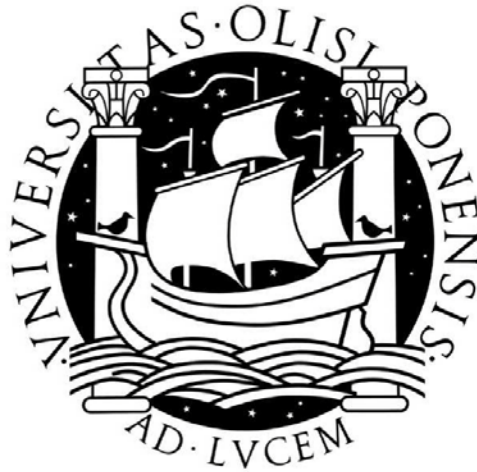


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Phlebovirus, importância em Saúde Pública em Portugal

Fátima Isabel Falcão Amaro

Doutoramento em Biologia
(Microbiologia)

2010

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Phlebovirus, importância em Saúde Pública em Portugal

Fátima Isabel Falcão Amaro

Doutoramento em Biologia
(Microbiologia)

2010

Tese orientada por Doutora Maria João Pereira Figueira Alves
e Professora Doutora Maria Filomena Ribeiro Alcobia da Silva Trabucho Caeiro

De acordo com o disposto no n.º 2 do Artigo 8 do Decreto-Lei 388/70, a autora desta dissertação declara que participou no planeamento e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados obtidos e na elaboração dos seguintes manuscritos publicados ou enviados para publicação:

Amaro F, Luz T, Parreira P, Marchi A, Ciufolini MG, Alves MJ. Serological evidence of Toscana virus in Portuguese patients. Submetido para publicação a 10 de Maio de 2010 na revista Eurosurveillance.

Amaro F, Ciufolini MG, Fiorentini C, Venturi G, Alves M J. Diagnóstico de flebovírus (vírus Toscana). Acta Med Port 2007; 20: 341-345.

Ao Sérgio e a todos os que acreditaram

Agradecimentos

Ao CEVDI/INSA a possibilidade de realizar este trabalho e ao *Istituto Superiore di Sanità* por me ter recebido para a realização do estágio;

À Doutora Maria João Alves por me ter iniciado no estudo dos arbovírus e pelo acompanhamento e orientação;

À Doutora Maria Filomena Caeiro por toda a atenção e encorajamento;

À Doutora Sofia Núncio, pela simpatia com que me acolhe no CEVDI;

A todas as pessoas que me receberam antes do pequeno-almoço e à hora do jantar para que eu capturasse os flebótomos, especialmente ao Sr. Florival e D. Conceição, ao pessoal da Quinta de Alcube, ao Sr. Afonso e esposa, à D. Emília e esposo e ao pessoal da sua quinta, ao Dr. Alexandre e ao pessoal da Quinta de S. António, ao Srs. José Bruno Neto e esposa, José Lima, João Alberto, José Santos, às D. Antónia e Sr. Fernando, às D. Hermínia, Aldina, Helena, Duarte, Eulália, Leonilde... e a todas as pessoas que me receberam e que nem cheguei a saber o nome;

Ao pessoal do ICNB, do Parque Nacional da Peneda-Gerês e dos Parque Naturais da Arrábida, do Vale do Guadiana e da Ria Formosa;

Aos professores Luís Neto e Lídia por me terem recebido na Universidade do Algarve;

Ao Dr. Paulo Nogueira do INSA pela ajuda na estatística;

Ao Nuno Alexandre, Inês Ferreira e Marta Sofia por terem cedido gentilmente as amostras de canídeos;

Aos Doutores Paula Proença, Nuno Janeiro e Elsa Ramos pelo fornecimento dos dados clínicos;

Ao Doutor Michelle Maroli, do laboratório de parasitologia do *Istituto Superiore di Sanità*, por ter uma mente brilhante e por toda a simpatia e vontade em partilhar conhecimentos. Devo-lhe tudo o que sei sobre flebótomos;

À Gioia Bongiorno e à Erika Rossi do laboratório de parasitologia do *Istituto Superiore di Sanità* por toda a simpatia e amizade.

