótomos 2. Phlebovírus 3. Rio Pardo flebovirus

I. Título

CDU 595.771 (811) (043.3)

CDD 595.7709811

22. ed.

**ANTONIO JOSÉ LEÃO CARDOSO**

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE), EM UMA COMUNIDADE RURAL NA AMAZÔNIA  
CENTRAL BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia, área de concentração Ciências Biológicas III.

**Aprovada em:** 31/07/2019

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Pinto de Figueiredo - Membro externo

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia María Ríos Velásquez - Membro interno

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

*À minha Mãe, Dona Ermínia, minha grande incentivadora  
sem a qual nada disso teria acontecido.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, pela oportunidade concedida à realização do Mestrado.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pela orientação, amizade, pela confiança em mim depositada, pelo espaço cedido no laboratório de Virologia, pelos ensinamentos, críticas e sugestões e pela oportunidade de ser seu aluno e poder auxiliá-lo em um estudo de Virologia.

Ao Dr. Felipe Arley Costa Pessoa, pela orientação na identificação taxonômica, pela amizade, pelo espaço cedido no laboratório de Entomologia e pela confiança em mim depositada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal, pela bolsa concedida.

À Helen Cristina, pelo companheirismo, pelo carinho, pela amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Ricardo Mota, pela amizade, pelos ensinamentos e auxílio nas coletas de campo.

Ao Eric Fabrício pela amizade, pelo auxílio e ensinamentos na identificação dos flebotomíneos em campo e na dissecação no laboratório de Entomologia.

À Dana Monteiro, pelo auxílio e ensinamentos nas culturas celulares e eletroforeses.

À Valdinete Alves, pelo auxílio e ensinamentos e procedimentos de biologia molecular.

À Victor Souza, pelos ensinamentos e sequenciamentos.

À Michele, Maria Julia e Karla Júlia, do laboratório de Bacteriologia, pelo suporte.

À Dr<sup>a</sup> Yara Maria Traub-Cseko, pelo suporte.

Aos demais colegas dos laboratórios de Virologia e Entomologia.

Fica aqui registrado meu **MUITO OBRIGADO!**

## EPÍGRAFE

*“(...) Valeu a pena?*

*Tudo vale a pena*

*Se a alma não é pequena.”*

\*\*\*

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) apresentam distribuição mundial e aproximadamente 10% das espécies conhecidas são incriminadas como vetores de agentes etiológicos de doenças humanas, principalmente parasitas do gênero *Leishmania*. Os flebotomíneos têm sido encarados como vetores negligenciados de doenças virais, mas transmitem arbovírus de importância médica e veterinária que afetam áreas urbanas, Periurbanas e rurais, em sua maioria em populações em situações precárias de vida, normalmente associadas à pobreza. Dentre esses vírus os mais relevantes são os do gênero *Phlebovirus* (família *Phenuiviridae*) que causam de febre autolimitada (febre dos flebótomos) a infecções neurológicas. Na Bacia Amazônica brasileira, vírus desse gênero já haviam sido registrados no estado do Pará e até então sem registro no estado do Amazonas. Foi realizado uma pesquisa no assentamento rural de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, área metropolitana de Manaus entre 2017 e 2018 utilizando armadilhas luminosas tipo-CDC e aspiração mecânica em base de árvores. Após as coletas, os flebotomíneos foram mantidos em cadeia fria; no laboratório, as fêmeas foram separadas e identificadas. De 2.468 flebotomíneos capturados, 991 fêmeas, distribuídas em 35 espécies gerando 460 *pools* contendo de 1 a 26 flebotomíneos, que foram macerados e inoculados em células VERO e C6/36. Desses, 38 *pools* induziram efeito citopático, 21 apenas em VERO, 11 apenas em C6/36 e 3 em ambas. Foram realizadas PCR's convencionais para o gênero *Phlebovirus* e um *pool* com 14 fêmeas de *Lutzomyia sp.* coletado em um ambiente de floresta foi positivo, o que indica que este vírus está circulando na população de flebotomíneos de Rio Pardo. Resultados preliminares de sequenciamento nucleotídico e análises filogenéticas indicam que é um *Phlebovirus* potencialmente novo, similar ao vírus Uriurana, previamente isolado no Pará, que nós provisoriamente denominamos de Rio Pardo flebovirus (RIOPV). O vírus induziu efeito citopático em células HepG2, o que é um indicativo de que esse vírus é capaz de infectar células de vertebrados. Também foi isolado com sucesso em células C6/36 e HepG2 e experimentos adicionais estão em andamento para caracterizar o isolado de RIOPV por completo. Nós também identificamos uma bactéria de microbiota de flebotomíneos com genes de resistência. Nossos resultados reforçam a necessidade de contínua vigilância de potenciais patógenos de humanos em vetores em áreas da floresta Amazônica.

**Palavras-Chave:** Flebótomos, *Phlebovirus*, Rio Pardo flebovirus, Brasil, Amazônia



## ABSTRACT

Sandflies (Diptera: Psychodidae) shows worldwide distribution and approximately 10% of known species are incriminated as vectors of etiological agents of human illness, mainly parasites of *Leishmania* genus. Sandflies have been viewed as neglected vectors of viral diseases, but they transmit arbovirus of medic and veterinary importance that affects urban, Peri-urban and rural areas mainly in populations in precarious life situations, usually associated with poverty. Among these viruses, the most relevant are those of the *Phlebovirus* genus (family *Phenuiviridae*) which causes from self-limiting fever (sandfly fever) to neurological infections. In Brazilian Amazon Basin, viruses of this genus had already been registered in the state of Pará, however until now without registration in the Amazonas state. A survey was done in Rio Pardo rural settlement, Presidente Figueiredo municipality, metropolitan area of Manaus between 2017 and 2018 using CDC-like light traps and mechanical aspiration on the base of trees. After the collections, the flies were kept under cold chain; in the lab, the females were separated and identified. From 2,468 sandflies collected, 991 females, distributed in 35 species were generated 460 pools containing from 1 up to 26 sand flies, which were macerated and inoculated into VERO and C6/36 cells. Of those, 38 pools induced cytopathic effect, 21 only in VERO, 11 only in C6/36 and 3 in both. Conventional PCRs were performed for the *Phlebovirus* genus and one pool with 14 female *Lutzomyia* sp. collected in a forest environment was positive, which indicates that this virus is circulating in the Rio Pardo sandfly population. Preliminary results of nucleotide sequencing and phylogenetic analysis indicate that it may be a new *Phlebovirus*, similar to the Uriurana virus, previously isolated in Pará, which we provisionally call Rio Pardo phlebovirus (RIOPV). The virus induced cytopathic effect in HepG2 cells, and it is indicative that the newly isolated phlebovirus can infect vertebrate cells. It was successfully isolated on C6/36 and HepG2 cells and further experiments are ongoing to fully characterize the RIOPV isolate. We also identified a bacteria from sandfly microbiota with resistant genes. Our results strengthen the necessity of continuous surveillance of potential humans' pathogens in vectors in areas of the Amazon rain forest.

**Keywords:** Sandflies, *Phlebovirus*, Rio Pardo phlebovirus, Brazil, Amazon

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos: a) ovo, b) larva, c) pupa e d) macho, e) Fêmea (Fonte: Acervo EDTA).....	17
Figura 2: a) Aparelho bucal do flebotomíneo. (Fonte: <a href="http://www.sciencephoto.com/media/370083/view">http://www.sciencephoto.com/media/370083/view</a> ); b) Peça bucal do flebótomo (Fonte: <a href="http://www.sciencephoto.com/media/370082/view">http://www.sciencephoto.com/media/370082/view</a> ) Acesso em 17/01/2019. ....	18
Figura 3: Visão geral esquemática de vírus de flebotomíneos conforme localização geográfica (Adaptado de Ayhan & Charrel 2018). ....	21
Figura 4: Locais de captura de flebotomíneos dos quais foram isolados vírus no Brasil (Adaptado de Shaw et al 2018). ....	22
Figura 5: Vírion de Phlebovirus (Adaptado de <a href="http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species">viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species</a> ). ....	24
Figura 6: Expressão gênica de Phlebovirus (Adaptado de <a href="http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species">viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species</a> ).....	25
Figura 7: Replicação de Phlebovirus (Adaptado de <a href="http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species">viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species</a> ).....	26
Figura 8: Países onde o TOSV está presente (Adaptado de Ayhan et al 2017). ....	28
Figura 9: Distribuição (em vermelho) das espécies vetoras do vírus Toscana (Charrel et al 2017). ....	29
Figura 10: Linhagens do TOSV: Linhagem A (em azul), Linhagem B (em vermelho) e linhagem C (em verde) (Adaptado de Charrel et al 2018). ....	30
Figura 11: Árvores filogenéticas de Phlebovirus em 2008 (à esquerda) e 2018 (à direita) (Adaptado de Charrel 2016 e Carvalho 2018). ....	32
Figura 12: Vírion de <i>Vesiculovirus</i> (Adaptado de <a href="http://viralzone.expasy.org/21?outline=all_by_species">viralzone.expasy.org/21?outline=all_by_species</a> ).....	34
Figura 13: Ciclos de transmissão e exposição de seres humanos a vírus de flebotomíneos. ....	38
Figura 14: Lesões causadas por infecção por VSV (Fonte: <a href="http://cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=vesicular-stomatitis">cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=vesicular-stomatitis</a> ) Acesso em 23/06/2019.....	39
Figura 15: A) Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil, B) Mapa do Amazonas com destaque para Presidente Figueiredo, C) Mapa de Presidente Figueiredo, com destaque para Rio Pardo; D) Mapa de Rio Pardo, em vermelho e azul: locais de coleta. ....	42
Figura 16: Laboratório de campo da ILMD/FIOCRUZ no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. (Fonte: Acervo EDTA). ....	43

Figura 17: Foto aérea de um trecho do Ramal Samuel, que conta com uma alta densidade populacional (Fonte: Acervo EDTA).....	44
Figura 18: Foto aérea de um trecho do Ramal Taxista, que conta com baixa densidade populacional e áreas de floresta contínua (Fonte: Acervo EDTA).....	45
Figura 19: Ambientes em que foram colocadas as armadilhas luminosas tipo-CDC: a) Peridomicílio, b) Borda de floresta e c) Floresta (Fonte: Acervo EDTA). ....	46
Figura 20: Armadilha içada na plataforma do Ramal Gusmão (Fonte: Acervo EDTA). ....	47
Figura 21: Fluxograma de atividades. ....	48
Figura 22: Dissecção em cadeia fria: a) Temperatura na caixa de gelo seco, b) Dissecção com estilete entomológico, c) Fêmea com parte do abdômen dissecado, d) Temperatura inicial na caixa de gelo de água destilada com álcool etílico. (Fonte: Acervo EDTA). ....	49
Figura 23: Sugestivo de ECP em células C6/36: a) Amostra AF-RPFV 179 96h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 179 no mesmo período, c) Amostra AF-RPFV 186 144h p.i., d) Mock da AF-RPFV 186, e) Amostra AF-RPFV 349 120h p.i., f) Mock da AF-RPFV 349 (Fonte: este estudo). ....	57
Figura 24: Imagem sugestiva de efeito citopático em células VERO: a) Amostra AF-RPFV 109 96h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 109 no mesmo período (Fonte: este estudo). ....	57
Figura 25:ECP na garrafinha de C6/36 em um aumento de 10x: a) Amostra AF-RPFV 43 24 h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 43 no mesmo período (Fonte: este estudo). ....	58
Figura 26:ECP em frasco do pool AF-RPFV 179 em VERO (5X): a) 168h p.i.: surgimento de buracos na monocamada, b) Mock no mesmo período, c) 192h p.i.: destruição quase total da monocamada com poucas células permanecendo aderidas d) Mock manteve-se estável. ....	59
Figura 27: a) Cultivo da bactéria em ágar sangue, b) Resultado da coloração de Gram.....	60
Figura 28:Sensibilidade da bactéria em teste de disco-difusão a 37°C aos antibióticos Amicacina e Tobramicina.....	61
Figura 29:Sensibilidade da bactéria em teste de disco-difusão: a) a 37°C aos antibióticos Tobramicina, b) Resistência a todos os antibióticos a 30°C.....	62
Figura 30: Resultado do MLST-2.0 de <i>S. maltophilia</i> : Foram identificados dois alelos conhecidos (atpD e nuoD), quatro alelos novos (mutM, gapA, recA e guaA) e um hit imperfeito. ....	63
Figura 31: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Fonte: <i>Trends in Microbiology</i> 2018 26, 637-638DOI: (10.1016/j.tim.2018.04.006). Acesso em 17/06/2019. ....	64
Figura 32:Resultado da EGA: a) Pool AF-RPFV 44, b) Pool AF-RPFV 339, c) Branco.....	66
Figura 33: Reconstrução filogenética da amostra AF_RPFV_44_2019. A árvore de máxima verossimilhança construída a partir de um dataset com 23 sequências de referência do segmento L de flebovírus disponíveis no GenBank e a amostra AF_RPFV_44_2019. Em amarelo flebovírus isolados de flebotomíneos; em branco flebovírus isolados de mamíferos, sem vetor cohecido; em	

azul flebovírus isolados de mosquitos e em verde flebovírus isolados de carrapatos. Os valores de suporte de aLRT estão descritos ao lado de cada nó e também representados pelos círculos em função da cor e tamanho.; ..... 67

Figura 34: EGA da PCR 2 dos isolados do pool AF-RPFV 44, da segunda PCR: a) #1 de C6/36, b) #1 de VERO, c) #2 de C6/36 e d) #2 de VERO..... 69

Figura 35: ECP causado por Phlebovirus em células Hep G2: a) 96h p.i., b) Mock. .... 70

Figura 36: EGA do isolado de Hep G2: a) Amplicon da primeira PCR, b) Amplicon da segunda PCR. .... 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Phlebovirus de flebotomíneos do Velho Mundo (Adaptado de Palacios 2014, Ayhan & Charrel 2018) .....	23
Tabela 2: Phlebovirus de flebotomíneos do Novo Mundo (Adaptado de Palacios et al 2011, 2013). .....	33
Tabela 3: Vesiculovirus de flebotomíneos (Adaptado de Maroli et al 2012 e ICTV 2018).....	35
Tabela 4: Orbivirus de flebotomíneos (Adaptado de Silva et al 2014 e ICTV 2018). .....	37
Tabela 5: Espécies de flebotomíneos por locais de coleta. ....	55
Tabela 6: Antibióticos testados na disco difusão. ....	62

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

SFSV – *Sandfly fever Sicilian virus*

Ph, - *Phlebotomus*

SFNV – *Sandfly fever Naples virus*

TOSV – *Toscana virus*

PTV – *Punta Toro virus*

VSV – Vírus da estomatite vesicular

CARV – *Carajas virus*

MARV – *Maraba virus*

Lu. - *Lutzomyia*

CHPV - Vírus Chandipura

ECP – Efeito citopático

AF-RPFV – Arbovírus em Flebotomíneos - Rio Pardo Fêmeas Vivas

URIV – *Uriurana virus*

RIOPV – Rio Pardo flebovirus

# Sumário

INTRODUÇÃO .....	16
Flebotomíneos .....	16
Arbovírus de flebotomíneos .....	18
<i>Phlebovirus</i> de flebotomíneos .....	22
Outros vírus transmitidos por flebotomíneos .....	34
Ciclos de Transmissão de Vírus de Flebotomíneos.....	37
JUSTIFICATIVA.....	40
DESENVOLVIMENTO .....	41
OBJETIVOS .....	41
Objetivo Geral .....	41
Objetivos específicos.....	41
MÉTODOS .....	42
Aspectos éticos e legais da Pesquisa .....	42
Local de realização da pesquisa e população de interesse .....	42
Coletas.....	45
Fluxograma de Atividades .....	48
Coleta de Campo: Captura, Identificação e Preservação de flebotomíneos.....	48
Processamento das amostras .....	48
Maceração .....	50
Isolamento viral.....	50
Extração de RNA, produção de cDNA e PCR convencional.....	51
Sequenciamento e Análise Filogenética.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
Bactéria <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	59
<i>Phlebovirus</i> .....	66
CONCLUSÃO .....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

## INTRODUÇÃO

### **Flebotomíneos**

Os flebotomíneos taxonomicamente estão classificados como pertencentes ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, infraordem Psychodomorpha, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e são insetos de pequeno porte, com registro fóssil desde o período Cretáceo – de 120 a 135 milhões de anos<sup>(1)</sup>, com aproximadamente 1.000 espécies conhecidas.

Apresentam distribuição em áreas tropicais e subtropicais, regiões áridas e semiáridas, além de zonas temperadas, e são dispersos inclusive em algumas áreas urbanas, rurais e periurbanas.<sup>(2)</sup>

Na Região neotropical foram identificadas mais de 500 espécies de flebotomíneos, das quais 530 encontradas nas Américas.<sup>(3)</sup> No Brasil, 265 espécies foram descritas até o momento<sup>(4)</sup>. No estado do Amazonas estão presentes 49% da fauna brasileira de flebotomíneos, num total de 113 espécies, das quais 67 estão presentes em Manaus e municípios próximos.<sup>(5)</sup>

São insetos holometábolos, possuindo metamorfose completa, com as larvas apresentando quatro instares bem definidos. Estes estágios larvais desenvolvem-se em matéria orgânica no solo.<sup>(4,6)</sup>



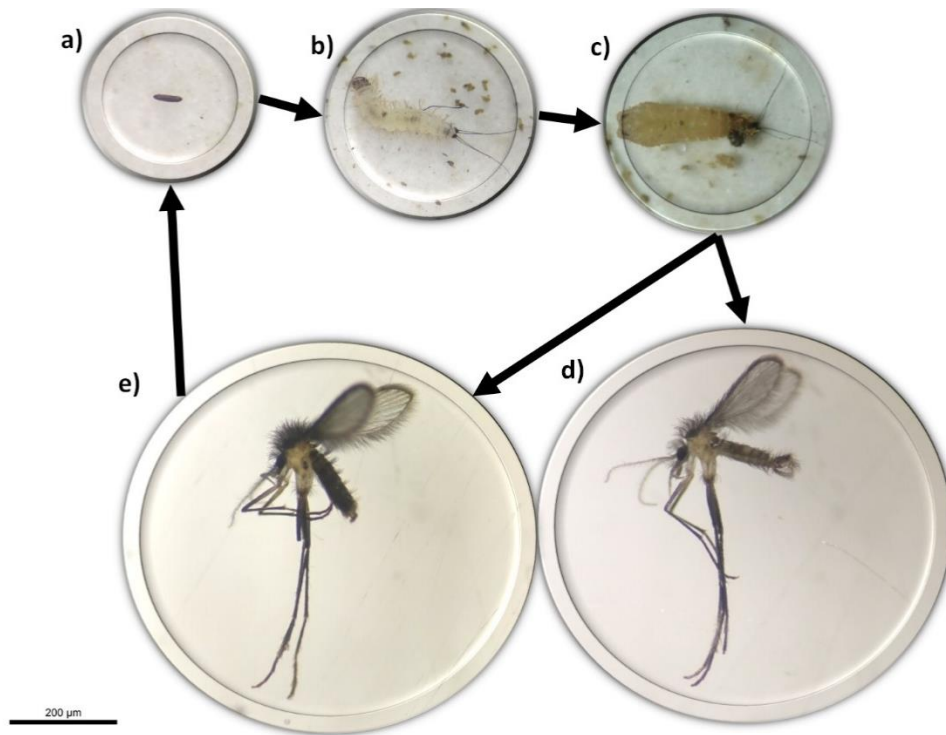


Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos: a) ovo, b) larva, c) pupa e d) macho, e) Fêmea (Fonte: Acervo EDTA).

Os adultos apresentam dimorfismo sexual (Figuras 1d e 1e), têm corpo piloso, apresentam hábitos noturnos, capacidade de voo de curta distância e têm como característica asas eretas em forma de “V” quando em repouso. São delicados e sensíveis a variação de temperatura e umidade. Popularmente são conhecidos como mosquito palha, birigui, tatuquira, asa branca, entre outros. Abrigos naturais para adultos incluem ocos de árvores, liteira, cavernas, cupinzeiros, tocas de animais, espaço entre rochas e copas de árvores. Em ambientes com ocupação ou interferência humana repousam em áreas úmidas e sombreadas, furos em paredes, interior de residências e também em abrigos de animais<sup>(2,4,7-9)</sup>

Tanto as fêmeas quanto os machos alimentam-se de carboidratos como fonte de energia e somente as fêmeas são hematófagas – apresentando uma peça bucal diferenciada (mandíbula), e alimentação do tipo ‘*pool feeder*’ (Figura 2) – necessitando de sangue para maturação dos folículos ovarianos. Flebotomíneos alimentam-se de um amplo espectro de animais tais como vertebrados de sangue frio, mamíferos e aves, dependendo da espécie do flebotomíneo. Após a maturação dos ovos, estes são postos em substrato úmido rico em matéria orgânica, como em fezes de herbívoros, que irão proporcionar alimento para as larvas.<sup>(10,11)</sup>



Figura 2: a) Aparelho bucal do flebotomíneo. (Fonte <http://www.sciencephoto.com/media/370083/view>); b) Peça bucal do flebótomo (Fonte: <http://www.sciencephoto.com/media/370082/view>) Acesso em 17/01/2019.

Das espécies de flebotomíneos conhecidas aproximadamente 10% são incriminadas como vetores de agentes etiológicos de importância médica e veterinária como os gêneros – dependendo da escola taxonômica – *Phlebotomus* e *Sergentomyia* que estão presentes no velho mundo e o gênero *Lutzomyia* que habita o novo mundo, esses três pertencentes à subfamília Phlebotominae dentro da família Psychodidae.<sup>(12,13)</sup>

Dentre os agentes etiológicos transmitidos por flebotomíneos estão protozoários tripanossomatídeos, incluindo espécies do gênero *Leishmania* que causam a doença chamada leishmaniose, que é uma das 10 doenças tropicais negligenciadas mais preocupantes, sendo Leishmaniose Visceral (LV), com aproximadamente 300.000 novos casos anuais a nível mundial, com letalidade superior a 6,6%<sup>(14)</sup>, e Leishmaniose Tegumentar, com 142.635 casos a nível mundial no ano de 2017.<sup>(15)</sup>

Os flebótomos também são transmissores de uma vasta quantidade de vírus de importância médica e veterinária e da bactéria *Bartonella baciliformis*, causadora da bartonelose na região dos Andes, sem registro de transmissão no Brasil.<sup>(16,17)</sup>

### **Arbovírus de flebotomíneos**

O termo arthropod-borne vírus (vírus transmitidos por artrópodes) foi criado no ano de 1942 e faz alusão ao principal mecanismo biológico pelo qual essas viroses são perpetuadas, replicando-se em células de artrópodes hematófagos e sendo transmitidos durante o repasto sanguíneo para hospedeiros vertebrados suscetíveis que servem como

reservatório. No ano de 1963, após recomendação do Subcomitê Internacional sobre Nomenclatura dos Vírus foi adotado oficialmente o termo 'arbovírus' para designar os vírus transmitidos por artrópodes.<sup>(18)</sup>

Os arbovírus circulam na natureza e são transmitidos biologicamente entre vertebrados reservatórios suscetíveis (principalmente mamíferos e aves), em sua maioria por dois grupos de artrópodes hematófagos: mosquitos (Família Culicidae) e carrapatos (Famílias Ixodidae e Argasidae), mas também podem ser transmitidos por flebotomíneos (Família Psychodidae), maruins (Família Ceratopogonidae) e piuns (Família Simuliidae).<sup>(19,20)</sup>

Competência vetorial é a possibilidade de um vetor de tornar-se infectado com um arbovírus após ingestão de sangue contaminado com o mesmo e posteriormente transmiti-lo. Após o repasto sanguíneo a replicação do vírus inicia-se nas células epiteliais do mesentério, adentrando pela hemocele de onde irá disseminar-se para os tecidos parenterais, hemolinfa e, por fim, às glândulas salivares, onde irá realizar uma infecção persistente e dali será transmitido para outros vertebrados suscetíveis em subseqüentes repastos sanguíneos.<sup>(21)</sup>

A capacidade vetorial é a habilidade de uma fêmea vetor de transmitir com sucesso patógenos e a eficiência da transmissão da doença e é afetada por fatores extrínsecos como o comportamento de alimentação sanguínea, densidade e longevidade vetorial, a replicação do vírus, e o contato do mesmo com hospedeiros vertebrados suscetíveis; e intrínsecos como a competência vetorial.<sup>(21)</sup>

Os arbovírus de importância médica para o ser humano majoritariamente têm genomas de RNA e pertencem principalmente às famílias *Flaviviridae* (Gênero *Flavivirus*), *Nairoviridae* (Gênero *Orthonairovirus*), *Peribunyaviridae* (Gênero *Orthobunyavirus*), *Phenuiviridae* (Gênero *Phlebovirus*), *Togaviridae* (Gênero *Alphavirus*), *Reoviridae* (Gênero *Orbivirus*) e *Rhabdoviridae* (Gênero *Vesiculovirus*), e em menor proporção às famílias *Orthomyxoviridae* (Gênero *Thogotovirus*) e *Asfarviridae* (Gênero *Asfivirus* – único arbovírus de DNA conhecido) sendo em sua grande maioria zoonoses.<sup>(19,20,22)</sup>

Na atualidade há aproximadamente 530-540 espécies virais (de arbovírus e outros vírus zoonóticos) das quais 134 já foram isolados em seres humanos. No Brasil, 34 foram associados a doenças em seres humanos. Algumas arboviroses causam sérios problemas de saúde pública, causando milhões de infecções anualmente, tais como a Dengue (nas regiões de clima tropical, com presença de mosquitos vetores,

principalmente *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*) e a Febre Amarela, que a pouco tempo disseminou-se pelas regiões Sudeste e Sul do Brasil e num intervalo inferior a um ano e meio foram registrados 1.833 casos com 578 mortes confirmadas (23–26).

As infecções causadas por arbovírus podem apresentar complicações atípicas ou graves e causar distúrbios neurológicos, de quadros febris, que podem ser indiferenciados, moderados ou graves, com ou sem exantema; febres hemorrágicas; artralgia (poliartralgia e poliartrite) e rash maculopapular, mielite e meningite asséptica a encefalite seguida de coma, paralisia e morte.<sup>(27–29)</sup>

Dentre os vírus transmitidos por flebotomíneos (Figura 3) destacam-se os pertencentes aos gêneros *Phlebovirus* (família *Phenuiviridae*) que causam, normalmente, doenças febris autolimitadas (febre do flebótomo). No entanto algumas espécies virais podem infectar células do Sistema Nervoso Central e Periférico causando meningites e meningoencefalites.<sup>(30,31)</sup>

Flebótomos também são capazes de transmitir vírus do gênero *Vesiculovirus* (família *Rhabdoviridae*), que causam severas perdas em pecuária atingindo o homem de maneira indireta (contato e fômites) no Novo Mundo e na Índia é responsável por casos letais, principalmente de crianças; e do gênero *Orbivirus* (família *Reoviridae*), sendo o ser humano um hospedeiro acidental. No Brasil (Figura 4), apesar de ainda pouco estudado há registro de isolamento de vírus desses 3 gêneros além de outros com gênero ainda não atribuído.<sup>(4,32)</sup>

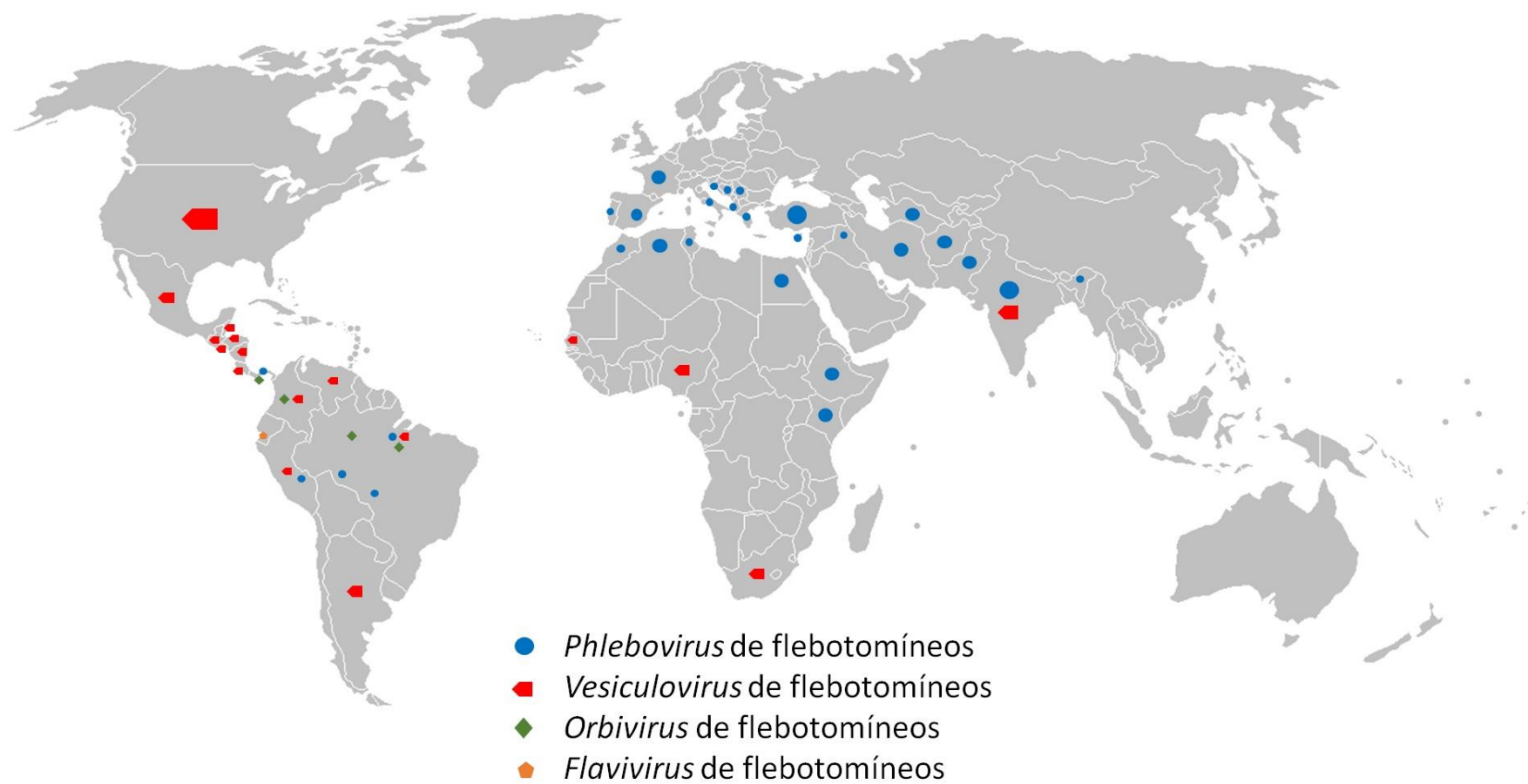


Figura 3: Visão geral esquemática de vírus de flebotomíneos conforme localização geográfica (Adaptado de Ayhan & Charrel 2018).

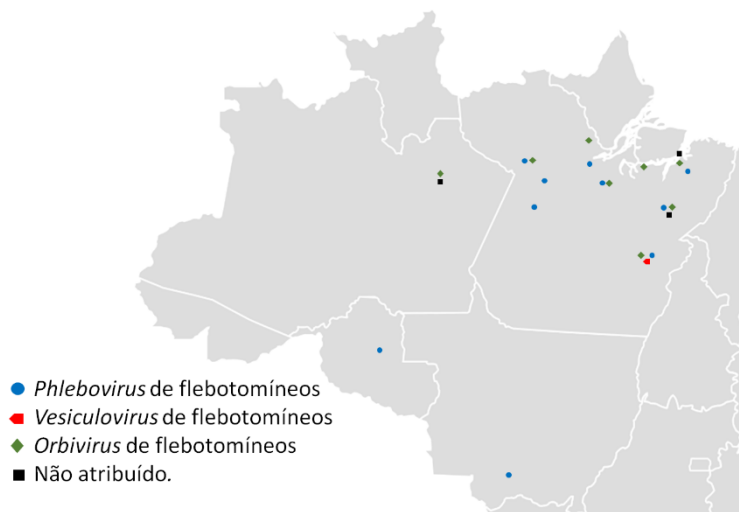


Figura 4: Locais de captura de flebotomíneos dos quais foram isolados vírus no Brasil (Adaptado de Shaw et al 2018).

### ***Phlebovirus* de flebotomíneos**

Os vírus do gênero *Phlebovirus* de acordo com a mais recente atualização taxonômica do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) estão classificados como pertencentes ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, classe *Ellioviricetes*, ordem *Bunyvirales*, família *Phenuiviridae*, gênero *Phlebovirus*, compreendendo mais de 80 espécies virais, 58 das quais divididas entre dez complexos antigênicos que são considerados como espécies. <sup>(33,34)</sup>

As dez espécies do gênero *Phlebovirus* reconhecidas pelo ICTV são: *Bujaru phlebovirus*, *Candiru phlebovirus*, *Chilibre phlebovirus*, *Frijoles phlebovirus*, *Mukawa phlebovirus*, *Punta Toro phlebovirus*, *Rift Valley fever phlebovirus*, *Salehabad phlebovirus*, *Sandfly fever Naples phlebovirus*, e *Uukuniemi phlebovirus* e são classificados em dois grupos antigênicos: o grupo da febre dos flebotomos, transmitidos principalmente por flebotomíneos no Velho Mundo (Tabela 1) e o grupo *Uukuniemi*, transmitidos por carrapatos. <sup>(33,35)</sup>

Tabela 1: Phlebovirus de flebotomíneos do Velho Mundo (Adaptado de Palacios 2014, Ayhan &amp; Charrel 2018)

Sorogrupo	Espécie	Origem do vírus	País / Ano
Febre do Flebótomo Napolitano	<i>Sandfly fever Naples vírus Sabin (SFNV)</i>	Amostra de sangue	Itália, 1944
	<i>Tehran virus (THEV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i>	Irã, 1959
	<i>Sandfly fever Naples virus R-3 (SFNV)</i>	Soro humano	Chipre, 1985
	<i>Sandfly fever Naples vírus Namru (SFNV)</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Egito, 1985
	<i>Sandfly fever Naples vírus (SFNV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i> e humanos	Índia, 1971
	<i>Sandfly fever Naples virus YU 8-76 (SFNV)</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Sérvia, 1976
	<i>Granada virus (GRAV)</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i> e humano	Espanha, 2004
	<i>Massilia virus (MASV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i>	França, 2005
	<i>Punique virus (PUNV)</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i> e <i>Phlebotomus longicuspis</i>	Tunísia, 2008
	<i>Toscana virus(TOSV)</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Itália, 1984
	<i>Karimabad virus (KARV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i>	Irã, 1959
Febre do Flebótomo Siciliano	<i>Sandfly fever Sicilian vírus Sabin (SFSV)</i>	Soro humano	Itália, 1943
	<i>Sandfly fever Cyprus vírus (SFCV)</i>	Soro humano	Chipre, 2002
	<i>Sandfly fever Sicilian vírus (SFSV)</i>	Humano	Etiópia, 2011
	<i>Sandfly fever Turkey vírus (SFTV)</i>	Soro humano	Turquia, 2010
	<i>Dashli virus(DASHV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i> e <i>Sergentomyia spp.</i>	Irã, 2009
Salehabad	<i>Adria vírus (ADRV)</i>	Sangue humano	Grécia, 2010
	<i>Adria vírus(ADRV)</i>	<i>Phlebotomus spp.</i>	Albânia, 2009

Os *Phlebovirus* são vírus envelopados, esféricos, com diâmetro de 80 a 120 nanômetros que apresentam genoma de RNA com três segmentos de fita simples de polaridade negativa (Grupo V na Classificação de Baltimore) de tamanhos distintos denominados: seguimento grande (*L segment*) com aproximadamente 6.4 mil



nucleotídeos, segmento médio (*M segment*) com aproximadamente 3.2 mil nucleotídeos e segmento curto (*S segment*) com 1.7 mil nucleotídeos (Figura 5).<sup>(36)</sup>

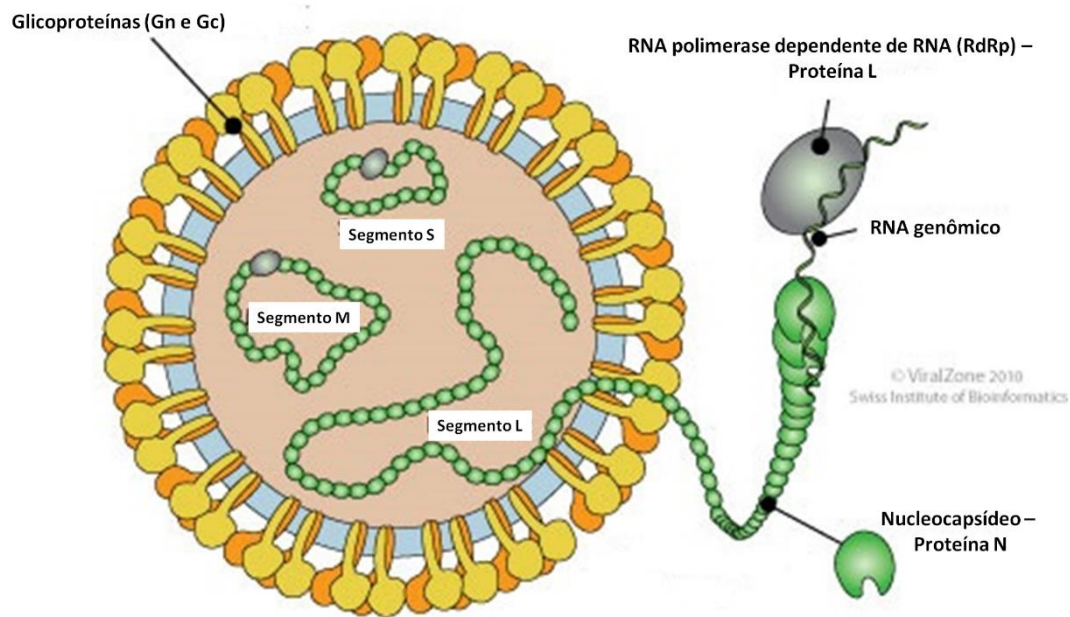


Figura 5: Vírion de Phlebovirus (Adaptado de [viralzone.expasy.org/252?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species)).

Na expressão gênica dos *Phlebovirus* o segmento grande codifica a RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp), o segmento médio (*M segment*) que codifica diversas glicoproteínas num processo conhecido como “*leaky scanning*”, onde na mesma região há mais de uma síntese de proteínas que não estão na mesma fase de leitura e são clivadas pela protease do hospedeiro nas proteínas Nsm-GM, Nsm, NSm’, Gn e Gc, e o segmento curto (*S segment*), que codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) e proteínas não estruturais (NSs) (Figura 6).



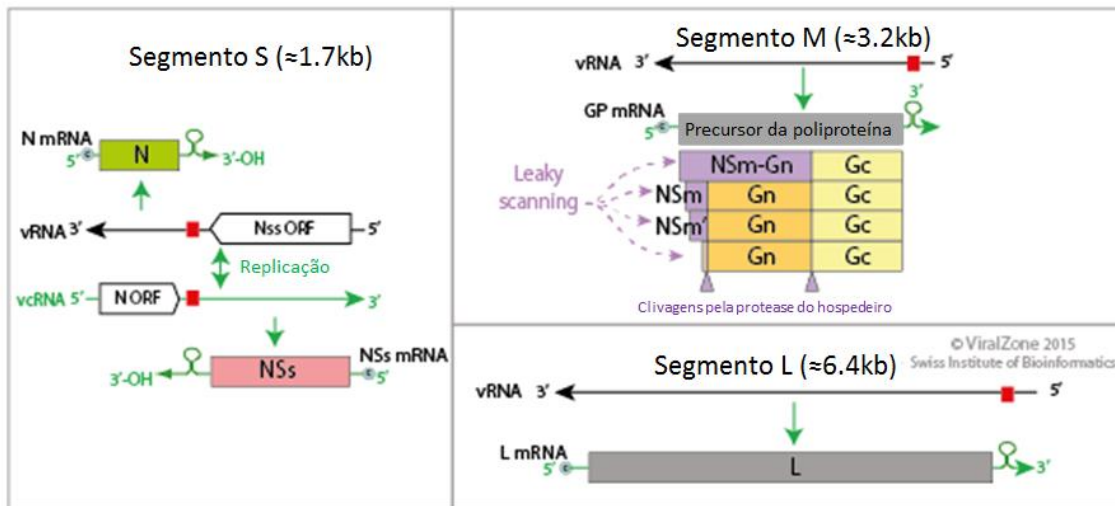


Figura 6: Expressão gênica de Phlebovirus (Adaptado de [viralzone.expasy.org/252?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species)).

Na replicação, os *Phlebovirus* (Figura 7) fazem a adsorção aos receptores das células do hospedeiro por meio das glicoproteínas Gn e Gc e acontece uma endocitose mediada por receptor (Elliot 2014). Conforme o endossoma vai migrando dentro das células, ele vai acidificando. No endossoma, a membrana do vírus funde seu envelope com a vesícula da membrana endossomal e o genoma é liberado no citoplasma.<sup>(37)</sup>

Esse vírus tem uma transcrição ambisense, a partir do segmento S são geradas as proteínas NSs, que irão inibir as defesas do hospedeiro via PKR e inibe a iniciação de transcrição do hospedeiro. O segmento S vai formar a nucleoproteína, o segmento M dará origem à proteína de envelope NGc que serão sintetizadas no aparelho de Golgi. A proteína NSm inibe a apoptose celular. O segmento L produz a polimerase viral que fará a replicação e quando as fitas dos genomas estão prontas, migram para o aparelho de Golgi onde serão encapsuladas, formando o vírion completo que é liberado para o meio extracelular por exocitose.

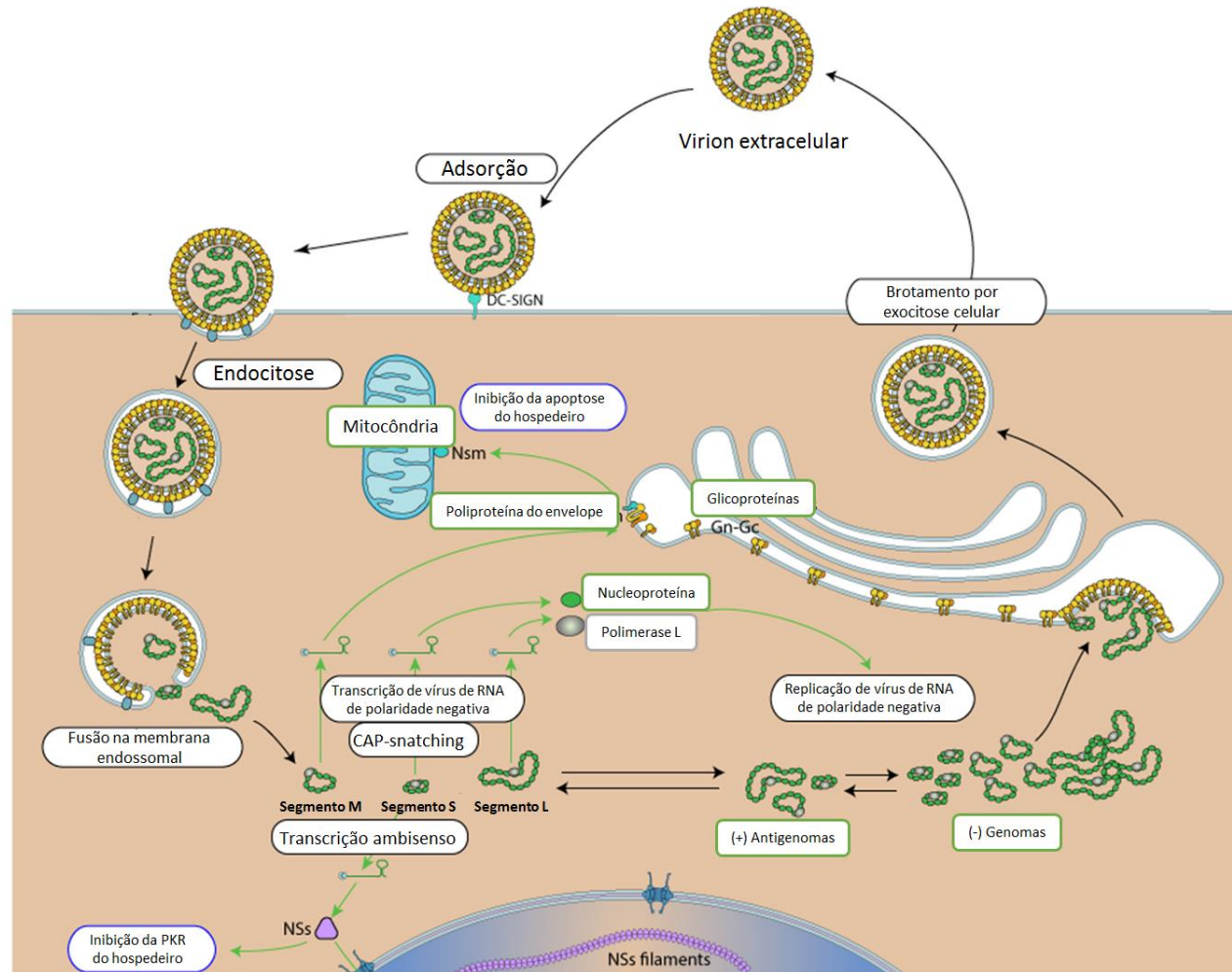


Figura 7: Replicação de Phlebovirus (Adaptado de [viralzone.expasy.org/252?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/252?outline=all_by_species)).