Às Doutoradas Maria Grazia Ciufolini, Antonella Marchi, Giulieta Venturi, Claudia Fortuna, Eleonora Benedetti e ao Doutor Cristiano Fiorentini e Loredana Nicolleti, do laboratório

de virologia do *Istituto Superiore di Sanità*, por todos os ensinamentos que me deram, pela amizade e por toda a colaboração profissional que ainda se mantém;

À Líbia Zé-Zé por toda a colaboração na biologia molecular;

A todos os amigos do CEVDI que me acompanham desde que lá entrei. Agradeço não só a ao Paulo que colaborou na serologia, à Lígia, Olga e Inês que sempre me ajudaram a conseguir o que precisava para a realização deste trabalho mas também a todos os que, mesmo não trabalhando directamente comigo, sempre tiveram uma palavra de apoio. Agradeço também aos mais recentes, colegas e amigos bolseiros, Natacha, Carlos e Mariana que ainda vieram a horas para me apoiarem;

À Alexandra Morgado pela ajuda na elaboração dos mapas e também pela amizade e longas conversas;

Ao Nuno por todo o apoio e pela força que me deu. Por me ter espicaçado e aguçado o espírito e por me levar acreditar que muita coisa só depende da nossa força de vontade;

Ao Pedro Gomes pela elaboração das ilustrações mas acima de tudo por toda a dedicação e amizade;

A todos os amigos que me aturaram ao longo destes anos, em especial à Cati, à Paula e à Teresa Luz que colaborou na serologia mas que também foi uma grande amiga;

À Irene e ao Marco por me terem acompanhado ao longo da caminhada;

Ao Zé pelo encorajamento e à Mena pela ajuda na parte final, pelas longas horas de atenção que me dedicou;

Aos meus pais porque estiveram, estão e sempre estarão ao meu lado e têm sempre uma palavra de carinho, conforto e incentivo;

Ao Sérgio, o meu porto seguro em tempos de tempestade e a pessoa mais paciente do mundo.

Resumo

O vírus Toscana (género *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*) é um vírus neurotrópico que circula na Bacia do Mediterrâneo. Embora o reservatório na natureza seja desconhecido, está confirmada a sua transmissão por dípteros do género *Phlebotomus*. Recentemente foram também detectados vírus do género *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) nestes vectores.

O objectivo principal desta tese foi determinar a importância dos flebovírus em Saúde Pública em Portugal. Deste modo, no âmbito deste trabalho foram padronizadas e implementadas técnicas para o diagnóstico laboratorial de flebovírus, tendo sido desenvolvida uma técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) e implementada uma técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), como teste confirmatório, para o diagnóstico de vírus Toscana. O índice de concordância entre as duas técnicas foi considerado excelente, sendo a sensibilidade da IFI de 100%, e a especificidade superior a 80% na detecção dos anticorpos pesquisados (IgG e IgM).

Inquéritos sero-epidemiológicos realizados na população humana para detectar a presença de anticorpos anti-vírus Toscana incluíram 924 indivíduos, distribuídos por três populações. Na população considerada de risco a seroprevalência foi 3,4% e na população controlo foi 2%. Em relação à população de indivíduos com sintomatologia e pedido de diagnóstico laboratorial, a seroprevalência mais elevada foi detectada no grupo de indivíduos com sintomas do sistema nervoso central (4,2%), na qual foram confirmados cinco casos de infecção recente (3%). No grupo de indivíduos com sintomatologia não neurológica a seroprevalência foi 1,3%. No total de 29 soros com anticorpos anti-vírus Toscana foram confirmados cinco por testes de neutralização por redução em placas com a estirpe ISS.Ph1.3, demonstrando-se a presença de mais do que um genótipo de vírus Toscana em circulação em Portugal.

No intuito de determinar os prováveis reservatórios de flebovírus na natureza foram realizados estudos serológicos em vertebrados selvagens e domésticos, nomeadamente em roedores e canídeos selvagens e domésticos. Um lobo e uma raposa

apresentaram anticorpos IgG. Os resultados sugerem que, provavelmente, os canídeos selvagens têm um papel importante na manutenção do ciclo biológico dos flebovírus na natureza.