Há indícios de doenças febris causadas por flebotomíneos exemplificadas durante incursões militares, como as guerras napoleônicas e a colonização britânica na Índia e Paquistão <sup>(13)</sup> e a primeira descrição clínica da febre dos flebótomos data da segunda metade do século XIX, feita pelo médico militar austro-húngaro Alois Pick em soldados estrangeiros em barracas militares na Bósnia-Herzegovina. <sup>(38,39)</sup>

No ano de 1904 foi observada a presença de flebotomíneos na mesma região e notou-se o surgimento de uma febre endêmica apenas em locais com a presença dos mesmos. <sup>(38,39)</sup> Quatro anos depois o agente etiológico foi descoberto e descrito como sendo um “agente filtrável” (vírus), tendo como vetor flebotomíneos da espécie *Phlebotomus pappatasi*, daí em diante a doença ficou conhecida como “febre papatasi”, “febre do flebótomo” ou “febre de 3 dias”. <sup>(38,39)</sup> A febre dos flebótomos afetou muitas pessoas durante a Segunda Guerra Mundial na região dos Bálcãs e do Mediterrâneo durante os meses de abril a outubro, que é o período de maior atividade dos flebotomíneos em zonas temperadas e no norte da África. <sup>(38)</sup>

O vírus da febre do flebótomo siciliano (*Sandfly fever Sicilian virus* - SFSV) foi caracterizado e isolado do soro de soldados americanos que apresentaram quadro de síndrome febril quando estavam lotados na cidade de Palermo na Sicília em 1943, durante a Segunda Guerra Mundial por Albert Sabin. Também foi isolado do soro de soldados doentes no Egito no mesmo ano e posteriormente foi confirmado por teste de reação cruzada tratar-se do mesmo agente etiológico, sendo o *Ph. pappatasi* identificado como vetor. <sup>(40)</sup>

Surtos epidêmicos recentes de variantes do SFSV foram relatados no Chipre, na Etiópia, no Iraque e na Turquia. Esses vírus têm como vetores comprovados flebótomos das espécies *Ph. pappatasi*, *Ph. ariasi* e flebótomos do complexo *Ph. major*. <sup>(41-45)</sup>

O vírus da febre do flebótomo napolitano (*Sandfly fever Naples virus* - SFNV) foi isolado pela primeira vez em Nápoles no ano de 1944 do sangue de um soldado das Tropas Aliadas que apresentava quadro febril, por Albert Sabin. <sup>(40)</sup>

Os vírus das febres dos flebótomos napolitano (SFNV) e siciliano (SFSV) apresentam síndromes clínicas semelhantes e após um período de incubação de 3 a 5 dias há um início súbito de febre, dores de cabeça, mal-estar, fotofobia, mialgia e dor retro orbital e comumente a pessoa doente recupera-se completamente no intervalo de uma semana, porém demonstram-se altamente incapacitantes no período de infecção. <sup>(12,38)</sup>

O vírus napolitano e o siciliano tiveram suas diferenças antigênicas confirmadas por testes sorológicos (neutralização e fixação do complemento) a partir de amostras humanas (38).

O vírus Toscana (*Toscana virus* – TOSV) é uma espécie do grupo da febre do flebótomo napolitano e foi isolado primeiramente do flebotomíneo *Phlebotomus perniciosus* na Itália, no ano de 1971.<sup>(46)</sup> Também já foi isolado de *Ph. perfiliewi* e de cérebro de morcegos *Pipistrellus kuhli* capturado em áreas onde *Ph. perniciosus* e *Ph. perfiliewi* foram encontrados.<sup>(12,47)</sup> Há o relato também de TOSV isolado de *Sergentomyia minuta*, na França. O TOSV atualmente é o arbovírus mais disperso na Europa com pelo menos 250 milhões de pessoas vivendo em área de risco (Figura 8).<sup>(6,12)</sup>

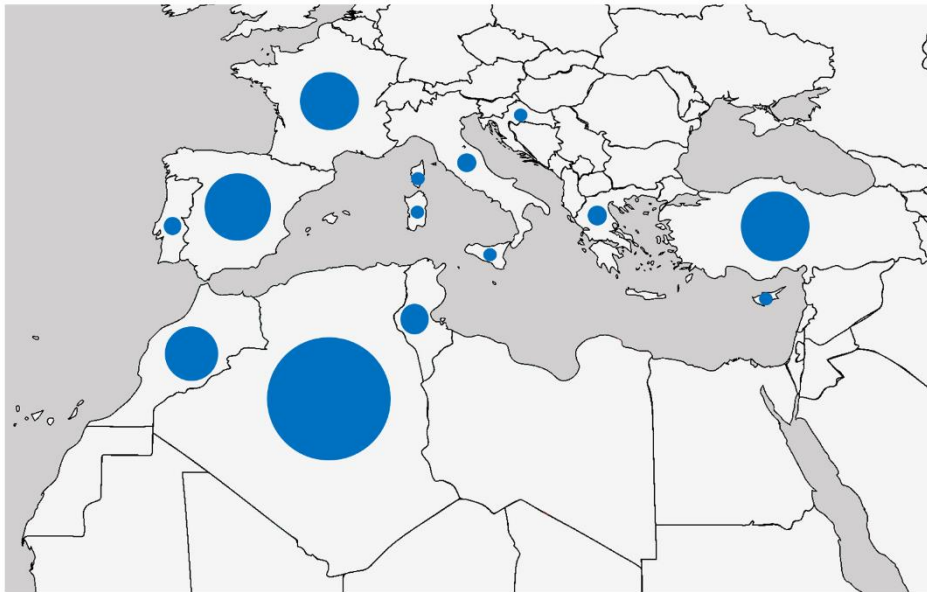


Figura 8: Países onde o TOSV está presente (Adaptado de Ayhan et al 2017).

A dispersão do vírus Toscana está associada à presença de espécies vetoras (Figura 9), e pode também ser transmitido por espécies distintas das originalmente conhecidas como o *Ph. neglectus* na região dos Bálcãs e *Ph. sergenti* no Marrocos.

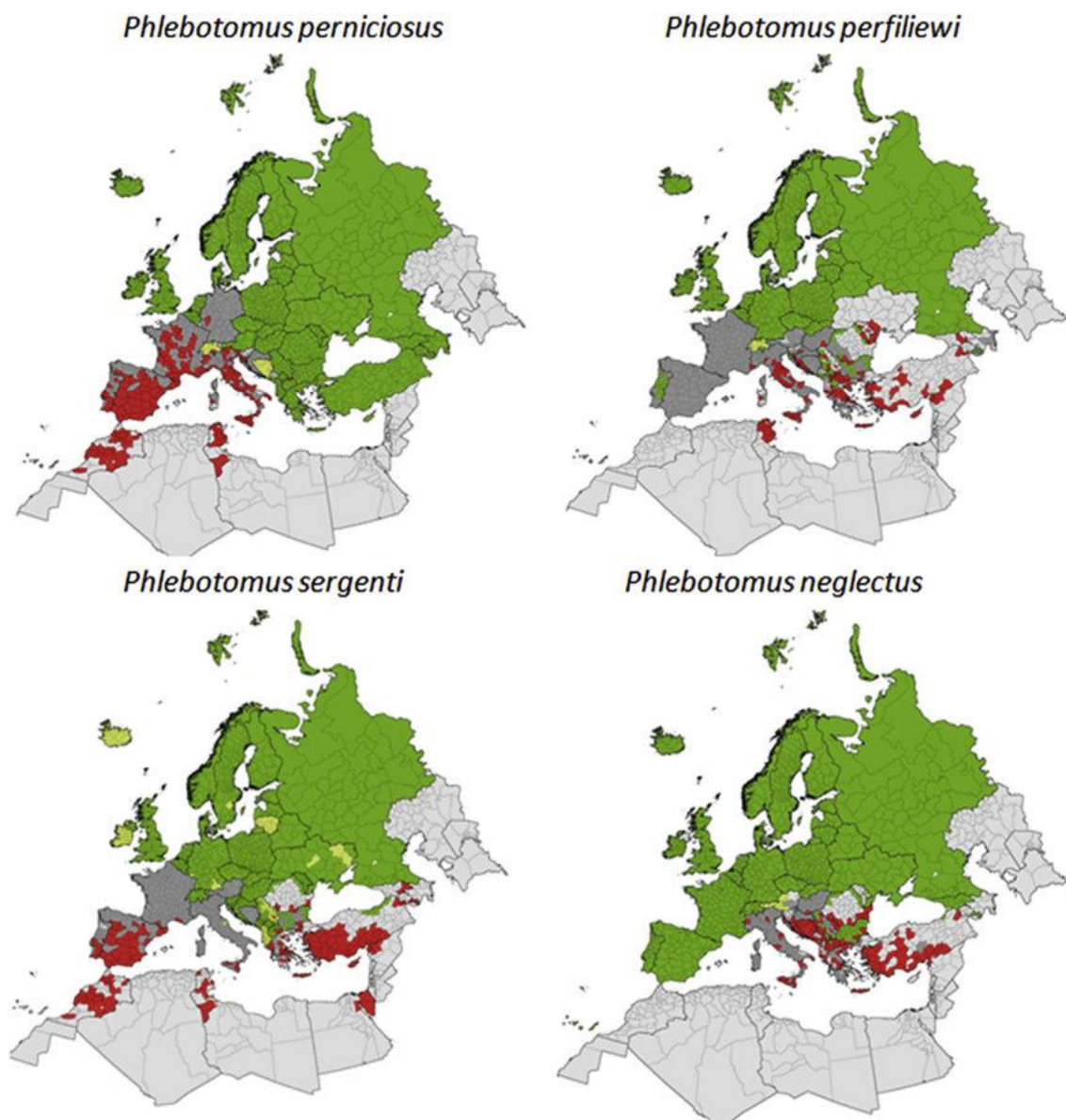


Figura 9: Distribuição (em vermelho) das espécies vetoras do vírus Toscana (Charrel et al 2017).

Desde a descoberta do TOSV até a associação de sua patogenicidade em seres humanos decorreu um período de 14 anos. A infecção pode ser assintomática, ou causar quadro de síndrome febril após um período de incubação de três a sete dias.<sup>(47)</sup>

Em síndromes clínicas com quadro de Infecções neurológicas apresentam inicialmente dores de cabeça, febre, náusea, vômito e mialgia e o paciente pode apresentar rigidez no pescoço, sinal de Kernig e em alguns casos inconsciência, tremores, paresia e nistagmo.<sup>(30,31,47)</sup>

Há também outros registros de sintomatologias neurológicas causadas pelo TOSV: encefalite, meningoencefalite severa, surdez, alterações persistentes de

personalidade, inconsciência duradoura com convulsões, convalescência prolongada e até encefalite fatal.<sup>(38)</sup>

A maioria dos registros de casos de TOSV em humanos provém de países da Bacia do Mediterrâneo (Chipre, Croácia, França, Grécia, Itália, Portugal e Turquia), porém em países onde o TOSV é endêmico ele não é uma doença notificável, e a maioria dos casos relatados envolve viajantes diagnosticados quando retornam para seu país de origem.<sup>(48)</sup> Até o momento foram identificadas três linhagens de TOSV: A, B e C, com três países apresentando co-circulação de duas linhagens distintas: França, Turquia e Croácia (Figura 10).

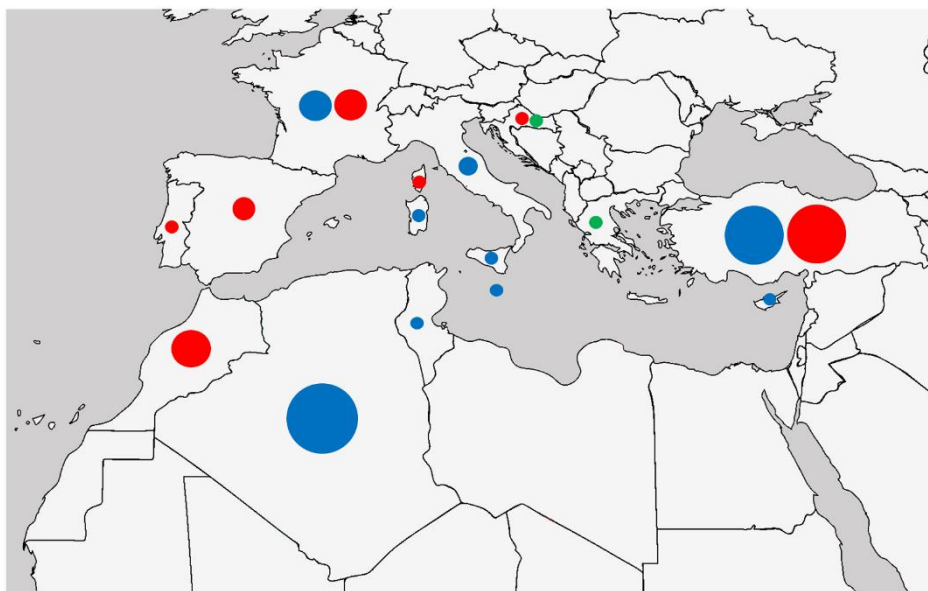


Figura 10: Linhagens do TOSV: Linhagem A (em azul), Linhagem B (em vermelho) e linhagem C (em verde) (Adaptado de Charrel et al 2018).

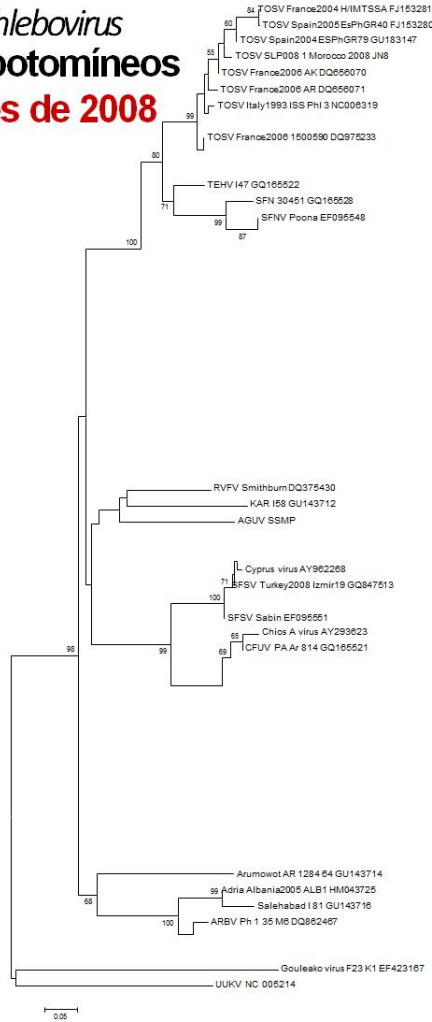
Do grupo *Salehabad*, a primeira e até agora única espécie viral associada a doença em humanos é o vírus Adria (*Adria virus – ADRV*) detectado em flebotomíneos coletados na Albânia<sup>(49)</sup> e, em 2009 um paciente de 30 semanas de vida foi admitido em um hospital na Grécia apresentando síndrome febril e convulsões; testes apresentaram positividade para RNA de *Phlebovirus*, análise filogenética do sequenciamento comprovou a proximidade com a sequência de ADRV.<sup>(50)</sup>

Na última década houve um aumento significativo da quantidade de *Phlebovirus* de flebotomíneos (Figura 11), pertencendo aos três grupos supracitados, e ainda sem a

classificação taxonômica do ICTV, muitos desses vírus tendo sido descobertos em flebotomíneos capturados onde nunca havia sido registrado um flebovirus.



**Phlebovirus  
de flebotomíneos  
antes de 2008**



**Phlebovirus  
de flebotomíneos  
em 2018**

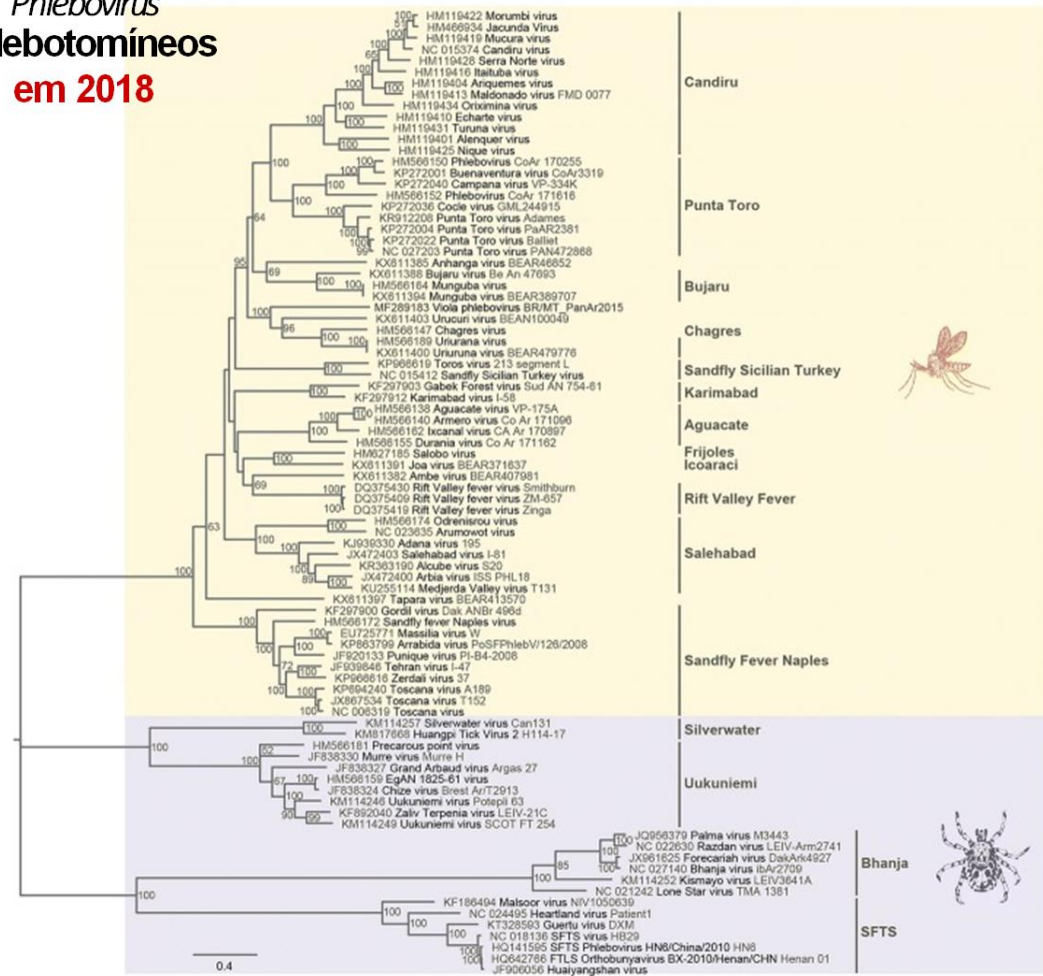


Figura 11: Árvores filogenéticas de Phlebovirus em 2008 (à esquerda) e 2018 (à direita) (Adaptado de Charrel 2016 e Carvalho 2018).



No Novo Mundo, o flebovirus de flebotômíneos de maior importância médica é o vírus Punta Toro (*Punta Toro virus* – PTV) (Tabela 2), que foi isolado e identificado em humanos e outros vertebrados, e flebotômíneos do gênero *Lutzomyia spp.*<sup>(51)</sup>

Tabela 2: Phlebovirus de flebotômíneos do Novo Mundo (Adaptado de Palacios et al 2011, 2013).

Sorogrupo	Espécie	Origem do vírus	País / Ano
Punta Toro	<i>Punta Toro virus Adames</i> (PTV-A)	Humano	Panamá, 1972
	<i>Punta Toro virus Balliet</i> (PTV-B)	Humano	Panamá, 1966
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 2004
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 2004
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Hamster sentinela	Panamá, 1976
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Hamster sentinela	Panamá, 1976
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	<i>Lutzomyia spp.</i>	Panamá, 1975
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 1996
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 1998
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 1999
	<i>Punta Toro virus</i> (PTV)	Humano	Panamá, 2000
	<i>Cocle virus</i> (CCLV)	Humano	Panamá, 2009
Candirú	<i>Candiru virus</i> (CDUV)	Humano	Brasil, 1960
	<i>Nique virus</i> (NIQV)	<i>Lutzomyia panamensis</i>	Panamá, 1972
	<i>Alenquer virus</i> (ALEV)	Humano	Brasil, 1976
	<i>Turuna virus</i> (TUAV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Brasil, 1978
	<i>Oriximina virus</i> (ORXV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Brasil, 1980
	<i>Ariquemes virus</i> (ARQV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Brasil, 1988/1989
	<i>Serra Norte virus</i> (SRNV)	Humano	Brasil, 1991
	<i>Echarate virus</i> (ESCV)	Humano	Peru, 1998
<i>Maldonado virus</i> (MLOV)	Humano	Peru, 2004	

Em comum, os casos apresentaram sintomas como febre de início súbito, dores de cabeça, fraqueza, lombalgia, dor retro orbital, durante um período de 3 a 4 dias, semelhantes a febre dos flebotomos. Outros registros PTV foram isoladas nos anos seguintes em flebotômíneos *Lutzomyia trapidoi* e *Lu. ylephiletor* no Panamá e, na Colômbia. No Panamá houve outros registros posteriores de PTV em seres humanos entre os anos de 1992 a 2004 em amostras negativas de dengue e no ano de 2009 o vírus Cocle (*Cocle virus* – CCLV) foi isolado em condições similares.<sup>(30,51,52)</sup>

A espécie vírus Nique (*Nique virus* – NIQV) foi isolada de *Lu. panamensis* no Panamá e na Região Amazônica brasileira o vírus Candirú (*Candiru virus* – CDUV) foi isolado de seres humanos causando doença autolimitada, com duração variando de um a cinco dias, evidenciada por um início súbito, febre alta, cefaleia frontal, lombalgia, mialgias generalizadas, fotofobia e dor retro auricular<sup>(53,54)</sup>, tendo sido transmitido por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e com animal reservatório desconhecido. <sup>(54)</sup>

### Outros vírus transmitidos por flebotomíneos

A família *Rhabdoviridae* pertence à ordem *Mononegavirales* e compreende vírus de RNA de fita simples de senso negativo (Grupo V na Classificação de Baltimore), que geralmente possuem vírion envelopado, no formato de bala de revólver (Figura 12) ou baciliforme, mas podem conter filamentos não envelopados. Esses vírus já foram isolados de um amplo espectro de vertebrados, plantas e artrópodes e os do gênero *Vesiculovirus* (Tabela 3) estão associados a doenças de animais da pecuária e são capazes de transmitir doenças aos humanos. <sup>(32,55,56)</sup>

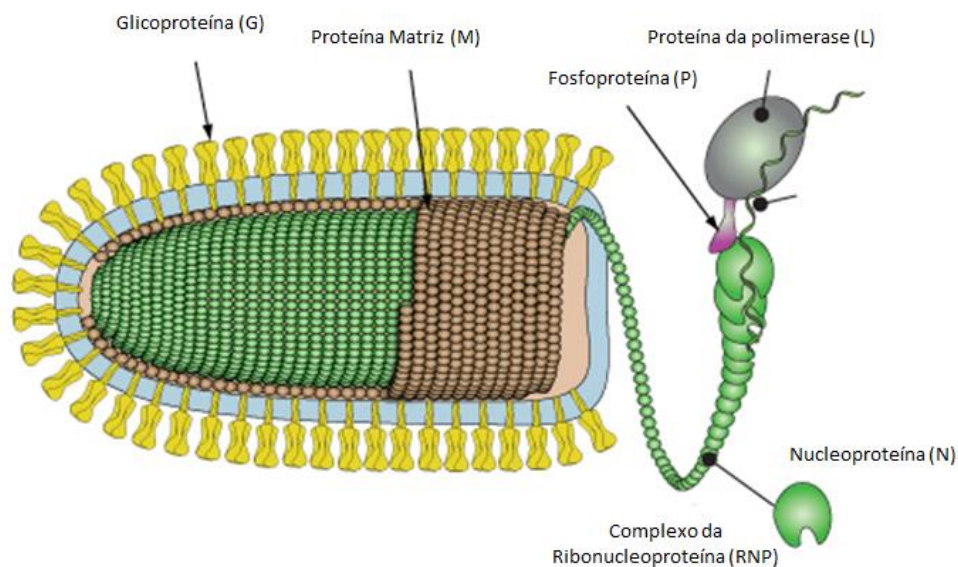


Figura 12: Vírion de *Vesiculovirus* (Adaptado de [viralzone.expasy.org/21?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/21?outline=all_by_species)).

Tabela 3: Vesiculovírus de flebotomíneos (Adaptado de Maroli et al 2012 e ICTV 2018).

Sorogrupo	Espécie	Origem do vírus	País / Ano	
Vírus da Estomatite Vesicular	<i>Vesicular Stomatitis Indiana virus</i> (VSIV)	Bovino	EUA, 1925	
	<i>Vesicular Stomatitis New Jersey virus</i> (VSNJV)	Bovino e equino	EUA, 1926	
	<i>Cocal virus</i>	Insetos e roedores	Brasil, 1964	
	<i>Vesicular Stomatitis Alagoas virus</i> (VSAV)	Equino, bovino e humano	Brasil, 1964	
	<i>Piry virus</i> (PIRYV)	Opossum	Brasil, 1973	
	<i>Calchaqui virus</i> (CQI)	Insetos e cavalos	Argentina, 1982	
	<i>Carajas virus</i> (CARV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Brasil, 1984	
	<i>Maraba virus</i> (MARV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Brasil, 1984	
	Chandipura	<i>Chandipura virus</i> (CHPV)	Humano	Índia, 1965
		<i>Chandipura virus</i> (CHPV)	<i>Phlebotomus sp.</i>	Índia, 1969
<i>Chandipura virus</i> (CHPV)		<i>Phlebotomus sp.</i>	Senegal, 1994	
<i>Chandipura virus</i> (CHPV)		<i>Atelerix spiculus</i>	Nigéria, 1966	

Os vírus da estomatite vesicular (VSV) do grupo da estomatite vesicular causam grandes prejuízos na área da pecuária infectando equinos, bovinos e suínos e eventualmente humanos, sendo endêmicos no Novo Mundo.<sup>(55)</sup> Dentre os sorotipos mais conhecidos estão o vesiculovírus Indiana (*Vesicular Stomatitis Indiana virus* – VSIV) e o vesiculovírus Nova Jérsei (*Vesicular Stomatitis New Jersey virus* – VSNJV).<sup>(32,57)</sup>

A infecção de animais por VSV pode resultar em vesiculação das mucosas e cascos, seguido por rupturas, lise de células epiteliais e severos edemas intersticiais que tem aparência de células inflamadas, resultando numa perda de produtividade com consequências econômicas, principalmente na América do Norte, onde a doença difunde-se nos meses de verão enquanto nas regiões tropicais do continente está associada entre as transições dos períodos chuvosos e secos.<sup>(58)</sup>

Em seres humanos com VSV foi registrado de síndromes febris de brandas até graves, sem letalidade. Em casos sintomáticos a pessoa apresenta febre alta e outros sintomas como mialgia, dores de cabeça e mal-estar. Os registros em humanos são escassos porque o mesmo infecta-se quando entra em contato direto ou por meio de fômites de animais infectados, estando, portanto, restrito a tratadores de animais e fazendeiros geralmente sem acesso direto a atendimento médico, e veterinários que cuidam dos animais doentes.<sup>(58,59)</sup>

Há evidências de transmissão biológica de VSV por outros artrópodes, mas os flebotomíneos são mais associados com a transmissão biológica de VSV, evidenciado pelo isolamento viral tanto a partir de machos, quanto de fêmeas coletadas em campo, e as espécies *Lu. trapidoi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. shannoni* são vetores desses vírus. No Brasil os vesiculovírus Marabá e Carajás foram isolados de *Lutzomyia sp.* e anticorpos neutralizantes do vírus Marabá foram detectados do soro humano. <sup>(59,60)</sup>

No Velho Mundo o vírus Chandipura (*Chandipura virus* – CHPV), outro VSV, mas do grupo Chandipura, foi isolado pela primeira vez na vila de Chandipura, estado de Maharashtra, Índia, no ano de 1965 em pacientes com síndrome febril. <sup>(55)</sup>

Esse vírus é endêmico na Índia, único local em que foram registrados casos em humanos e a partir dos anos 2000 provou-se altamente patogênico. No ano de 2003 num estudo investigativo sobre uma epidemia de encefalites agudas em crianças no estado de Andhra Pradesh, o CHPV foi isolado de pacientes com encefalites. <sup>(61)</sup>

No ano seguinte em uma epidemia no estado de Gujarat que apresentou um percentual de 78,3% de letalidade em crianças, o CHPV foi novamente associado. <sup>(62)</sup> O CHPV foi isolado primeiramente de mosquitos e posteriormente de *Phlebotomus spp.* Também foi detectado em *Sergentomyia sp.* na Índia e já foi isolado de flebotomíneos no Senegal e de um porco espinho (*Atelexis spiculus*) na Nigéria. <sup>(55,63)</sup>

Vírus do gênero *Orbivirus* (família *Reoviridae*) são vírus que possuem RNA de fita dupla (Grupo III na Classificação de Baltimore) e são replicados tanto em mamíferos quanto em artrópodes e têm importância em veterinária com distribuição global como o vírus da língua azul (*Blue tongue virus* – BTV), que é transmitido principalmente por *Culicoides sp.* <sup>(64)</sup> mas em condições laboratoriais já foi demonstrada a suscetibilidade de flebotomíneos *Lu. longipalpis* à infecção por esse vírus.

O sorogrupo Changuinola (Tabela 4) está associado com vetores artrópodes e mamíferos e foi registrado apenas na América Tropical com um registro de isolamento em humanos. <sup>(65,66)</sup> Na região amazônica brasileira foi isolado de flebotomíneos. <sup>(4)</sup>

Tabela 4: Orbivirus de flebotomíneos (Adaptado de Silva et al 2014 e ICTV 2018).

Sorogrupo	Espécie	Origem do vírus	País / Ano
Changuinola	<i>Changuinola virus</i> (CGLV)	<i>Lutzomyia sp.</i>	Panamá, 1960
	<i>Gurupi virus</i> (GURV)	<i>Phlebotominae spp.</i>	Brasil, 1961
	<i>Ourem virus</i> (OURV)	<i>Phlebotominae spp.</i>	Brasil, 1962
	<i>Canindé virus</i> (CANV)	<i>Phlebotominae spp.</i>	Brasil, 1963
	<i>Changuinola virus</i> (CGLV)	Humano	Panamá, 1966
	<i>Saraca virus</i> (SRAV)	<i>Phlebotominae spp.</i>	Brasil, 1980

### Ciclos de Transmissão de Vírus de Flebotomíneos

Para um arbovírus ser mantido na natureza é necessária a presença de um hospedeiro vertebrado suscetível e esse vírus ser capaz de ser replicado em artrópodes hematófagos, após o repasto sanguíneo. Alguns artrópodes são capazes de manter arbovírus sem a necessidade de um hospedeiro vertebrado, por transmissão vertical onde a fêmea vetor infectada transmite os vírus para seus descendentes (tanto machos, quanto fêmeas) e há também transmissão horizontal ou venérea, onde um macho infectado transmite para uma fêmea vetor no momento da cópula. <sup>(23,67)</sup>

Nos ciclos de transmissão de vírus em flebotomíneos (Figura 13) vírus do gênero *Phlebovirus* já tiveram a comprovação de transmissão vertical e horizontal ou venérea em *Ph. perniciosus* <sup>(68)</sup>, tendo sido isolado do morcego *Pipistrellus kuhli* <sup>(46)</sup>. Há indícios de que roedores selvagens (para o SFSV) e aves migratórias (para o TOSV) participem também dos ciclos de manutenção <sup>(45)</sup>.

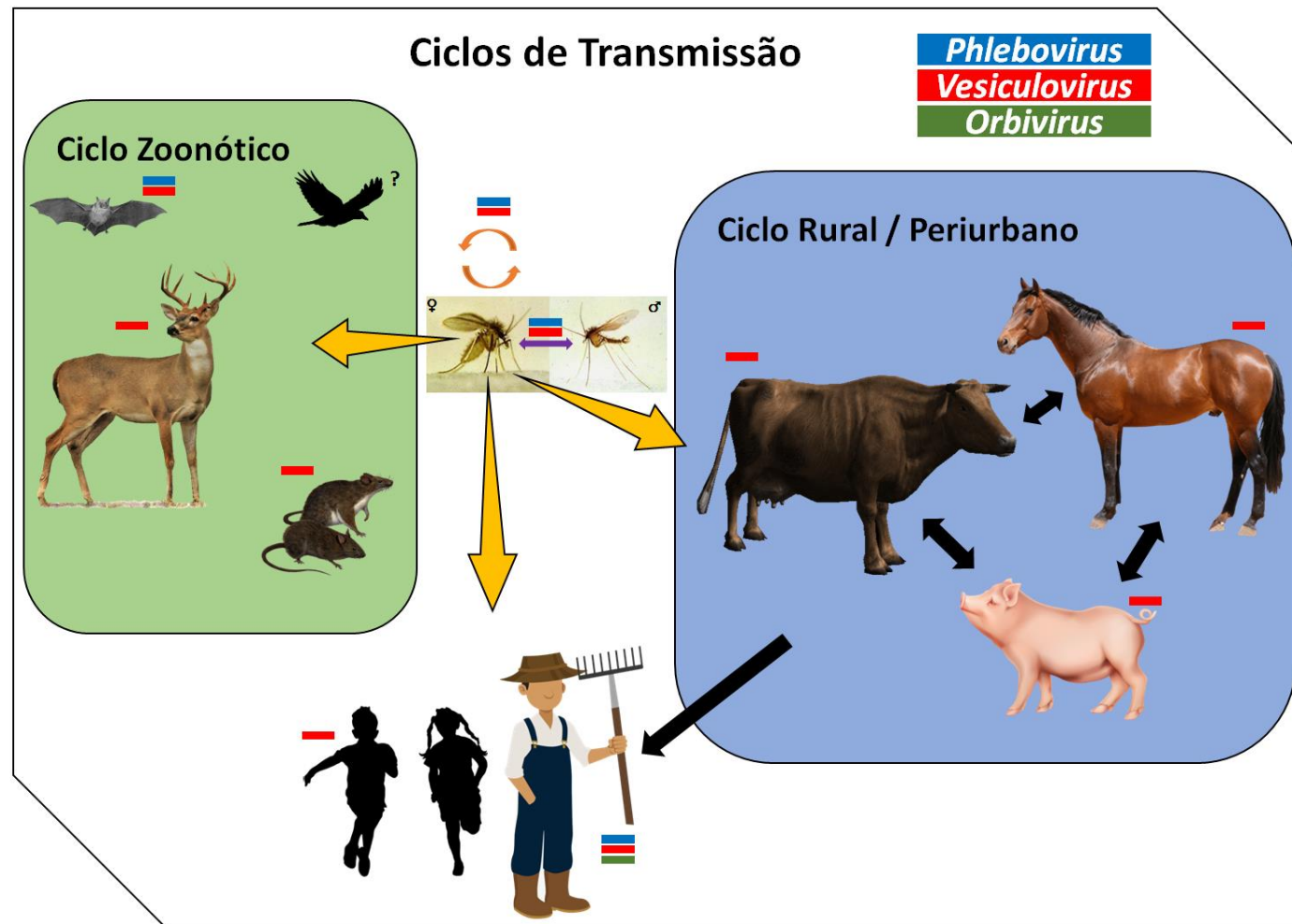


Figura 13: Ciclos de transmissão e exposição de seres humanos a vírus de flebotomíneos.

Há registros de rápida dispersão de vírus do gênero *Vesiculovirus* devido ao contato direto entre animais de pecuária, que quando infectados apresentam salivação excessiva e exsudatos de vesículas que facilmente contaminam o ambiente em que estão (Figura 14) <sup>(32,69)</sup>. Não há o consenso de um animal reservatório definitivo, porém, estudos apontam a participação de morcegos, primatas não humanos, veados e roedores como mantenedores de VSV na natureza (57,70).



Figura 14: Lesões causadas por infecção por VSV (Fonte: [cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=vesicular-stomatitis](http://cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=vesicular-stomatitis)) Acesso em 23/06/2019.

No ciclo rural periurbano os animais domésticos como suínos, bovinos e equinos servem como amplificadores e nesse caso a infecção humana acontece por contato direto ou fômites <sup>(58)</sup>. Flebotomíneos tornam-se infectados ao alimentar-se em lesões vesiculares e transmitem os vírus no repasto sanguíneo subsequente e são os únicos vetores de VSV com transmissão vertical comprovada em *Lu. shannoni* <sup>(32)</sup>.

Para CHPV, que é endêmico apenas na Índia, o *Ph. papatasi* em condições laboratoriais demonstrou-se competente tanto para transmissão vertical quanto venérea desse vírus <sup>(71)</sup> e não são conhecidos animais reservatórios.

Estudos apontam que apenas a manutenção em transmissão vertical e venérea talvez não sejam suficientes para a manutenção desses vírus na natureza indefinidamente, como por exemplo o aparente desaparecimento do VSV da ilha de Ossabaw (na Geórgia, EUA), baseado em resultados sorológicos negativos após a redução dos porcos selvagens da região <sup>(72)</sup>.

## JUSTIFICATIVA

A região Amazônica é a região com a maior biodiversidade do mundo, com áreas indígenas e zonas de preservação com mata prístina, o que oferece condições ideais para a ocorrência de arbovírus e outros vírus zoonóticos.

A região dispõe de uma gama de insetos e vertebrados com potenciais de vetores e reservatórios circulantes em áreas rurais e periurbanas, condições semelhantes às do Assentamento Rural de Rio Pardo, local onde foi realizada a pesquisa, que é uma área de pesquisa permanente do ILMD/Fiocruz Amazônia.

No estado do Amazonas encontram-se quase 50% da fauna brasileira de flebotomíneos. Os flebotomíneos são reconhecidamente importantes em saúde humana e veterinária por serem transmissores de protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, causador de uma das mais importantes doenças negligenciadas ao nível mundial.

Flebotomíneos têm sido encarados como vetores negligenciados de doenças virais, mesmo transmitindo arbovírus e outros vírus zoonóticos de importância médica e veterinária que afetam áreas urbanas, periurbanas e rurais, em sua maioria em populações em situações precárias de vida, normalmente associadas à pobreza.

Nos últimos anos diversos novos vírus têm sido detectados e isolados de flebotomíneos, inclusive em regiões onde nunca haviam sido registrados tais casos. Assim sendo, é possível que os flebotomíneos da região de Rio Pardo estejam mantendo um ciclo de transmissão de flebovirus ou outros vírus zoonóticos, eventualmente atingindo a população humana local e passando despercebido como outras doenças. Por este motivo, nos propusemos a identificar potenciais novos vírus de interesse humano em vetores deste gênero.



## **DESENVOLVIMENTO**

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Investigar a circulação de vírus em flebotomíneos de uma comunidade rural periurbana da Amazônia Central Brasileira e avaliar seu potencial de infecção a vertebrados.

#### **Objetivos específicos**

Isolar vírus de flebotomíneos em sistemas biológicos;

Detectar material genético viral em espécimes de flebotomíneos e em culturas celulares isoladas;

Caracterizar geneticamente os vírus isolados.

## MÉTODOS

### Aspectos éticos e legais da Pesquisa

Para a coleta de insetos o coorientador do projeto possui licença permanente SISBIO: N° 12186.

### Local de realização da pesquisa e população de interesse

O estudo foi realizado no assentamento rural de Rio Pardo ( $S0^{\circ}49'02.4''$   $W060^{\circ}19'03.6''$ ), que fica localizado no município de Presidente Figueiredo, 117 km ao norte de Manaus, com acesso pela rodovia BR 174, estado do Amazonas, Brasil. O assentamento foi criado em 1996 pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), compreende uma área de 27.980 hectares e é constituído por seis ramais de terra firme, não pavimentados: Ramal Principal, Ramal Maria Gusmão, Ramal Terra Preta, Ramal Samuel, Ramal Novo Paraíso e Ramal Taxista (Figura 15). <sup>(73)</sup>

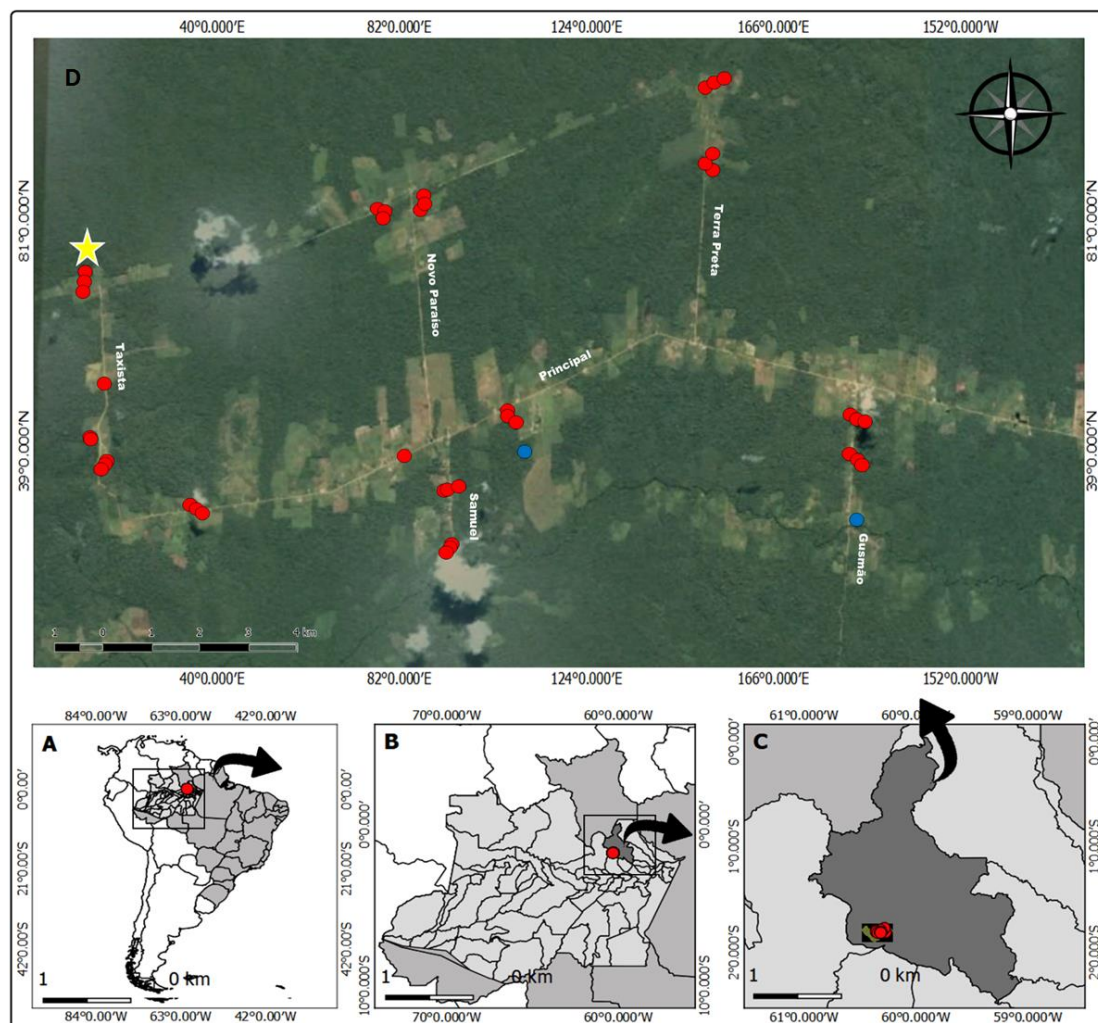


Figura 15: A) Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil, B) Mapa do Amazonas com destaque para Presidente Figueiredo, C) Mapa de Presidente Figueiredo, com destaque para Rio Pardo; D) Mapa de Rio Pardo, em vermelho e azul: locais de coleta.

As principais atividades econômicas da região são agricultura familiar que comercializam seus excedentes localmente e vendem para atravessadores que irão comercializá-los na capital amazonense, criação de bovinos para consumo próprio e mais recentemente criação de peixes. Dados do último senso realizado pelo Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD FIOCRUZ) em 2015 indicaram 584 moradores na comunidade.

A comunidade conta com uma escola municipal localizada no ramal Samuel e próximo dela um posto de saúde que conta com atendimentos básicos e visitas semanais de médicos para o atendimento da população local.

No assentamento rural de Rio Pardo ocorrem dois períodos climáticos distintos, sendo um período de verão chuvoso (novembro a maio) e um período seco (junho a outubro). Além disso, a comunidade é um local de pesquisa permanente de trabalho de campo da FIOCRUZ, que possui um Laboratório de Pesquisas Avançadas no local (Figura 16).



Figura 16: Laboratório de campo da ILMD/FIOCRUZ no assentamento rural de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. (Fonte: Acervo EDTA).

Os ambientes de floresta do Assentamento Rural de Rio Pardo geralmente são fragmentos, onde parte da mata original já não existe mais ou a floresta encontra-se muitos metros distante das residências, que estão próximas umas às outras (Figura 17).





Figura 17: Foto aérea de um trecho do Ramal Samuel, que conta com uma alta densidade populacional (Fonte: Acervo EDTA).

Há também o caso de ramais que estão interligados a florestas contínuas, como é o caso do Ramal Taxista, onde as residências ficam isoladas umas das outras, separadas por uma distância aproximada de 2km (Figura 18).





Figura 18: Foto aérea de um trecho do Ramal Taxista, que conta com baixa densidade populacional e áreas de floresta contínua (Fonte: Acervo EDTA).

### **Coletas**

Foram realizadas sete viagens para o assentamento rural de Rio Pardo entre os meses de outubro de 2017 a julho de 2018.

Foram realizadas coletas nos seis ramais da comunidade: Ramal Principal, Ramal Maria Gusmão, Ramal Terra Preta, Ramal Samuel, Ramal Novo Paraíso e Ramal Taxista utilizando armadilhas luminosas HP das 18h às 6h. Também foram realizadas aspirações mecânicas em base de árvore, no período da manhã.

Em um primeiro momento, compreendido entre os meses de outubro de 2017 a fevereiro de 2018, foram colocadas armadilhas luminosas tipo CDC em ambientes de Peridomicílio, Borda de Floresta e Floresta (Figura 19) e os locais onde foi observado a presença de flebotomíneos nas armadilhas luminosas foram selecionados como pontos amostrais. O Ramal Novo Paraíso não teve pontos com flebotomíneos coletados nesse período.