Para identificar as espécies de flebótomos em circulação em Portugal procedeu-se à captura de flebótomos com armadilhas CDC em duas zonas do país (Algarve e Arrábida). Foram capturados 7578 flebótomos, designadamente 3330 machos e 4248 fêmeas. A espécie *P. perniciosus* apresentou uma distribuição geográfica mais ampla e o maior efectivo populacional. Além de *P. perniciosus*, foram encontradas *P. ariasi*, *P. sergenti* e *Sergentomyia minuta*. Os resultados indicam que *P. sergenti* se encontra, provavelmente, em expansão no nosso país, já que ocorreu em altitudes baixas *Sergentomyia minuta*, foi encontrada no Algarve a partir dos 11 metros de altitude, o que indica que a sua distribuição também está a alterar-se.

A identificação dos vírus em circulação nos vectores foi baseada no método de *nested*RT-PCR. A presença de flebovírus não foi detectada 269 *pools* de flebótomos pesquisados. No entanto, num *pool* em 90 estudados foi revelada, pela primeira vez em Portugal, a presença de flavivírus em flebótomos. A sequência obtida é idêntica às sequências de flavivírus detectadas em mosquitos do género *Culex* no nosso país e apresenta 98% de identidade com a sequência de um flavivírus encontrado em *Ochlerotatus caspius* em Itália.

A circulação de flebovírus em Portugal foi comprovada nos seres humanos e em potenciais reservatórios. Foi demonstrada, pela primeira no nosso país, a circulação de flavivírus em flebótomos. Os resultados obtidos justificam a continuação da investigação na área dos vírus transmitidos por flebótomos pela sua importância em Saúde Pública.

Palavras-chave: flebovírus, vírus Toscana, flavivírus, flebótomos, reservatórios

Abstract

Toscana virus (*Phlebovirus* genus, family *Bunyaviridae*) is a neurotropic virus which circulates in the Mediterranean Basin. Although the reservoir in nature is unknown, it is a fact that this virus is transmitted by sandflies of *Phlebotomus* genus. Viruses of the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) were recently detected in these vectors.

The main objective of this thesis was to determine the importance of *Phleboviruses* in Public Health in Portugal. Within the aim of this work an in-house indirect immunofluorescence assay (IFI) was developed and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a commercial kit was also implemented for the laboratory diagnosis of Toscana virus. The agreement index between the two techniques was excellent, the sensitivity of IFI was 100% and the specificity exceeded 80% for both antibodies (IgG and IgM).

Sero-epidemiological surveys were conducted in the human population, in 924 individuals, distributed in three populations, for the detection of antibodies anti Toscana virus. In the population considered at risk the prevalence was 3.4% and in the control population was 2%. In what concerns to symptomatic individuals with request for laboratorial diagnosis, the highest seroprevalence was detected in the population of individuals with neurological symptoms (4.2%), were there were five confirmed cases of recent infection (3%). In the population of individuals with no neurological symptoms, the seroprevalence was 1.3%.

Five of the 29 positive sera were confirmed by plaque reduction neutralization tests with the strain ISS.Ph1.3. This shows the presence of more than one genotype of Toscana virus circulating in Portugal.

To determine the probable phleboviruses reservoirs in nature serological studies were performed on 538 samples of wild and domestic vertebrates, including rodents and wild canids. IgG antibodies were detected in two animals, namely a wolf and a fox.

The results suggest that probably wild canids have an important role in maintaining the biological cycle of phleboviruses in nature.

For the identification of sandfly species in circulation in Portugal, captures of these vectors were performed with CDC light traps, in two areas of the country, namely Algarve and Arrabida. In the two prospection periods 7578 sandflies were captured, of which 3330 were male and 4248 were females. The species *P. perniciosus* showed a wider distribution and the greater effective population size. The obtained results during this work indicate that the geographic distribution of *P. Sergenti* is getting wider since it has occurred at lower altitudes. *Sergentomyia minuta* was also found at lower altitudes than previously expected, since it was present in the Algarve in an altitude as low as 11 meters.