Figura 19: Ambientes em que foram colocadas as armadilhas luminosas tipo-CDC: a) Peridomicílio, b) Borda de floresta e c) Floresta (Fonte: Acervo EDTA).

No segundo momento, compreendido entre os meses de maio a julho de 2018 os demais pontos foram selecionados, inclusive das duas plataformas localizadas nos ramais Principal e Maria Gusmão (Figura 20). Para as aspirações em base de árvore foi utilizado como critério pontos onde foram relatados pelos moradores casos de leishmaniose, indicando a presença de flebotomíneos nos arredores.





Figura 20: Armadilha içada na plataforma do Ramal Gusmão (Fonte: Acervo EDTA).

Os flebotomíneos são animais sensíveis, que morrem com facilidade. Após capturados foram divididos em duas categorias: 1) Vivos e 2) Mortos, baseados no experimento de Remoli e colaboradores(74), onde os flebotomíneos vivos foram separados com auxílio de capturador, anestesiados em freezer a  $-20^{\circ}$  e transferidos ainda vivos para criotubos de acordo com data e local de coleta e então armazenados em botija de nitrogênio líquido onde permaneceram até o retorno ao ILMD, onde foram armazenados a  $-80^{\circ}$  até o processamento. Os indivíduos mortos foram armazenados em criotubos separados seguindo os mesmos critérios.

A possibilidade de isolar vírus de flebotomíneos aumenta quando os mesmos são congelados ainda vivos e mantidos em cadeia fria, porém, quando mortos apesar de dificilmente ser possível isolamento viral, ainda há a chance de detecção por meio de PCR

convencional, visto que os mesmos morreram há pouco tempo e não ficaram expostos a altas temperaturas.(74,75)

### Fluxograma de Atividades

As atividades foram organizadas em duas etapas distintas, o primeiro momento, que compreende as coletas de flebotomíneos em Rio Pardo e o segundo, que compreende os procedimentos laboratoriais e análise de dados (Figura 21).

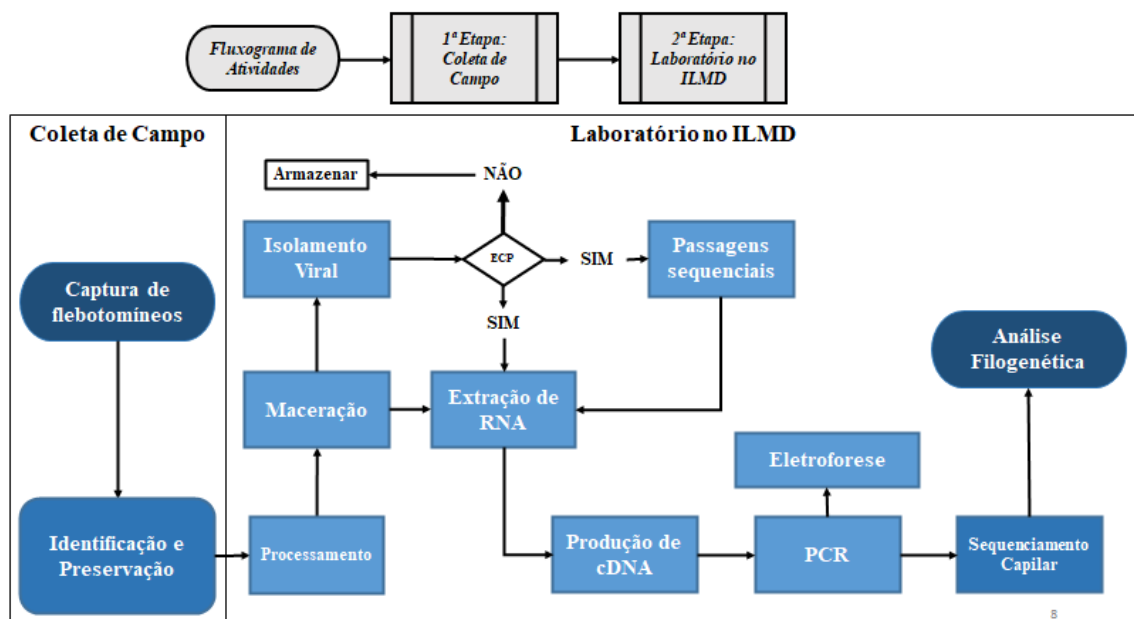


Figura 21: Fluxograma de atividades.

### Coleta de Campo: Captura, Identificação e Preservação de flebotomíneos

A primeira etapa compreendeu a captura dos flebotomíneos, que foram identificados e mantidos em cadeia fria, sendo preservados e transportados em botijão criogênico de N2 líquido para as instalações do Instituto Leônidas e Maria Deane em Manaus, onde foram armazenados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

### Processamento das amostras

Na segunda etapa, os procedimentos foram realizados nos laboratórios do ILMD. Os flebotomíneos congelados vivos, após retirados do ultrafreezer, ficaram acondicionados em isopor forrado com gelo seco mantido a uma temperatura aproximada de  $-50^{\circ}\text{C}$  (Figura22a). Eram então retirados individualmente para dissecação, sendo os machos devolvidos para o estoque. Parte do abdômen das fêmeas foi dissecada com



auxílio de estiletos entomológicos (Figuras 22b e 22c) em outro isopor forrado com gelo (feito com água destilada acrescida de álcool etílico hidratado 92,8 Inpm na proporção 1:1, congelado e mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  até uso), com temperatura no início do trabalho entre  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $-50^{\circ}\text{C}$  (Figura 22d).

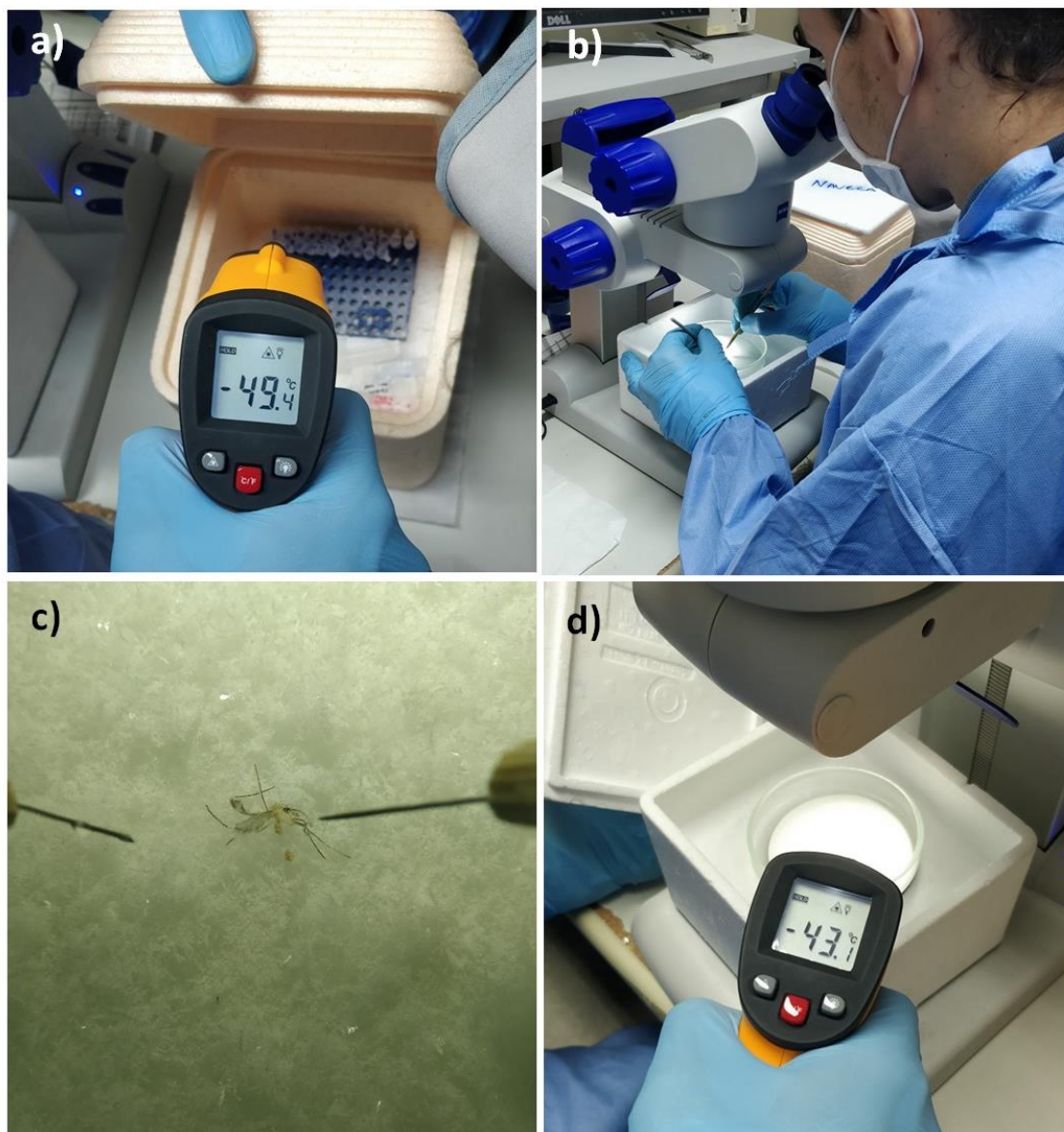


Figura 22: Dissecção em cadeia fria: a) Temperatura na caixa de gelo seco, b) Dissecção com estilete entomológico, c) Fêmea com parte do abdômen dissecado, d) Temperatura inicial na caixa de gelo de água destilada com álcool etílico. (Fonte: Acervo EDTA).

A temperatura da caixa de gelo caía gradativamente conforme o passar do tempo, mas era monitorada e sempre mantida abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar perda de material. Os corpos das fêmeas eram armazenados individualmente em tubos de 0,2mL, mantidos em gelo seco, ao término do processo foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a montagem de *pools*;

enquanto a parte do abdômen era transferida para outro tubo individual de 0,2mL contendo álcool etílico onde ficaram armazenadas em geladeira a 5°C até a etapa de clarificação.

A clarificação foi realizada em solução de Hidróxido de Potássio e montada em lâminas com fluido de Berlese. Todos os espécimes foram identificados por chaves taxonômicas <sup>(8)</sup>.

A nomenclatura taxonômica de Galati e colaboradores <sup>(4)</sup> foi utilizada com as abreviações genéricas propostas por Marcondes. <sup>(76)</sup>

### **Maceração**

As fêmeas de flebotomíneos foram organizadas em *pools* de 1 até 26 indivíduos, de acordo com data e local de coleta.

Após a separação, os *pools* foram macerados utilizando *beads* de aço inoxidável em 400µL de PBS pH 7,4 (*Phosphate Buffered Saline*, Gibco, cat.: 10010-031), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (Gibco, cat.: 12657-029) e 1% de solução Anti-Anti (100 U/mL de Penicilina, 100µg/mL de Estreptomicina e 0,25µg/mL de Anfotericina B, Gibco, cat.: 15240-096) e uma solução do bacteriófago MS2 diluída a 10<sup>-4</sup>.

Após este procedimento, dos macerados de flebotomíneos, foram utilizados 60µL para tentativa de isolamento viral em cultura de células VERO e C6/36 (30µL para cada) e o restante foi armazenado a -80°C.

### **Isolamento viral**

Como método de seleção, foram realizadas tentativas de Isolamento viral, onde foram utilizadas placas estéreis de 96 poços para cultivo celular para preparação e manutenção da monocamada celular, foram testadas duas linhagens celulares: VERO (células de rim de macaco verde africano: *Cercopithecus aethiops*) e C6/36 (glândula salivar de *Aedes albopictus*).

No preparo inicial das placas, em cada poço foi adicionado 200µL de meio MEM (VERO) ou L-15 (C6/36) suplementado com 1% de solução Anti-Anti e 10% de SFB, 48 horas antes do uso. No dia da inoculação, a monocamada foi lavada uma vez com 100µL de PBS 1X, após essa etapa foi acrescentado 30µL do inóculo para cobrir a monocamada do poço. Foi então levado à estufa (de 28°C para C6/36, de 37°C para VERO) para adsorção por uma hora. Uma nova lavagem adicionando foi realizada com

100µL de PBS 1X, por fim, foi acrescido 200µL do meio preparado inicialmente, enriquecido com 2% de SFB.

As células foram inoculadas em placas de 96 poços, 93 *pools* e mais 3 de controles negativos (MOCK), e ficaram em observação por 10 dias para verificar alterações morfológicas (efeito citopático – ECP).

Os *pools* que não apresentaram ECP foram armazenados a -80°C para futuros procedimentos; quanto aos que apresentaram ECP, seus respectivos macerados seguiram para as etapas seguintes.

### **Extração de RNA, produção de cDNA e PCR convencional**

O RNA total foi extraído de macerados de flebotomíneos utilizando a técnica do TRIzol conforme recomendação do fabricante gerando 40µL de RNA.

A partir do RNA extraído a síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima *Superscript IV*® em uma reação com volume final de 20µL, sendo adicionados 4µL da solução tampão (5X), 1µL de inibidor de RNase (40U/µL), 1µL de DTT (0,1M), 1µL de dNTP's (10mM), 4µL de água livre de nucleases, 1µL de Superase e 1µL da enzima *Superscript IV*® (200U/µL) (Invitrogen).

As reações foram realizadas com *random primers*, onde 1µL de *primer* (50ng/µL) foi adicionado juntamente com 7µL de RNA em um tubo de micro volume de 0,2mL e levado ao Termociclador (Proflex PCR Systems, Applied Biosystems) por 5 minutos a 65°C. Em seguida foi colocado no gelo por 2 minutos, acrescentado o restante do mix e levado ao termociclador na seguinte ciclagem: 25°C por 15 minutos, 37°C por 15 minutos, 45°C por 15 minutos, 50°C por 15 minutos e 70°C por 15 minutos e 4°C infinito.

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando *primers* gênero-específico para *Phlebovirus*, *Vesiculovirus*, CARV, CHPV e MARV<sup>(77)</sup>

As PCR's foram realizadas em um volume final de 25µL, com 2µL de cDNA e 23µL do mix de PCR, sendo 2,5µL de tampão 10X, 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM, 1,5µL a 5µM de cada *primer*, 0,5µL a 0,2µM de dNTP's (Invitrogen), 14,65µL de água livre de nucleases e 1U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Foi processada com a seguinte ciclagem: 2 minutos a 94°C, 40 ciclos, sendo 94°C por 30 segundos, 50°C por 30segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos a 72°C e 4°C infinito.

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2% corado com gel-Red.

## Sequenciamento e Análise Filogenética

Os amplificadores de PCR foram primeiramente purificados com Polietilenoglicol (PEG), que tem como objetivo a remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento.

O procedimento consiste primeiramente em transferir o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicionar um volume de PEG (20%) em um volume igual ao volume de PCR, foi então agitado suavemente em vórtex por 10 segundos e logo após incubado a 37°C por 15 minutos.

Após o período de incubação, foram então centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi descartado o sobrenadante e adicionado 125µL de etanol 80% gelado e em seguida será centrifugado a 4.500 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante foi descartado e foi deixado para secar a 37°C por 15 minutos para remoção de resíduos de etanol, com tampa aberta no SpeedVAC. Após a certificação da ausência de resíduos de etanol foi adicionado água livre de nuclease (no mesmo volume inicial da PCR), depois agitado em vórtex por 10 segundos e então foi deixado por aproximadamente de 1 a 2 horas a 45°C para uma melhor eluição do DNA e então armazenado a -20°C.

A reação de sequenciamento foi baseada no método de Sanger, onde as amostras foram submetidas à reação utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems).

Após o término foi realizada a purificação dos produtos na Plataforma do ILMD (RPT01H), por fim foi acrescentada a formamida Hi-Di (Thermo Fisher Scientific), sendo os produtos sequenciado no equipamento ABI 3130.

Todas as sequências de referências de flebovirus (Segmento genômico L) disponíveis no GenBank foram baixadas e alinhadas com o programa MEGA 7, utilizando o algoritmo MUSCLE otimizado para códons. Em seguida este dataset alinhado contendo 24 sequências (23 provenientes do GenBank e a amostra obtida neste estudo) foi submetido ao servidor <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/> para reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança utilizando o programa PhyML 3.0 em versão PhyML-SMS, a qual automatiza a escolha do melhor modelo evolutivo.

De acordo com o resultado do teste de AIC (*Akaike Information Criterion*), a árvore filogenética foi então reconstruída baseada no modelo GTR-G4 (*Gamma shape*

*parameter* = 0.414), com o suporte de cada clado avaliado pelo teste de aLRT (*approximate likelihood ratio test*). A árvore filogenética obtida foi então editada para melhor visualização das informações no programa FigTree v1.4.3, disponível gratuitamente em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo de sete viagens para o Assentamento rural de Rio Pardo foram capturados um total de 2.468 flebótomos, sendo 1.809 vivos (73,3%) e 659 mortos (26,7%). Em armadilhas luminosas tipo CDC foram capturados 2.102 flebotomíneos sendo 1.443 vivos (58,5% do total geral e 79,8% do total de vivos) e 659 mortos, e 366 em aspiração mecânica em base de árvores (todos vivos, 14,8% do total geral e 20,2% do total de vivos).

As identificações foram feitas baseadas apenas na morfologia da genitália das fêmeas, sendo assim, algumas espécies puderam ser identificadas, outras só puderam ser identificadas até gênero. Algumas espécies contam como fêmeas indistinguíveis e das fêmeas em que não foi possível realizar a identificação foi atribuída a nomenclatura apenas de seu gênero seguido do sufixo 'sp.' para onde não foi possível a identificação nem de gênero foram identificadas apenas como *Lutzomyia sp.*, num total de 244 indivíduos (24,6%).

Dentre os 1.809 flebotomíneos congelados vivos, foram identificadas 991 fêmeas (54,8% do total de vivos), abrangendo 34 das 52 espécies já conhecidas <sup>(78)</sup> da região. Das espécies identificadas o gênero mais abundante foi *Nyssomyia* (Barreto) com 5 espécies e 273 indivíduos (27,5% do total de fêmeas vivas), seguido por *Psychodopygus* (Mangabeira) com 4 espécies e 151 indivíduos (15,2%) e a terceiro foi *Trichoforomyia* (Barreto) com 2 espécies e 86 indivíduos (8,7%). O gênero menos abundante foi o *Brumptomyia*, com apenas 1 indivíduo (0,1%). Ramos e colaboradores <sup>(78)</sup> identificaram 6 espécies e 1.659 indivíduos de *Nyssomyia*, seguido por 7 espécies e 313 indivíduos de *Psychodopygus* e 7 espécies e 313 indivíduos de *Evandromyia* (Mangabeira), como gêneros mais abundantes.

As espécies mais abundantes de nosso estudo foram *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha) com 160 indivíduos (16,1%) que foi capturado principalmente em ambiente de floresta (117 dos 160), seguida por *Trichoforomyia ubiquitalis* (Mangabeira) com 79 indivíduos (7,97%), *Psychodopygus davisii* (Root) com 50 indivíduos (5%) e *Micropygomyia rorotaensis* (Young & Porter) com 48 indivíduos (4,8%) (Tabela 5). Em Ramos e colaboradores <sup>(78)</sup>, a espécie mais abundante foi *Nyssomyia antunesi* (Coutinho) com 389 indivíduos capturados, seguida por *Nyssomyia umbratilis* (Ward e Fraiha), com 389 indivíduos e *Micropygomyia rorotaensis* (Young & Porter) com 50 indivíduos.

Tabela 5: Espécies de flebotomíneos por locais de coleta.

Espécies	Ambientes			Total	%
	Peridomicílio	Borda	Floresta		
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i>	5	6	17	28	2,83
<i>Bichromomyia olmeca nociva</i>	0	2	13	15	1,51
<i>Bichromomyia reducta</i>	2	4	7	13	1,31
<i>Bichromomyia sp.</i>	11	3	4	18	1,82
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	1	1	0,10
<i>Evandromyia monstrosa</i>	0	0	5	5	0,50
<i>Evandromyia apinottii</i>	0	1	3	4	0,40
<i>Evandromyia sericea</i>	3	2	23	28	2,83
<i>Evandromyia sp.</i>	0	0	5	5	0,50
<i>Evandromyia walkeri</i>	4	3	8	15	1,51
<i>Evandromyia williamsi</i>	0	2	1	3	0,30
<i>Lutzomyia sp.</i>	63	34	147	244	24,62
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	4	15	29	48	4,84
<i>Nyssomyia anduzei</i>	14	2	15	31	3,13
<i>Nyssomyia antunesi</i>	14	1	10	25	2,52
<i>Nyssomyia sp.</i>	22	5	28	55	5,55
<i>Nyssomyia umbratilis</i>	25	18	117	160	16,15
<i>Nyssomyia yuilli yuilli</i>	1	0	1	2	0,20
<i>Pressatia choti</i>	0	1	1	2	0,20
<i>Pressatia sp.</i>	1	2	0	3	0,30
<i>Psathyromyia dreisbachi</i>	0	1	0	1	0,10
<i>Psathyromyia sp.</i>	3	5	10	18	1,82
<i>Psychodopygus chagasi</i>	0	1	1	2	0,20
<i>Psychodopygus davisi</i>	3	3	44	50	5,05
<i>Psychodopygus hirsutus</i>	1	0	3	4	0,40
<i>Psychodopygus sp.</i>	13	12	71	96	9,69
<i>Sciopemyia nematoducta</i>	1	1	3	5	0,50
<i>Sciopemyia perclara</i>	0	0	2	2	0,20
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	6	6	0,61
<i>Trichoforomyia sp.</i>	0	2	8	10	1,01
<i>Trichoforomyia ubiquitalis</i>	4	21	51	76	7,67
<i>Trichopygomyia sp.</i>	0	1	3	4	0,40
<i>Viannamyia furcata</i>	0	4	7	11	1,11
<i>Viannamyia tuberculata</i>	0	0	1	1	0,10
<b>Total</b>	<b>194 (19,58%)</b>	<b>152 (15,34%)</b>	<b>645 (65,08%)</b>	<b>991</b>	<b>100</b>

Os flebotomíneos identificados foram organizados em *pools*, gerando 460 *pools* contendo de 1 a 26 indivíduos seguindo critérios como data e local de coleta e foram nomeados com a sigla AF-RPFV (de Arbovírus em Flebotomíneos – Rio Pardo Fêmeas Vivas).

Tentativas de isolamento viral a princípio eram feitas unicamente em animais de laboratório como macacos, camundongos e ovos embrionados, e no início da década de 1950 culturas celulares passaram a ser utilizadas em estudos de vírus, o que facilitou o monitoramento da presença de vírus por meio da observação de alterações morfológicas na conformação das células (ECP)<sup>(79)</sup>.