The identification of circulating virus in the vectors was based on nested RT-PCR method. The presence of phleboviruses was not detected in 269 screened pools. However, the presence of *Flavivirus* genus in sandflies was detected, for the first time in Portugal, in one of 90 pools surveyed. The obtained sequence is identical to the sequences of flaviviruses detected in mosquitoes of the genus *Culex* in our country and shows 98% identity with the sequence of a flaviviruses found in *Ochlerotatus caspius* in Italy.

The circulation of phleboviruses in Portugal was proven in humans and in potential reservoirs. The presence of flaviviruses in sandflies was revealed for the first time in Portugal. These results justify the continuation of research on viruses transmitted by sandflies due to their importance in what concerns to Public health.

Keywords: phleboviruses, Toscana virus, flaviviruses, sandflies, reservoirs

Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS _____	XV
ÍNDICE DE QUADROS _____	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS _____	XIX

I- INTRODUÇÃO GERAL **1**

1.1. ARBOVÍRUS _____	3
1.1.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO _____	3
1.1.2. VECTORES E CICLO DE TRANSMISSÃO _____	4
1.1.3. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA _____	6
1.1.4. FACTORES DE EMERGÊNCIA E DE RE-EMERGÊNCIA _____	10
1.2. FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i> _____	11
1.2.1. INTRODUÇÃO _____	11
1.2.2. MORFOLOGIA, ESTRUTURA GENÓMICA E REPLICAÇÃO _____	11
1.3. GÉNERO <i>PHLEBOVIRUS</i> _____	14
1.3.1. SEROGRUPO UUKUNIEMI _____	17
1.3.2. SEROGRUPO DOS VÍRUS DA FEBRE POR FLEBÓTOMOS _____	17
1.3.2.1. Vírus Alenquer, Candiru, Chagres e Punta Toro _____	17
1.3.2.2. Vírus da febre do Vale do Rift _____	18
1.3.2.3. Vírus Nápoles e Sicília _____	19
1.3.2.4. Vírus Toscana _____	22
1.4. VECTORES DOS VÍRUS DA FEBRE POR FLEBÓTOMOS _____	31
1.4.1. TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO _____	31
1.4.2. BIOLOGIA E ECOLOGIA _____	34
1.4.3. CICLO DE VIDA _____	35
1.4.3.1. Formas imaturas _____	37
1.4.3.2. Imagos _____	38
1.4.4. ESPÉCIES DE FLEBÓTOMOS EM PORTUGAL _____	41
1.4.5. MICRORGANISMOS DETECTADOS EM FLEBÓTOMOS _____	42
1.4.6. MÉTODOS DE CAPTURA DE FLEBÓTOMOS _____	46
1.4.6.1. Métodos de colheita de estádios imaturos _____	46
1.4.6.2. Métodos de colheita de imagos _____	47
1.4.7. PREVENÇÃO E CONTROLO DE PICADAS DE FLEBÓTOMOS _____	49
1.5. RESERVATÓRIOS DOS VÍRUS DA FEBRE TRANSMITIDA POR FLEBÓTOMOS _____	50
1.6. CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJECTIVOS DO TRABALHO _____	52

II- PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO **53**

2.1. INTRODUÇÃO _____	55
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS _____	55

2.2.1.	TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA	55
2.2.1.1.	Preparação das lâminas de antigénio	56
2.2.1.2.	Serologia	57
2.2.2.	TÉCNICA DE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	58
2.2.3.	DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA DE <i>KAPPA</i>	60
2.3.	RESULTADOS	61
2.4.	CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	62

III- VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE FLEBOVÍRUS EM POPULAÇÕES HUMANAS **65**

3.1.	INTRODUÇÃO	67
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.2.1.	AMOSTRAS ESTUDADAS	67
3.2.1.1.	População controlo	67
3.2.1.2.	População de risco	68
3.2.1.3.	População de indivíduos sintomáticos com requisição de diagnóstico laboratorial para vírus transmitidos por vectores	68
3.2.2.	TÉCNICAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS	69
3.2.3.	CÁLCULOS ESTATÍSTICOS	71
3.3.	RESULTADOS	71
3.3.1.	POPULAÇÃO CONTROLO	71
3.3.2.	POPULAÇÃO DE RISCO	72
3.3.3.	POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS COM REQUISIÇÃO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA VÍRUS TRANSMITIDOS POR VECTORES	74
3.4.	CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	86

IV- ESTUDO SEROLÓGICO EM POTENCIAIS RESERVATÓRIOS DE FLEBOVÍRUS **93**

4.1.	INTRODUÇÃO	95
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	95
4.2.1.	AMOSTRAS	95
4.2.1.1.	Amostras de roedores	95
4.2.1.2.	Amostras de canídeos	96
4.2.2.	TÉCNICA UTILIZADA PARA O ESTUDO SEROLÓGICO: IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA	96
4.3.	RESULTADOS	97
4.3.1.	SEROLOGIA EM ROEDORES	97
4.3.2.	SEROLOGIA EM CANÍDEOS	97
4.4.	CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	98

V- IDENTIFICAÇÃO DE FLEBÓTOMOS **101**

5.1.	INTRODUÇÃO	103
-------------	-------------------	------------

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	103
5.2.1. CAPTURAS DE FLEBÓTOMOS	103
5.2.1.1. Locais de captura	103
5.2.1.2. Métodos utilizados na captura	104
5.2.1.3. Identificação de flebótomos	105
5.3. RESULTADOS	108
5.3.1. ALGARVE	108
5.3.2. ARRÁBIDA	116
5.3.3. DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES IDENTIFICADAS	123
5.4. CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	127

VI- IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS EM FLEBÓTOMOS **133**

6.1. INTRODUÇÃO	135
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	135
6.2.1. PREPARAÇÃO DE POOLS E MACERADOS	135
6.2.2. EXTRACÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE MACERADOS DE FLEBÓTOMOS	136
6.2.3. AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE FLEBOVÍRUS	137
6.2.4. AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE FLAVIVÍRUS	140
6.2.5. VISUALIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	141
6.2.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	142
6.2.7. CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS	142
6.2.8. ISOLAMENTO DE VÍRUS	143
6.3. RESULTADOS	143
6.3.1. DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	143
6.3.2. ÁRVORE FILOGENÉTICA	145
6.4. CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	148

VII- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS **151**

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **157**

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo básico de transmissão dos arbovírus _____	4
Figura 2- Transmissão vertical de arbovírus _____	5
Figura 3 - Representação de um vírus da família <i>Bunyaviridae</i> em secção transversal _____	12
Figura 4 - Ciclo de desenvolvimento dos flebótomos _____	36
Figura 5- Fêmea de <i>Phlebotomus</i> spp evidenciando a característica posição das asas em V e o ângulo quase recto com o tórax _____	38
Figura 6 - Imago fêmea e pormenor da extremidade posterior do abdómen _____	39
Figura 7 - Anatomia da espermateca em pormenor _____	40
Figura 8 - Imago macho e anatomia de uma genitália masculina _____	41
Figura 9 - Distritos dos Serviços de Saúde que solicitaram diagnóstico laboratorial ao CEVDI para indivíduos com sintomas neurológicos _____	75
Figura 10 - Distribuição e género dos indivíduos com sintomas neurológicos por ano _____	76
Figura 11 - Número e distribuição por grupos etários dos indivíduos com sintomas neurológicos _____	77
Figura 12 - Manifestações clínicas descritas pelos clínicos nos indivíduos com sintomas neurológicos _____	78
Figura 13 - Distritos de proveniência dos Serviços de Saúde que solicitaram diagnóstico laboratorial para indivíduos sem sintomas neurológicos _____	82
Figura 14 - Distribuição e género dos indivíduos com sintomas neurológicos por ano _____	84
Figura 15 - Número e distribuição por grupos etários dos indivíduos sem sintomas neurológicos _____	84
Figura 16 - Manifestações clínicas referidas pelos clínicos nos indivíduos sem sintomas neurológicos _____	85
Figura 17 - Armadilha tipo CDC com saco colector modificado e recipiente com gelo seco ____	105
Figura 18 - Imago de flebótomo macho _____	106
Figura 19 - Imagos de flebótomos fêmeas _____	107
Figura 20 - Disposição das fêmeas _____	108
Figura 21 - Estações de captura de flebótomos no Algarve _____	109
Figura 22 - Abundância relativa das espécies identificadas no Algarve _____	115
Figura 23 - Estações de captura de flebótomos na zona da Arrábida _____	117