As inoculações em animais foram sendo abandonadas e substituídas ao longo dos anos por culturas celulares em sua maioria por razões éticas. Para isolamento de vírus de flebotomíneos são utilizados tanto homogenizados de *pools* de flebotomos quanto insetos individuais. A célula mais utilizada nesses estudos é a VERO, porque *Phlebovirus* de flebotomíneos não replicam em culturas de célula C6/36<sup>(75)</sup>, porém em 2015 foi realizado o primeiro isolamento de *Flavivirus* em flebotomos, no Equador fazendo uso de C6/36<sup>(80)</sup>.

Outras culturas de células também utilizadas que já tem replicação comprovada na literatura são as LLC-MK2 (de rim de *Macaca mulata*) e BHK-21 (de fibroblasto de rim de *Mesocricetus auratus*), porém, não é comum o uso dessas linhagens em estudos recentes de *Phlebovirus*<sup>(75)</sup>.

O isolamento viral em culturas de células VERO e C6/36 foi utilizado nesse estudo como método seletivo, onde as amostras que apresentaram resultado sugestivo de ECP foram selecionadas para os demais procedimentos.

Foram realizadas tentativas de isolamento viral em culturas de células VERO e C6/36, que foram acompanhadas diariamente e as amostras que apresentaram resultado sugestivo de efeito citopático (ECP) tiveram sobrenadante recolhido. Um total de 35 inóculos distintos (4,6% do total geral) apresentaram uma morfologia sugestiva de ECP, onde 21 apresentaram ECP apenas em VERO (2,74%), 11 apenas em C6/36 (1,44%) e 3 *pools* apresentaram ECP em ambas as células (0,39%).

Das 14 amostras que apresentaram resultado sugestivo de ECP em células C6/36, 3 apresentaram alterações morfológicas características das que são causadas por infecção viral, como vacúolos e sincícios (Figura 23).



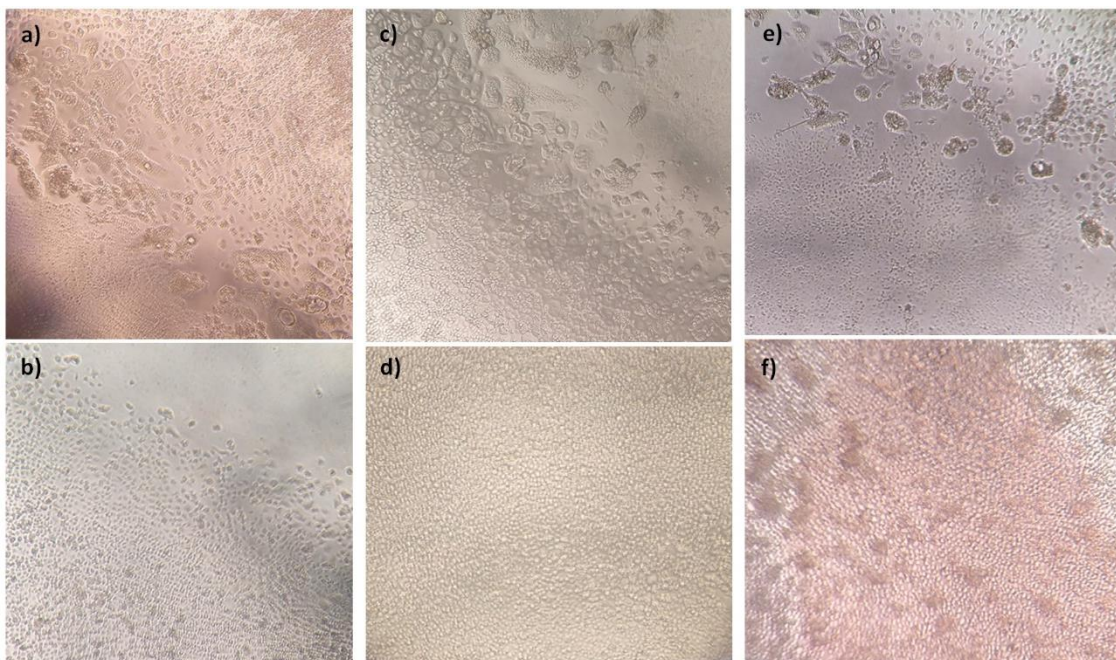


Figura 23: Sugestivo de ECP em células C6/36: a) Amostra AF-RPFV 179 96h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 179 no mesmo período, c) Amostra AF-RPFV 186 144h p.i., d) Mock da AF-RPFV 186, e) Amostra AF-RPFV 349 120h p.i., f) Mock da AF-RPFV 349 (Fonte: este estudo).

Das tentativas de isolamento em células VERO os resultados foram sugestivos, por exemplo com a presença de células picnóticas (Figura 24).

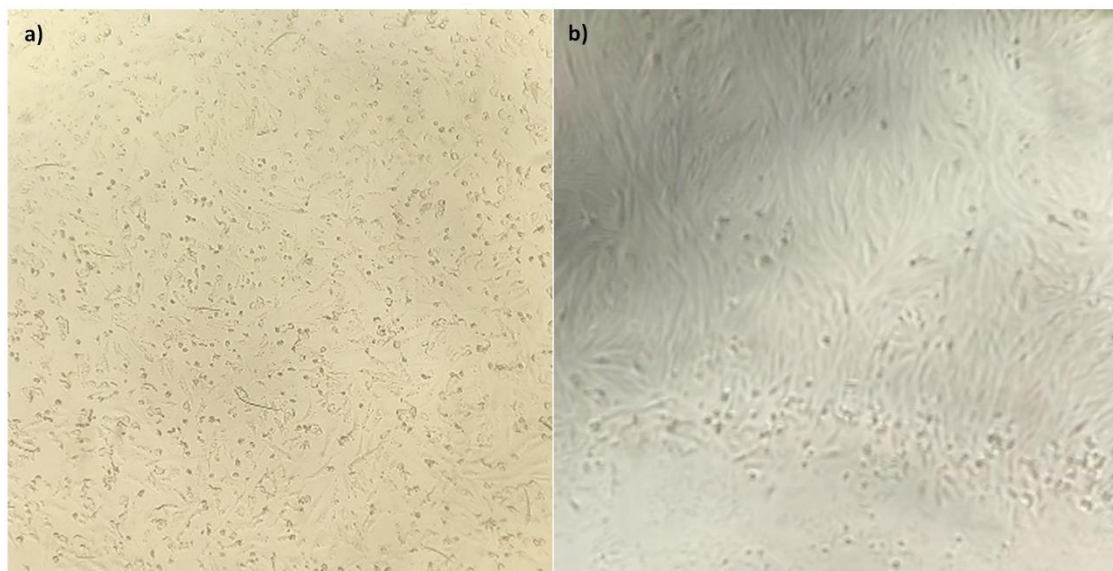


Figura 24: Imagem sugestiva de efeito citopático em células VERO: a) Amostra AF-RPFV 109 96h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 109 no mesmo período (Fonte: este estudo).

Os *pools* que apresentaram resultado sugestivo de ECP em VERO e C6/36 foram novamente inoculados em frasco de culturas individuais. Primeiramente foram escolhidas as amostras que apresentaram sugestivo de ECP em ambas as células, acrescido de mais uma escolhida baseada no ECP observado e um MOCK (controle negativo), totalizando cinco frascos de cultura (T-25) de cada célula.

Em um período de 24 horas após a infecção uma amostra apresentou ECP (AF-RPFV 43 de C6/36) (Figura 25). O frasco de cultura contendo células VERO da mesma amostra não apresentou ECP. Todavia, uma bactéria foi confirmada quando o frasco foi observado em microscópio óptico invertido. Surgiu a suspeita de tratar-se de uma bactéria resistente aos antibióticos, pois os flebotomíneos foram macerados em meio contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina.

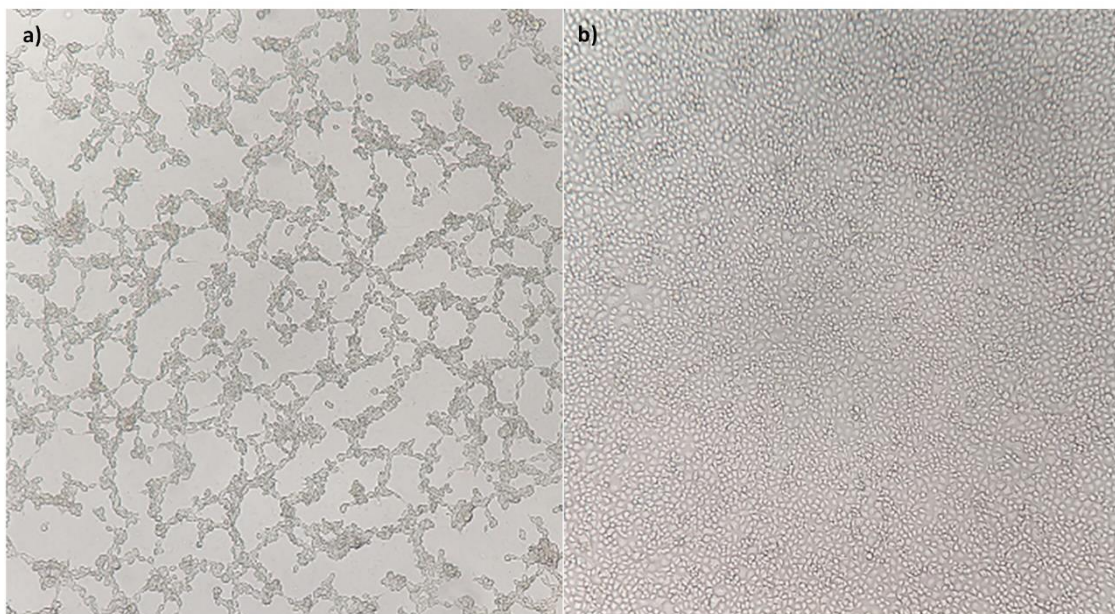


Figura 25: ECP na garrafinha de C6/36 em um aumento de 10x: a) Amostra AF-RPFV 43 24 h p.i., b) Mock da amostra AF-RPFV 43 no mesmo período (Fonte: este estudo).

Na segunda passagem (#2) foi observado ECP no frasco de cultura da amostra AF-RPFV 179 de VERO (Figura 26), inicialmente foi observado desprendimento da monocamada às 168 horas pós infecção, 24 horas após esse período foi observado que o ECP aumentou, restando apenas poucas células aderidas à monocamada ao passo que o Mock se manteve inalterado.



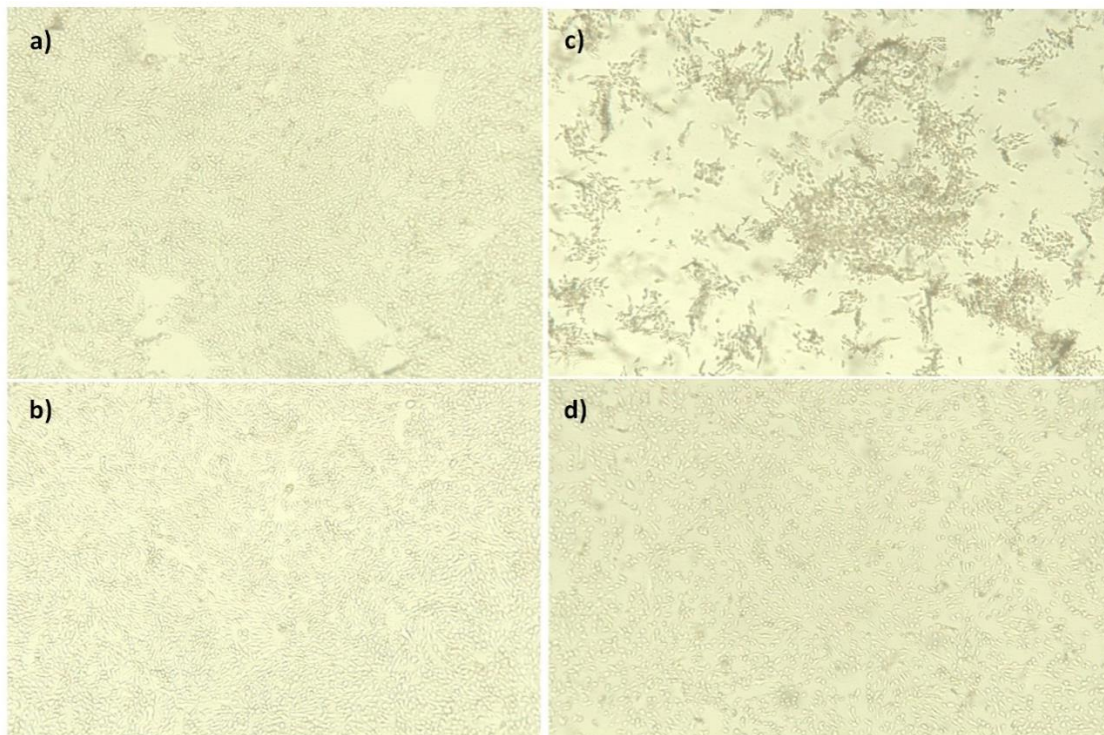


Figura 26: ECP em frasco do pool AF-RPFV 179 em VERO (5X): a) 168h p.i.: desprendimento da monocamada, b) Mock no mesmo período, c) 192h p.i.: desprendimento quase total da monocamada com poucas células permanecendo aderidas d) Mock manteve-se estável.

As passagens cegas continuaram até a quinta passagem (#5), porém nenhum outro efeito foi observado. Para maior celeridade, este método de tentativa de isolamento em frascos de cultura foi descontinuado, sendo substituído por placas de 24 poços.

### **Bactéria *Stenotrophomonas maltophilia***

O pool AF-RPFV 43 continha 8 fêmeas de *Nyssomyia* sp. que foram capturados no ambiente de floresta no Ramal Taxista, no ponto S01°47'23.4", W060°21'33.8". Na primeira tentativa de isolamento viral, apresentou efeito inespecífico tanto em VERO, quanto em C6/36. No reinóculo foi confirmado ECP em C6/36 (Figura 25), com presença de bactérias no sobrenadante. Em VERO não apresentou ECP, porém em microscopia foi confirmada a presença de bactérias.

Os sobrenadantes dos frascos da amostra AF-RPFV 43 foram separados para testes microbiológicos. Inicialmente foram semeados em Caldo Triptona Soja (TSB), que é um meio não seletivo utilizado para o crescimento ou manutenção de microrganismos.

Primeiramente foi colocado a 37°C sem registro de crescimento satisfatório. Foi pesquisado na literatura sobre temperaturas de crescimento bacteriano<sup>(81)</sup> e foi novamente tentado, dessa vez em Ágar Sangue (Figura 26a) tanto a 37°C quanto a 30°C. Após 48

horas foi observado crescimento a 30°C (Figura 27), com pouco crescimento a 37°C. Levantou-se a suspeita de que a temperatura de crescimento ideal para a bactéria seria de 30°C.

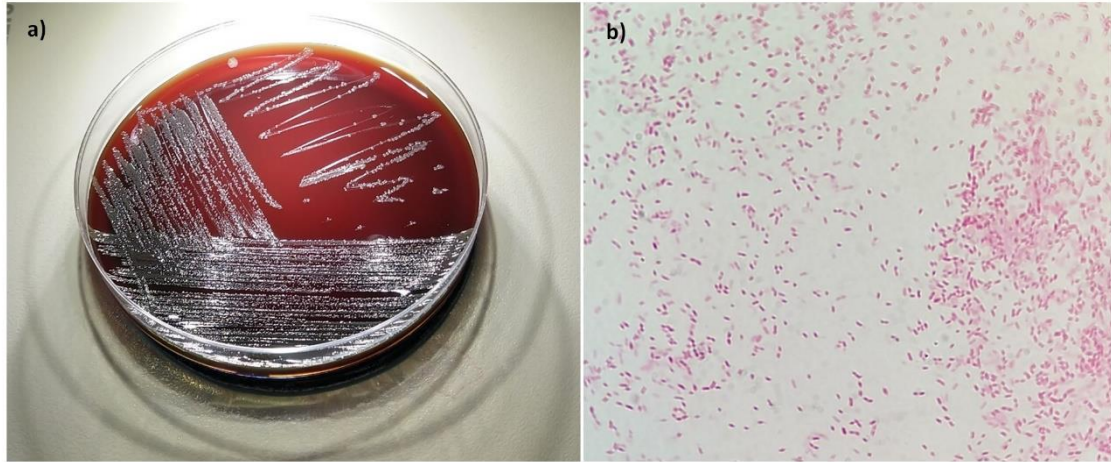


Figura 27: a) Cultivo da bactéria em ágar sangue, b) Resultado da coloração de Gram.

Foi realizado um teste de coloração de Gram, confirmando tratar-se de uma bactéria Gram-negativa (Figura 26b). A partir desse ponto a bactéria foi purificada e testada pelo teste colorimétrico *BBL Crystal Identification Systems* (Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA) conforme recomendação do fabricante. O resultado dos testes bioquímicos foi para a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*.

Foi então realizado um teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão a 30°C e 37°C. Após 48 horas a 37°C a bactéria apresentou resistência a diversos antibióticos, apresentando sensibilidade apenas para os aminoglicosídeos Amicacina e Tobramicina (Figura 28), enquanto a 30° demonstrou resistência a todos os antibióticos.

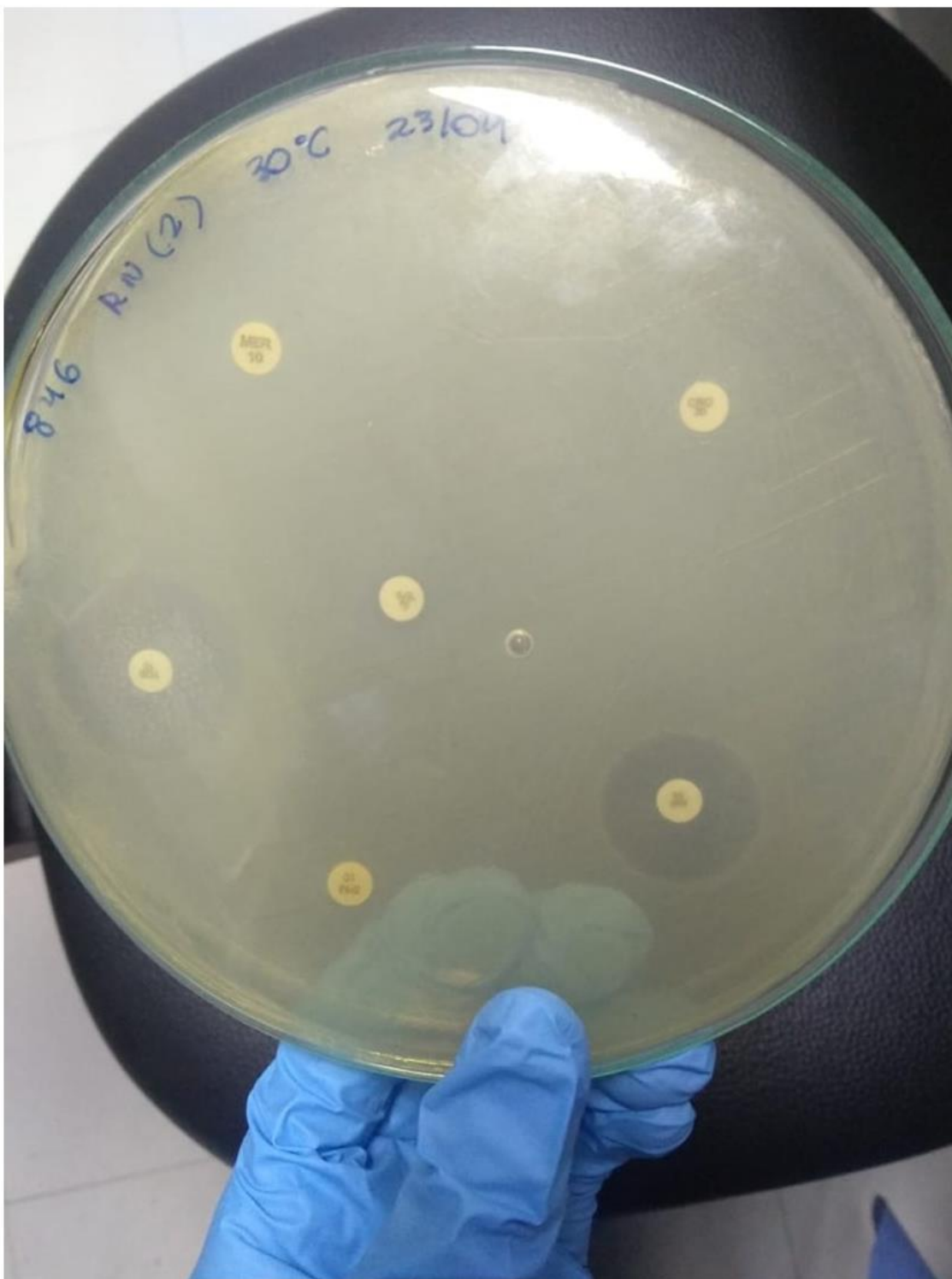


Figura 28: Sensibilidade da bactéria em teste de disco-difusão a 37°C aos antibióticos Amicacina e Tobramicina.

O Teste foi repetido, com a única diferença de que não foi utilizada novamente a Amicacina que terminou e não teve como ser reposta. Foram utilizados 9 antibióticos (Tabela 6) e foram testadas também outras bactérias para servir de controle. Novamente

os resultados repetiram-se (Figura 29), com sensibilidade apenas para Tobramicina, indicando ser uma bactéria multirresistente.

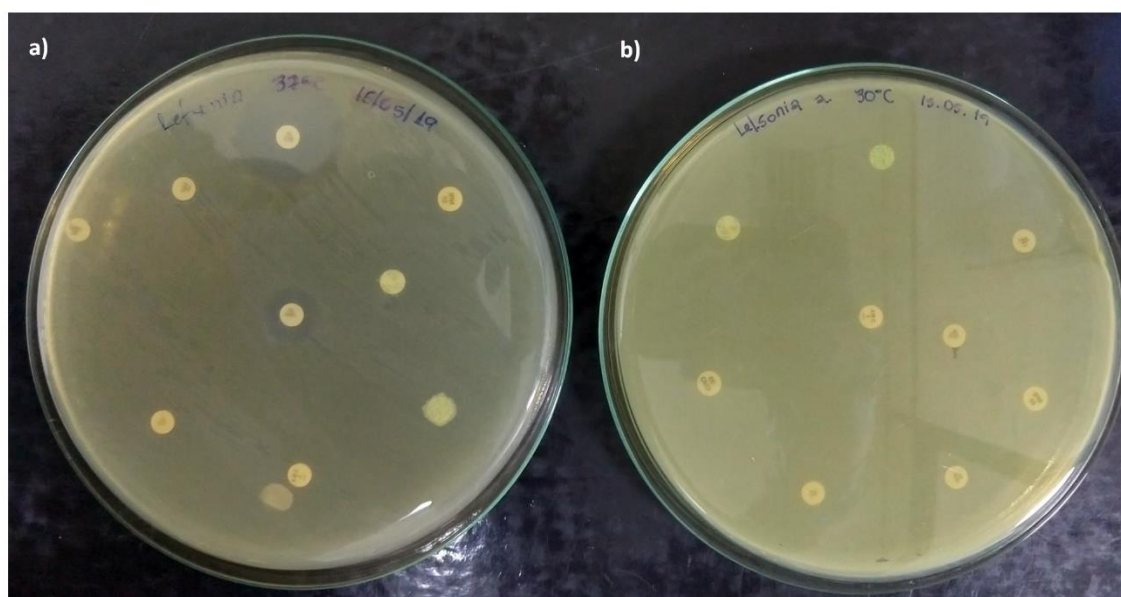


Figura 29: Sensibilidade da bactéria em teste de disco-difusão: a) a 37°C aos antibióticos Tobramicina, b) Resistência a todos os antibióticos a 30°C.