Figura 24 - Abundâncias relativas das espécies identificadas na Arrábida	123
Figura 25 - Pormenor da genitália de <i>P. ariasi</i>	124
Figura 26 - Pormenor da genitália de <i>P. perniciosus</i>	124
Figura 27 - Pormenor das espermatecas de <i>P. perniciosus</i>	125
Figura 28 - Pormenor da genitália de <i>P. sergenti</i>	125
Figura 29 - Pormenor das espermatecas de <i>P. sergenti</i>	126
Figura 30 - Pormenor da genitália de <i>S. minuta</i>	126
Figura 31 - Alinhamento dos nucleótidos das sequências parciais do gene NS5 dos flavivírus PoPhlFlav76, e OccaFV2	144
Figura 32 - Árvore filogenética neighbor-joining inferida a partir de sequências parciais do gene NS5 de 24 flebovírus	147

Índice de Quadros

Quadro 1- Arbovírus com maior importância em Saúde Pública _____	9
Quadro 2- Massa molar relativa das proteínas (x103) _____	13
Quadro 3- Classificação do género Phlebovirus _____	16
Quadro 4- Países onde foram identificados os vírus Nápoles e Sicília _____	20
Quadro 5- Casos de importação de infecção por vírus Toscana _____	27
Quadro 6- Distribuição geográfica dos géneros de Phlebotominae _____	33
Quadro 7- Dias de duração média do ciclo de desenvolvimento de três espécies de flebotomos em colónias de laboratório _____	37
Quadro 8- Exemplos de patologias transmitidas por flebotomos _____	43
Quadro 9- Métodos mais utilizados para a captura de flebotomos adultos _____	48
Quadro 10- Estatística de Kappa para medir a concordância entre os métodos utilizados _____	61
Quadro 11- Número de amostras testadas por ambas as técnicas (IFI e ELISA) para a presença de IgG _____	61
Quadro 12- Número de amostras testadas por ambas as técnicas (IFI e ELISA) para a presença de IgM _____	62
Quadro 13- Resultados do inquérito seroepidemiológico da população considerada de risco e respectivos valores de p calculados em relação à população controlo _____	73
Quadro 14- Solicitações de diagnóstico laboratorial para indivíduos com sintomas neurológicos _____	76
Quadro 15- Características epidemiológicas e títulos serológicos dos indivíduos IgG positivos _____	79
Quadro 16- Características epidemiológicas e títulos serológicos dos indivíduos IgG e IgM positivos _____	79
Quadro 17- solicitações de diagnóstico laboratorial em indivíduos sem sintomas neurológicos nos anos 2004-2008 _____	83
Quadro 18- Características epidemiológicas e títulos serológicos por IFI dos indivíduos IgG positivos _____	85
Quadro 19- Distribuição das espécies e número de indivíduos capturados _____	97
Quadro 20- Descrição das estações de captura de flebotomos no Algarve _____	110
Quadro 21- Números de capturas de flebotomos no Algarve em 2007 _____	111
Quadro 22- Números de capturas de flebotomos no Algarve em 2008 _____	112
Quadro 23- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas no Algarve em 2007 _____	113
Quadro 24- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas no Algarve em 2008 _____	114
Quadro 25- Descrição das estações de captura de flebotomos na zona da Arrábida _____	116
Quadro 26- Números de capturas de flebotomos na Arrábida em 2007 _____	118
Quadro 27- Números de capturas de flebotomos na Arrábida em 2008 _____	120
Quadro 28- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas na Arrábida em 2007 _____	121
Quadro 29- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas na Arrábida em 2008 _____	122
Quadro 30- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação parcial do segmento S de flebovírus _____	138

Quadro 31- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação parcial do segmento L de flebovírus _____	138
Quadro 32- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação do gene NS5 dos flavivírus _____	140
Quadro 33- Sequências parciais do gene NS5 utilizadas na construção da árvore filogenética _____	146