Tabela 6: Antibióticos testados no disco difusão.

Antibiótico	Família	Resistência
Ceftriaxona	Cefalosporina	Sim
Cefalotina	Cefalosporina	Sim
Imipenem	Beta-lactâmico	Sim
Ceftazidima	Beta-lactâmico	Sim
Tobramicina	Aminoglicosídeos	Não
Cefotaxime	Cefalosporina	Sim
Piperacilina + Tazobactam	Beta-lactâmico	Sim
Amoxicilina	Penicilina	Sim
Vancomicina	Glicopeptídeos	Sim

Após essa etapa foi passado para os procedimentos de biologia molecular onde a bactéria teve seu DNA extraído, então foi feito uso de PCR convencional para o gene que codifica o RNA 16S, seguido para reação de sequenciamento pelo Método de Sanger, que confirmou realmente tratar-se de uma bactéria do gênero *Stenotrophomonas sp.* É o



primeiro registro no estado do Amazonas da presença da bactéria *S. maltophilia* em flebotomíneos.

A partir do Sequenciamento Shotgun, em primeira montagem, obtivemos mais de 80% do genoma da bactéria. Utilizamos a ferramenta KmerFinder-3.1 que mostrou que as seqüências correspondem a *Stenotrophomonas maltophilia* e a maior proximidade foi a *S. maltophilia* cepa ISMMS3.

Após a confirmação da espécie fizemos o MLST 2.0 (*Multilocus Sequence Typing*) que é um procedimento para caracterização de isolados bacterianos <sup>(82)</sup> e como resultado foi obtido um ST (*Sequence Type*) desconhecido, apresentando uma combinação de genes que nunca havia sido encontrada (Figura 30).

**MLST-2.0 Server - Results**

mst Profile: *smaltophilia*

Organism: *Stenotrophomonas maltophilia*

Sequence Type: *Unknown*

Nearest STs: 40,280,259,335,171,79,207

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
atpD	100	100	531	531	0	atpD_26
gapA	99.8208	100	558	558	0	gapA_116*
guaA	99.2754	100	552	552	0	guaA_12*
mutM	98.4946	100	465	465	0	mutM_101*
nuoD	100	100	444	444	0	nuoD_3
ppsA	98.783	99.596	493	495	0	ppsA_71?*
recA	99.6337	100	546	546	0	recA_11*

Notes: \*? alleles with less than 100% identity and 100% coverages found

\* **mutM**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

\* **gapA**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

\* **recA**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

?\* **ppsA**: Imperfect hit, ST can not be trusted!

\* **guaA**: Novel allele, ST may indicate nearest ST.

Figura 30: Resultado do MLST-2.0 de *S. maltophilia*: Foram identificados dois alelos conhecidos (atpD e nuoD), quatro alelos novos (mutM, gapA, recA e guaA) e um hit imperfeito.

A bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* está classificada taxonomicamente como pertencente ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadaceae, gênero *Stenotrophomonas*, e é uma bactéria aeróbica, não-fermentativa e Gram-negativa (Figura 31).

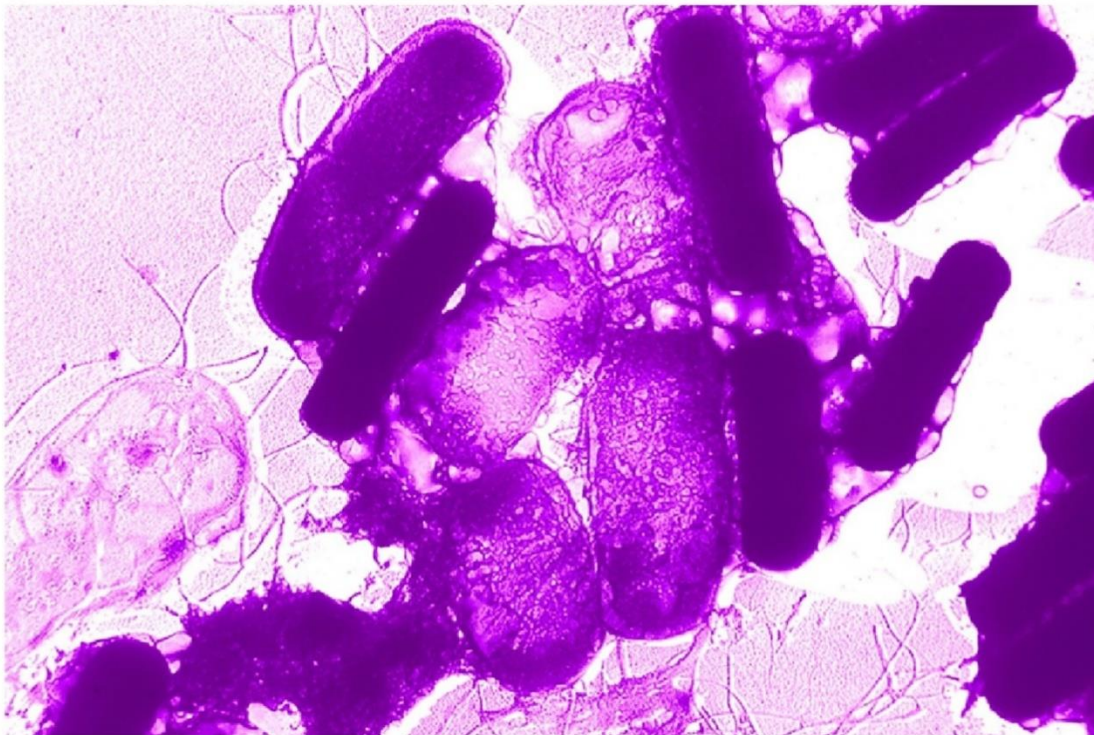


Figura 31: *Stenotrophomonas maltophilia* (Fonte: *Trends in Microbiology* 2018 26, 637-638DOI: (10.1016/j.tim.2018.04.006). Acesso em 17/06/2019.

É uma espécie de bactéria cosmopolita que já foi isolada de diversos ambientes, estando presentes principalmente em plantas na natureza, fazendo parte de seu microbioma, apesar dessa sua relação com plantas ainda ter sido pouco estudada, sabe-se que ela é capaz de realizar transmissão vertical (via sementes) e atuar com atividade de controle biológico <sup>(83)</sup>.

Apresenta uma alta diversidade e taxa de mutação e capacidade de produção de biofilme e é considerado um patógeno oportunista, com cepas patogênicas com taxa de mutação superiores às das ambientais causando quadros de infecções urinárias, infecções do trato respiratório (inclusive pneumonia com fibrose cística), endocardites, e septicemia em pacientes imunocomprometidos e infecções nosocomiais com altos índices de letalidade <sup>(84,85)</sup>. Isolados clínicos de *S. maltophilia* apresentam pouca sensibilidade à maioria dos antibióticos, inclusive as carbapenemas <sup>(86)</sup>.

Flebotomíneos são expostos a uma gama de microrganismos que se inicia no estado larval, onde irão alimentar-se em detritos de serapilheira e fezes de animais. Alguns microrganismos conseguem manter-se na microbiota intestinal do flebotomíneo, porém a maioria deles perdem-se durante o estágio de pupa, mas os microrganismos que sobreviverem poderão colonizar o intestino do adulto <sup>(87)</sup>.



Nos hábitos alimentares, a fêmea faz repasto sanguíneo que geralmente é estéril, mas tanto machos quanto fêmeas buscam alimentar-se de carboidratos, seja em secreções de afídeos, seja em plantas, o que acarreta na ingestão da microbiota da planta, que pode conter microrganismos contaminantes, o que pode resultar tanto numa infestação estável do flebótomo pelo microrganismo, quanto matar o flebotomíneo<sup>(88)</sup>.

Alguns estudos têm como foco a análise da microbiota intestinal de flebotomíneos, e geralmente direcionado às bactérias cultiváveis. Gouveia<sup>(89)</sup> analisou bactérias cultiváveis associadas à *Lu. longipalpis* em duas áreas endêmicas para Leishmaniose visceral e utilizaram uma metodologia semelhante à que utilizamos, passando por enriquecimento a 37°C e 30°C e identificação dos isolados pela análise das sequências do gene para o RNA 16S. A bactéria *S. maltophilia* foi a única em comum entre todas as populações de *Lu. longipalpis* analisadas.

Oliveira e colaboradores<sup>(90)</sup> fizeram um estudo da prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas em campo (Gruta da Lapinha, Lagoa Santa, Minas Gerais). Os tratos digestivos dos flebotomíneos foram reunidos em *pools* e semeados em meio para enriquecimento a 37°C, passado por método de Gram, métodos bioquímicos e Sistema de Identificação de Fermentadores e Não Fermentadores Crystal (BBL) e a *S. maltophilia* foi a terceira mais prevalente, isolada de 9% das amostras.

Bactérias provenientes de fontes ambientais como a *S. maltophilia* já foram isoladas de outros dípteros<sup>(91-93)</sup>, o que sugere que fazem parte de sua flora microbiana natural ou transitória. Não há registro de transmissão biológica de *S. maltophilia* por vetores artrópodes, ou registros de infecção sistêmica ou da glândula salivar em flebotomíneos.

Quanto à transmissão mecânica foi registrado na Alemanha em 2001 que infestações da mosca *Polleniarudis* (Diptera: Calliphoridae) podem resultar em transmissões mecânicas de *S. maltophilia* e outras bactérias especialmente em hospitais<sup>(94)</sup>. Em 2013 a *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) foi identificado como potencial vetor mecânico de patógenos bacterianos como a *S. maltophilia* em ambientes hospitalares.<sup>(95)</sup>

Não há registro de invasão sistêmica ou da glândula salivar de flebotomíneos por *S. maltophilia*.

### *Phlebovirus*

Do macerado original das outras 34 amostras foi realizada Extração de Ácido Ribonucleico (RNA viral) seguido de produção de Ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) e então foram testadas para vírus dos gêneros *Phlebovirus* e *Vesiculovirus* por meio de PCR's convencionais utilizando *primers* genéricos.

Da primeira PCR não apareceram fragmentos sugestivos de positividade em nenhuma amostra e foi feita uma segunda PCR (reamplificação) utilizando os mesmos *primers*. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo visualizados fragmentos em dois *pools* (AF-RPFV 44 e AF-RPFV 339), um deles na altura de aproximadamente 500 pares de base (tamanho esperado), sugerindo positividade para *Phlebovirus* (Figura 32).

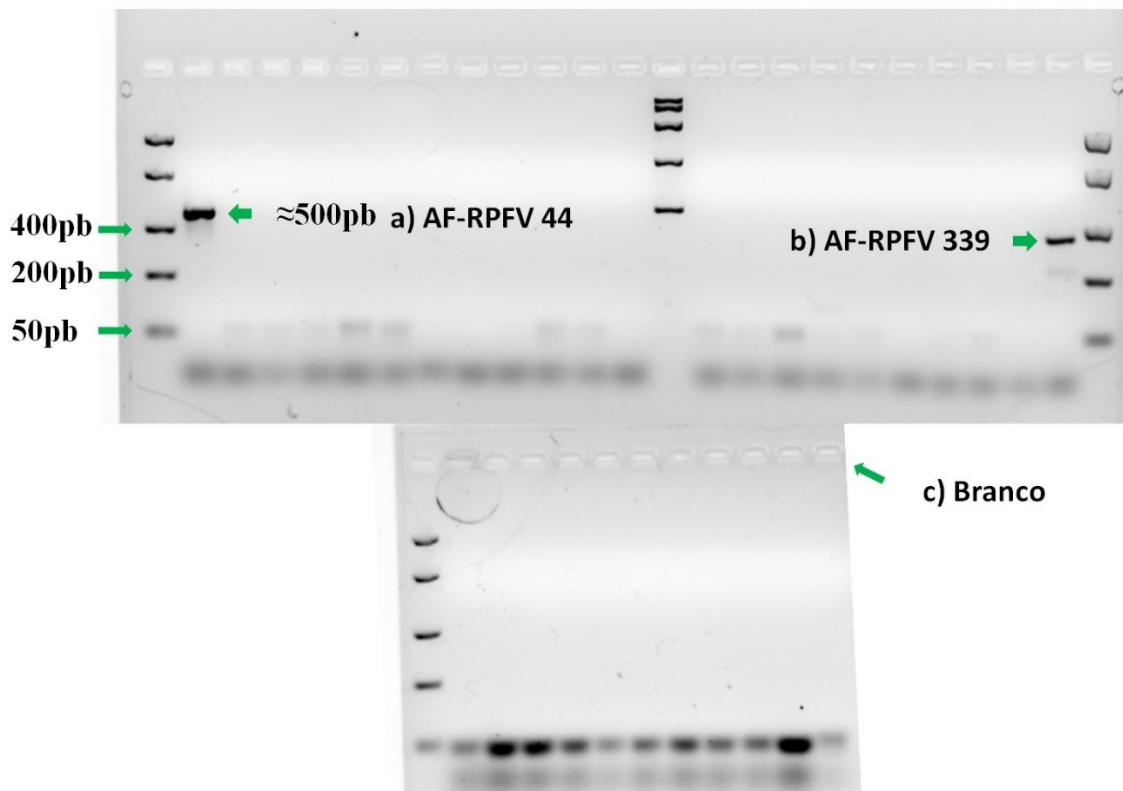


Figura 32:Resultado da EGA: a) Pool AF-RPFV 44, b) Pool AF-RPFV 339, c) Branco.

As duas amostras seguiram para reação de sequenciamento capilar pelo método de Sanger. A amostra AF-RPFV 44, que continha 14 fêmeas de *Lutzomyia sp.* confirmou *Phlebovirus*, que em análise de sequenciamento apresentou suporte elevado com o vírus Uriurana (*Uriurana virus* - URIV), que é um vírus não agrupado em complexo sorológico

que foi originalmente isolado de *Phlebotominae sp.* no ano de 1985 em Tucuruí, estado do Pará, Brasil <sup>(96)</sup>, a 1.165km de distância em linha reta de Presidente Figueiredo.

A reconstrução filogenética da amostra AF\_RPFV\_44\_2019 (Figura 33) mostrou que ela se agrupa em um grande clado formado pelas sequências dos vírus Adana, Punta Toro, Sandfly Sicilian Turkey, Toros, Toscana, Zerdali, Arrabida, Ambé, Aguacate, Cándirú, Tapará e Uriurana, transmitidos por flebotomíneos; dos vírus Arumowot e da febre de Rift Valley, transmitidos por mosquitos; além dos vírus Urucuri, Anhangá, isolados de mamíferos e sem um vetor conhecido. Foi possível ainda visualizar o vírus Mukawa, transmitido por carrapato, como grupo externo deste clado.

Cabe destacar que a reconstrução filogenética mostrou que o isolado de Rio Pardo é mais próximo do vírus Uriurana (79% de identidade), ao menos no que tange à região sequenciada até o momento.

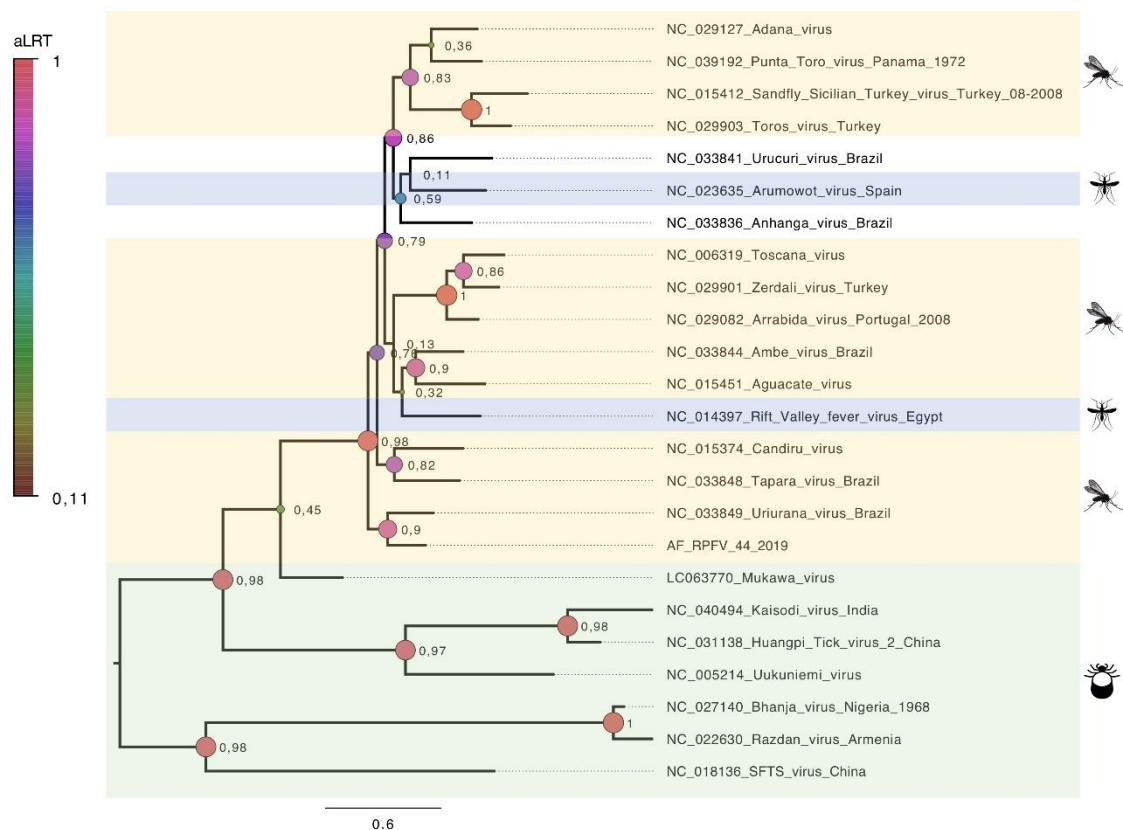


Figura 33: Reconstrução filogenética da amostra AF\_RPFV\_44\_2019. A árvore de máxima verossimilhança construída a partir de um dataset com 23 sequências de referência do segmento L de flebovírus disponíveis no GenBank e a amostra AF\_RPFV\_44\_2019. Em amarelo flebovírus isolados de flebotomíneos; em branco flebovírus isolados de mamíferos, sem vetor conhecido; em azul flebovírus isolados de mosquitos e em verde flebovírus isolados de carrapatos. Os valores de suporte de aLRT estão descritos ao lado de cada nó e também representados pelos círculos em função da cor e tamanho.;

Os resultados da análise filogenética confirmaram que o vírus isolado a partir da amostra AF\_RPFV\_44\_2019 é um flebovirus, mas ainda não nos permitem concluir se é um vírus novo, ou uma variante do vírus Uriurana. Novos protocolos de sequenciamento completo do genoma viral estão em andamento para atingir esse objetivo. Além dos ensaios moleculares, serão realizados ensaios sorológicos clássicos como fixação de complemento e inibição de hemaglutinação em colaboração com o Instituto Evandro Chagas – MS.

Carvalho e colaboradores <sup>(97)</sup>, isolaram o *Viola phlebovirus* de *Lu. longipalpis* que também apresenta identidade com URIV.

O *pool* AF-RPFV 44 continha 14 fêmeas de *Lutzomyia* sp. que foram capturadas no ambiente de floresta no Ramal Taxista, no ponto S01°47'23.4", W060°21'33.8".

Após a confirmação de *Phlebovirus* no *pool* AF-RPFV 44, foram separados os inóculos de primeira (#1) e segunda (#2) passagens tanto de VERO, quanto C6/36 e foram processados, passando por extração de RNA com kit, conforme recomendações do fabricante, seguida por produção de cDNA e PCR convencional para *Phlebovirus*. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, que confirmou o isolamento de *Phlebovirus* em células C6/36 (Figura 34).

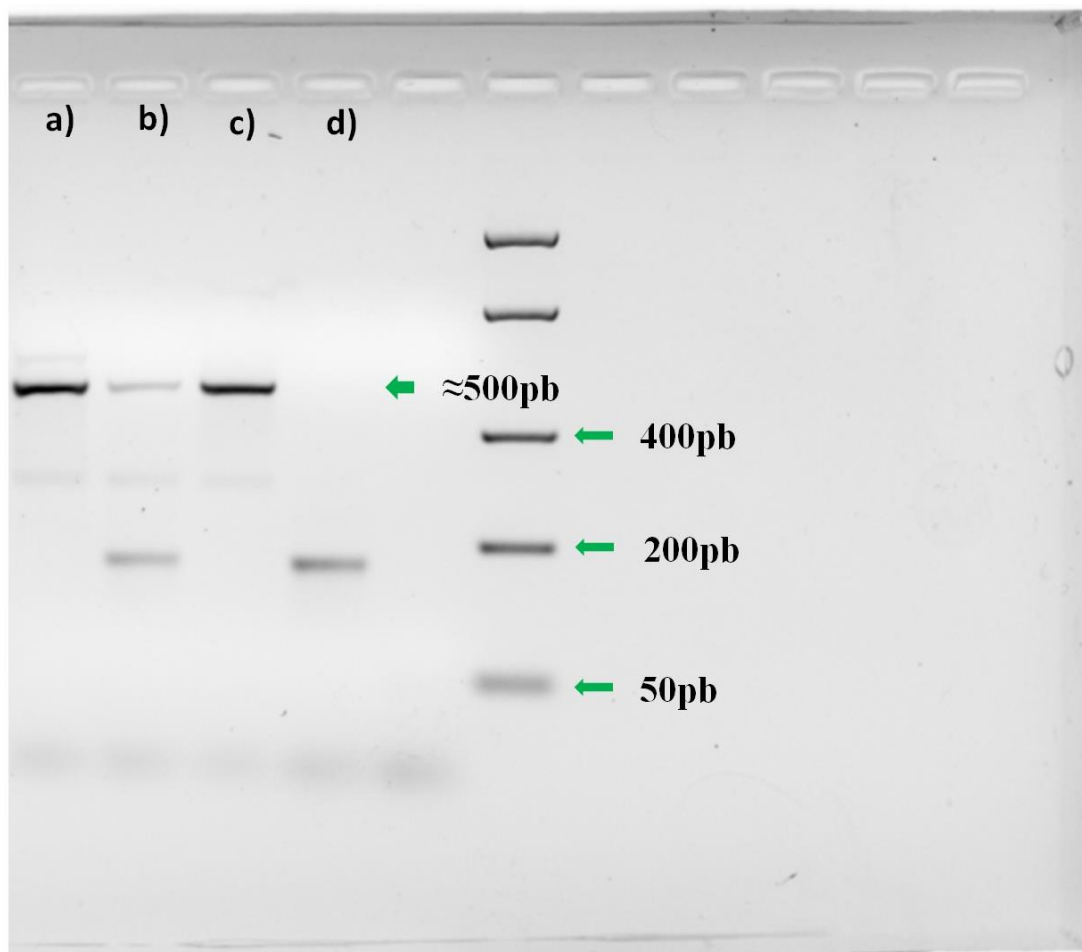


Figura 34: EGA da PCR 2 dos isolados do pool AF-RPFV 44, da segunda PCR: a) #1 de C6/36, b) #1 de VERO, c) #2 de C6/36 e d) #2 de VERO.

Na literatura, até então constava que *Phlebovirus* de flebotomíneos não eram isolados em células C6/36 <sup>(75)</sup>. Após a confirmação do isolamento em C6/36 foi realizada uma nova tentativa de isolamento, dessa vez nas células HepG2, de hepatocarcinoma celular de humano. Foram preparados dois frascos de HepG2, uma para a amostra, outra para o Mock (controle negativo), e foram incubadas em estufa a 37°C.

Foi inoculada a #1 de C6/36 e a monocamada foi observada diariamente e 96 horas pós inoculação foi registrado ECP (Figura 35).

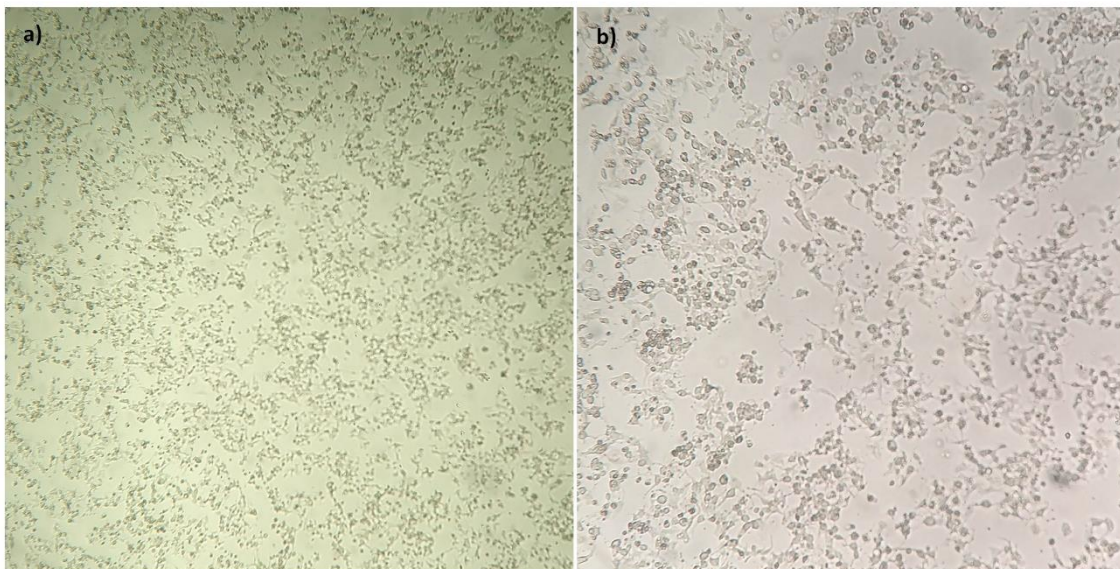


Figura 35: ECP causado por Phlebovirus em células HepG2: a) 96h p.i., b) Mock.

O sobrenadante foi recolhido e no dia seguinte passou por extração de RNA com kit, conforme recomendações do fabricante, seguida por produção de cDNA e PCR convencional para *Phlebovirus*. Os amplicons foram para EGA, que confirmou o isolamento de *Phlebovirus* em células HepG2 apresentando amplicons tanto na primeira, quanto na segunda PCR (Figura 36).

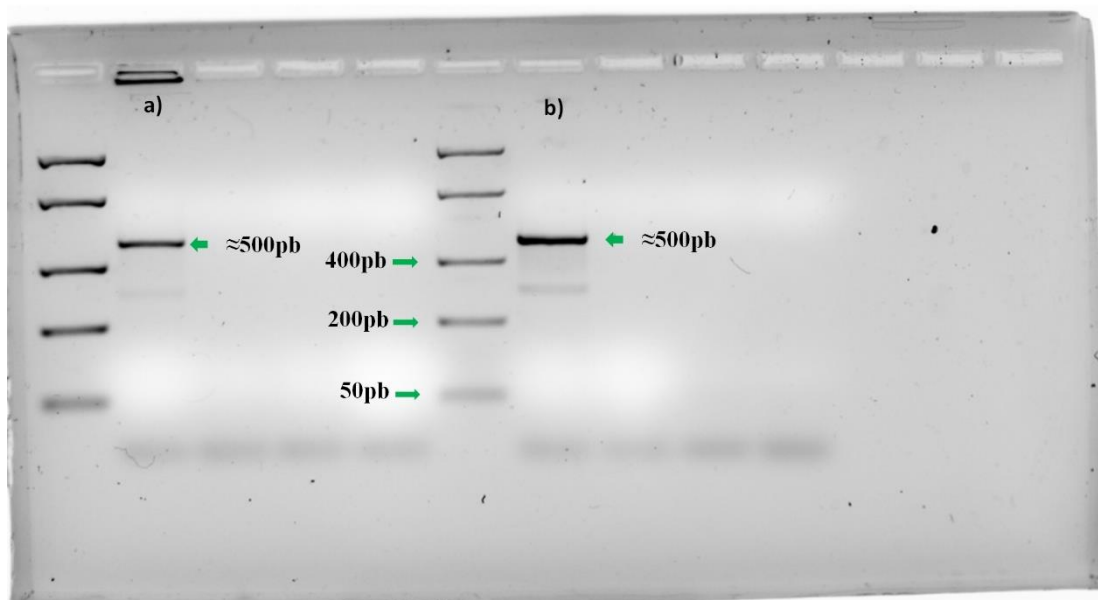


Figura 36: EGA do isolado de Hep G2: a) Amplicon da primeira PCR, b) Amplicon da segunda PCR.

O isolamento em células HepG2 é um indicativo que o *Phlebovirus* recém isolado tem potencial para sensibilizar células de seres humanos.

Uma grande quantia de vírus de flebotomíneos recém-descobertos não foi associada a doenças em casos humanos ou veterinários. Vale ressaltar que o TOSV do momento do isolamento à confirmação de casos de meningite em humanos levou um período de 14 anos, enquanto o CHPV que era associado apenas a casos de síndromes febris foi associado a encefalites 16 anos após sua descoberta.

Assim sendo, é crucial pesquisar o impacto na saúde pública desses vírus de flebotomíneos recém descritos via estudos de soroprevalência e investigação virológica molecular de casos de febre de origem desconhecida ou que tenham apresentado resultado negativo para casos conhecidos como malária ou dengue, assim como de infecções do sistema nervoso central e periférico.

## CONCLUSÃO

Identificamos um *Phlebovirus* potencialmente novo de flebotomíneos, o qual denominamos provisoriamente de Rio Pardo flebovirus (RIOPV).

O vírus foi identificado em um *pool* de *Lutzomyia sp.*, o que indica que esse vírus está circulando na população de flebotomíneos de Rio Pardo.

O flebovirus identificado precisa ser mais sequenciado e mais bem caracterizado para saber se se trata de um novo vírus ou se é um derivado do vírus Uriurana (URIV).

O RIOPV foi isolado com sucesso em células C6/36 e HepG2.

Foi identificada também uma nova bactéria de microbiota de flebotomíneos com genes de resistência.

Nossos resultados reforçam a necessidade de vigilância contínua de potenciais patógenos humanos em vetores da Floresta Amazônica.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azar D, Nel A, Solignac M, Paicheler JC, Bouchet F. New genera and species of psychodoid flies from the Lower Cretaceous amber of Lebanon. *Palaeontology*. 1999;42(6):1101–36.
2. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):279–89.
3. Shimabukuro PHF, De Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution. *Zookeys*. 2017;2017(660):67–106.
4. Rangel, Elizabeth JJS. Brazilian Sand Flies -. *Brazilian Sand Flies*. 2018.
5. Oliveira AFJ de, Aguiar NO, Freitas RA de, Pessoa FAC. New records of phlebotomine fauna (diptera, psychodidae) in the amanã sustainable development reserve, amazonas, brazil novos registros sobre a fauna flebotomínica (diptera, psychodidae) na reserva de desenvolvimento sustentável amanã, amazonas, brasil. *Uakari*. 2013;9(1):55–9.
6. Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic JS, Rodhain F, Vesenjok-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ*. 1976;54(6):663–74.
7. Aguiar GM, Vilela ML LR. Ecologia de Flebotomíneos em Itaguaí-RJ, preferência alimentar. Aguiar et al, 1987.PDF. 1987.
8. Young DG DM. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Vol. 89, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994. 125 p.
9. B A. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2000;14(2):109–22.
10. Cameron MM, Davies CR, Monje J, Villaseca P, Ogasuku E, Llanos-Cuentas A. Comparative activity of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in different crops in the Peruvian Andes. *Bull Entomol Res*. 1994;84(4):461–7.
11. MD F. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2004;18(1):71–80.
12. Ayhan N, Baklouti A, Prudhomme J, Walder G, Amaro F, Alten B, et al. Practical Guidelines for Studies on Sandfly-Borne Phleboviruses: Part I: Important Points to Consider Ante Field Work. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(1):73–80.
13. Tesh R. The Genus Phlebovirus And Its Vectors. *Annu Rev Entomol*. 1988;33(1):169–81.
14. WHO-World Health Organization. *Leishmaniasis*. 2015. p. 2015.
15. N. F, M. W-J, D.C.W. M, A.W. S. Neglected tropical diseases. *Br Med Bull*. 2017;93(1):179–200.
16. De Andrade AJ, Shimabukuro PHF, Galati EAB. On the taxonomic status of *Phlebotomus breviductus* Barretto, 1950 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).

- Zootaxa. 2013;3734(4):477–84.
17. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2012;11(suppl 1):685–704.
  18. WHO-World Health Organization. *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores*. Informes técnicos 719. 1985. p. 126 pp.
  19. Gubler D. Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Control Commun Dis Man*. 2002;33:330–42.
  20. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. 2010;3782(95):1–15.
  21. Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*. 2015;15:112–8.
  22. Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, et al. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2016;18:1–21.
  23. Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP VP. Arboviroses. *Med Trop e Infectol na Amaz*. 1997;481–503.
  24. Martins LC, Diniz JAP, Silva EVP, Barros VLRS, Monteiro HAO, Azevedo RSS, et al. Characterization of Minaçu virus (Reoviridae: Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(1):63–73.
  25. Knipe D H. *Fields Virology* (6ed). 2013. همایش بین المللی افق های نوین در علوم انسانی.
  26. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, Cunha RV da, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180278.
  27. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012;19(3):130–51.
  28. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2014;5(3):55–64.
  29. Beckham JD TK. Arbovirus Infections. *Contin (Mineap Minn)* 21(6 Neuroinfectious Dis. 2016;25(3):289–313.
  30. J Depaquit, M Grandadam, F Fouque, PE Andry CP. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: A review. *Eurosurveillance*. 2010;15(10):40–7.
  31. Jaijakul S, Arias CA, Hossain M, Arduino RC, Wootton SH, Hasbun R. Toscana meningoencephalitis: A comparison to other viral central nervous system infections. *J Clin Virol*. 2012;55(3):204–8.
  32. Rozo-Lopez P, Drolet BS, Londoño-Renteria B. Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. *Insects*. 2018;9(4):1–16.
  33. ICTV taxonomy. *Virus Taxonomy: 2018b Release*. *Virus Taxon*. 2019;

34. Kuhn JH, Wolf YI, Krupovic M, Zhang YZ, Maes P, Dolja V V., et al. Classify viruses — the gain is worth the pain. *Nature*. 2019;566(7744):318–20.
35. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). Vol. 162, *Archives of Virology*. 2017. 2505–2538 p.
36. Viralzone. Phlebovirus. *Med J Aust*. 2017;44(19):647–8.
37. Viralzone. Bunyaviridae , Phlebovirus Bunyaviridae , Phlebovirus cycle. 2019;
38. Alkan C, Bichaud L, De Lamballerie X, Alten B, Gould EA, Charrel RN. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res*. 2013;100(1):54–74.
39. Ayhan N, Charrel RN. Emergent sand fly-borne phleboviruses in the Balkan region. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(12):2324–30.
40. Sabin AB. Experimental studies on phlebotomus (pappataci, sandfly) fever during world war II. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1951;4(4):367–410.
41. Papa A, Konstantinou G, Pavlidou V, Antoniadis A. Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(2):192–4.
42. Ellis SB, Appenzeller G, Lee H, Mullen K, Swenness R, Pimentel G, et al. Outbreak of SandFly Fever in Central Iraq, September 2007. *Mil Med*. 2015;173(10):949–53.
43. Hukić M, Salimović-Bešić I. Sandfly - Pappataci fever in Bosnia And Herzegovina: The new-old disease. *Bosn J Basic Med Sci*. 2009;9(1):39–43.
44. Guler S, Guler E, Caglayik DY, Kokoglu OF, Ucmak H, Bayrakdar F, et al. A sandfly fever virus outbreak in the East Mediterranean region of Turkey. *Int J Infect Dis*. 2012;16(4):e244–6.
45. Hacıoglu S, Dincer E, Isler CT, Karapinar Z, Ataseven VS, Ozkul A, et al. A Snapshot Avian Surveillance Reveals West Nile Virus and Evidence of Wild Birds Participating in Toscana Virus Circulation. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(10):698–708.
46. PAOLA VERANI, MARIA GRAZIA CIUFOLINI, SILVANA CACIOLLI A, RENZI, LOREDANA NICOLETTI, GUIDO SABATINELLI, DARIO BARTOLOZZI, GINO VOLPI, LUIGI AMADUCCI, MARIO COLUZZI,t PIETRO PACI MB. Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from Phlebotomus. *Ann Ist Super Sanita*. 1982;18(3):397–9.
47. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Marí JM, Nicoletti L, Papa A, Sánchez-Seco MP, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(11):1657–63.
48. Charrel RN, Berenger JM, Laroche M, Ayhan N, Bitam I, Delaunay P, et al. Neglected vector-borne bacterial diseases and arboviruses in the Mediterranean area. *New Microbes New Infect*. 2018;26(October):S31–6.
49. Papa A, Velo E, Bino S. A novel phlebovirus in Albanian sandflies. *Clin Microbiol Infect*. 2010;17(4):585–7.

50. Vassiliki Anagnostou GP, Miranda Athanasiou-Metaxa and AP. Novel Phlebovirus in Febrile Child, Greece. *J Med Virol*. 2011;17(1):140–9.
51. Palacios G, Wiley MR, Travassos da Rosa APA, Guzman H, Quiroz E, Savji N, et al. Characterization of the Punta Toro species complex (genus Phlebovirus, family Bunyaviridae). *J Gen Virol*. 2015;96(8):2079–85.
52. Gundacker ND, Carrera J, Castillo M, Díaz Y, Valenzuela J. Clinical Manifestations of Punta Toro Virus Species. 2017;23(5):872–4.
53. PEDRO F. C. VASCONCELOS, AMÉLIA R A. TRAVASSOS DA ROSA, NICOLAS DÉGALLIER, JORGE F. S. TRAVASSOS DA ROSA FPP. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Cienc Cult*. 1992;44(2–3):117–24.
54. Figueiredo LTM. Vírus Brasileiros Da Família Bunyaviridae. *Med (Ribeirao Preto Online)*. 1999;32(2):154.
55. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27(2):123–47.
56. Walker PJ, Blasdel KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, et al. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J Gen Virol*. 2018;99(4):447–8.
57. Rodriguez LL. Re-emergence of Vesicular Stomatitis in the Western United States.pdf. 2002;85:211–9.
58. Letchworth GJ, Rodriguez LL. Vesicular Stomatitis. *Vet J*. 1999;157(3):239–60.
59. Comer, James A. Tesh RB, Nettles VF, Modi GB, Corn JL. Vesicular Stomatitis Virus, New Jersey Serotype: Replication in and Transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2017;42(5):483–90.
60. Travassos Da Rosa APA, Tesh RB, Travassos Da Rosa JF, Herve JP, Main AJ. Carajas and Maraba viruses, two new vesiculoviruses isolated from phlebotomine sand flies in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1984;33(5):999–1006.
61. Rao BL, Basu A, Wairagkar NS, Gore MM, Arankalle VA, Thakare JP, et al. A large outbreak of acute encephalitis with high fatality rate in children in Andhra Pradesh, India, in 2003, associated with Chandipura virus. *Lancet*. 2004;364(9437):869–74.
62. CHADHA MS, MISHRA AC, MAHADEV PVM, JADI RS, ARANKALLE VA, THAKARE JP, et al. an Outbreak of Chandipura Virus Encephalitis in the Eastern Districts of Gujarat State, India. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;73(3):566–70.
63. Geevarghese G, Arankalle VA, Jadi R, Kanojia PC, Joshi M V., Mishra AC. Detection of Chandipura Virus from Sand Flies in the Genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. *J Med Entomol*. 2006;42(3):495–6.
64. Tabachnick WJ. Culicoides and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet Ital*. 2016;40(3):144–50.
65. ROBERT B. TESH, BYRON N. CHANIOTIS PHP, JOHNSON M, KARL. Ecology of Viruses Isolated From Panamanian. 1974;23(2):258–69.

66. Characterization of the changuinola serogroup viruses (Reoviridae: Orbivirus). *Intervirology*. 1984;21(1):38–49.
67. Weaver SC, K RW. Present and Future Arboviral Threats. Vol. 85, *Antiviral Research*. 2010. 1–36 p.
68. M. MAROLI, M. G., CIUFOLINI PV. Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Med Vet Entomol*. 1993;7(3):283–6.
69. D. B. FRANCY, C. G. MOORE, G. C. SMITH, W. L. JAKOB, S. A. TAYLOR ACHC. Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: isolation of virus from insects collected along the northern Colorado Rocky Mountain Front Range. *J Med Entomol*. 1988;25(5):343–7.
70. Jiménez AE, Jiménez C, Castro L, Rodríguez L. Serological Survey of Small Mammals in a Vesicular Stomatitis Virus Enzootic Area. *J Wildl Dis*. 1996;32(2):274–9.
71. M. S. MAVALE, P. V. FULMALI, G. GEEVARGHESE, V. A. ARANKALLE, Y. S. GHODKE, P. C. KANOJIA ACM. Venereal transmission of chandipura virus by *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(6):1151–2.
72. Killmaster LF, Stallknecht DE, Howerth EW, Moulton JK, Smith PF, Mead DG. Apparent Disappearance of Vesicular Stomatitis New Jersey Virus from Ossabaw Island, Georgia. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2010;11(5):559–65.
73. Silva JWP. Aspectos ecológicos de vetores putativos do vírus mayaro e vírus oropouche em estratificação vertical e horizontal em ambientes florestais e antropizados em uma comunidade rural no Amazonas. 2017.
74. Remoli ME, Bongiorno G, Fortuna C, Marchi A, Bianchi R, Khoury C, et al. Experimental evaluation of sand fly collection and storage methods for the isolation and molecular detection of *Phlebotomus*-borne viruses. *Parasites and Vectors*. 2015;8(1):1–10.
75. Huemer H, Prudhomme J, Amaro F, Baklouti A, Walder G, Alten B, et al. Practical Guidelines for Studies on Sandfly-Borne Phleboviruses: Part II: Important Points to Consider for Fieldwork and Subsequent Virological Screening. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(1):81–90.
76. Marcondes CB. a Proposal of Generic and Subgeneric Abbreviations for Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomol News*. 2007;118(4):351–6.
77. Ohlendorf V, Marklewitz M, Kopp A, Yordanov S, Drosten C, Junglen S. Huge diversity of phleboviruses in ticks from Strandja Nature Park, Bulgaria. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;10(3):697–703.
78. Ramos W, Fernandes J, Rebouc G, Ríos-velásquez CM, Marialva EF, Desmoulière SJM, et al. Acta Tropica Anthropogenic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta Trop*. 2014;139:44–52.
79. L. Bichaud, A. Izri1, X. de Lamballerie, G. Moureau RNC. First detection of

- Toscana virus in Corsica, France. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2):1–4.
80. Alkan C, Zapata S, Bichaud L, Moureau G, Lemey P, Firth AE, et al. Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. *J Virol.* 2015;89(23):11773–85.
  81. Ramos PL. TAXONOMIA DO GÊNERO STENOTROPHOMONAS ATRAVÉS DE MULTI LOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA). 2007.
  82. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–61.
  83. Sant’Anna MRV, Darby AC, Brazil RP, Montoya-Lerma J, Dillon VM, Bates PA, et al. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One.* 2012;7(8):1–10.
  84. Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009;7(7):514–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2163>
  85. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):2–41.
  86. Sánchez MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol.* 2015;6(JUN):1–7.
  87. Volf P, Kiewegová A, Nemeč A. Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae): Transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitol (Praha).* 2002;49(1):73–7.
  88. Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):1875–83.
  89. CHERYL GOUVEIA, MARISE D. ASENSI, VIVIANE ZAHNER EFRASMPDO. Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated lutz. 2008;(October):597–601.
  90. de Oliveira SMP, de Moraes BA, Gonçalves CA, Giordano-Dias CM, D’Almeida JM, Asensi MD, et al. Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* ( Lutz & Neiva , 1912 ) ( Diptera : Psychodidae ) provenientes do campo Prevalence of the microbiota in the digestive tract of wild-caught females. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(3):319–22.
  91. Reddy K, Sharma K, Singh S. Attractancy potential of culturable bacteria from the gut of peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders). *Phytoparasitica.* 2014;42(5):691–8.
  92. Limsopatham K, Khamnoi P, Sukontason KL, Boonyawan D, Chaiwong T, Sukontason K. Sterilization of blow fly eggs, *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*, (Diptera: Calliphoridae) for maggot debridement therapy application. *Parasitol Res.* 2017;116(5):1581–9.
  93. Zhou F, Wu X, Xu L, Guo S, Chen G, Zhang X. Repressed *Beauveria bassiana*

- infections in *Delia antiqua* due to associated microbiota. *Pest Manag Sci*. 2019;75(1):170–9.
94. Faulde M, Sobe D, Burghardt H, Wermter R. Hospital infestation by the cluster fly, *Pollenia rudis sensu stricto fabricius 1794* (Diptera: Calliphoridae), and its possible role in transmission of bacterial pathogens in Germany. *Int J Hyg Environ Health*. 2001;203(3):201–4.
  95. M. Faulde MS. Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. Vol. 83, *Journal of Hospital Infection*. 2013. p. 51–60.
  96. Nunes-Neto JP, De Souza WM, Acrani GO, Romeiro MF, Fumagalli M, Vieira LC, et al. Characterization of the bujaru, frijoles and tapara antigenic complexes into the sandfly fever group and two unclassified phleboviruses from Brazil. *J Gen Virol*. 2017;98(4):585–94.
  97. Carvalho MS De, Pinto AZDL, Pinheiro A, Rodrigues JS V, Melo FL, Assis L, et al. *Viola* phlebovirus is a novel *Phlebotomus* fever serogroup member identified in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* from Brazilian Pantanal. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018;1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2985-3>