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEVDI	Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementar ao ácido ribonucleico;
DDT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> / ácido etilendiaminotetracético
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
ICTV	<i>International Comitee on Taxonomy of Viruses</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde
IFI	Imunofluorescência indirecta
g	unidade de medida da força centrífuga relativa
G ₁ e G ₂	Glicoproteínas 1 e 2 do invólucro
IgG, IgM	Imunoglobulinas G, M
ICNB	Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISS	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
ENIVD	<i>European network for the diagnostics of "imported" viral diseases</i>
kDa	Kilodalton
L	Segmento genómico <i>Large</i>
LCR	Líquido cefalo-raquidiano

M	Segmento genómico <i>Medium</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
<i>n</i>	<i>nested</i>
N	Proteína da nucleocápside
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nsm	Proteína não estrutural codificada pelo segmento M
Nss	Proteína não estrutural codificada pelo segmento S
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POD	Peroxidase
PFU	Plaque Forming Units
RT	<i>Reverse -Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse -Transcriptase + Polymerase chain reaction</i>
S	Segmento genómico <i>Small</i>
SNC	Sistema nervoso central
TBE	<i>Tick borne encephalitis</i>
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization tests</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1.1. Arbovírus

1.1.1. Definição e classificação

O termo arbovírus (acrônimo inglês de *arthropod borne viruses*) começou a ser utilizado nos anos 40 do século passado, entre investigadores norte-americanos, para designar vírus transmitidos por artrópodes hematófagos (Kuno *et al.*, 2005). Os arbovírus, grupo taxonomicamente diverso, com ecologia e mecanismos de manutenção na natureza similares entre si, estão entre os mais importantes agentes etiológicos de doenças infecciosas emergentes com importância em Saúde Pública (Özer, 2005; Weaver, 2006).

No Catálogo Internacional de Arbovírus estão descritos 534 vírus, dos quais 134 comprovadamente causam doença humana (Karabatsos, 1985). Os arbovírus pertencem a oito famílias e 14 géneros, no entanto, a maioria dos que têm importância médica estão incluídos em três famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (Gubler, 2002).

Historicamente, os arbovírus começaram por ser nomeados de acordo com a patologia que causavam como por exemplo, o vírus da febre amarela. Posteriormente, as denominações passaram a estar relacionadas com localizações geográficas (*e.g.* vírus da encefalite de Saint Louis), com o nome do local onde se revelou a doença pela primeira vez (vírus Rocio) ou ainda com o local onde foram descobertos (*e.g.* vírus La Crosse); muitas vezes o nome é uma combinação destas características (*e.g.* vírus da encefalite japonesa) (Calisher *et al.*, 1999).

Exceptuando o vírus da peste suína africana, os arbovírus são vírus com genoma constituído por ácido ribonucleico (ARN). Os genomas de ARN possuem elevadas taxas de mutação, o que origina mais variantes genéticas por unidade de tempo (Kuno *et al.*, 2005). Os vírus cujo genoma é composto por ARN apresentam assim maior adaptabilidade necessária para a replicação alternada em hospedeiros vertebrados e hospedeiros invertebrados (Weaver, 1997).

1.1.2. Vectores e ciclo de transmissão

Para que o ciclo de transmissão de um arbovírus ocorra são necessários três elementos: o agente patogénico, o artrópode vector e um hospedeiro vertebrado (Figura 1). A transmissão de arbovírus, pelo vector ao vertebrado, pode ser: mecânica, quando o agente patogénico não se reproduz nem se desenvolve no vector que apenas o transmite fisicamente, ou biológica, quando o agente patogénico se reproduz ou se desenvolve no artrópode vector antes de ser transmitido ao vertebrado (Munsterman, 2005).

Na transmissão biológica o período que decorre entre a ingestão de uma refeição de sangue infectado pelo vector e a capacidade de transmissão é denominado período extrínseco de incubação (Higgs & Beaty, 2005). Durante este período, que normalmente demora entre uma a duas semanas em vectores dípteros, os arbovírus infectam e replicam-se nas células epiteliais do estômago. Os vírus dispersam-se depois para a hemolinfa, provavelmente através do sistema traqueal. Uma vez infectadas as glândulas salivares, os vírus passam para os ductos salivares e são transmitidos aos vertebrados durante a refeição sanguínea (Swanepoel, 2004; Munsterman, 2005).

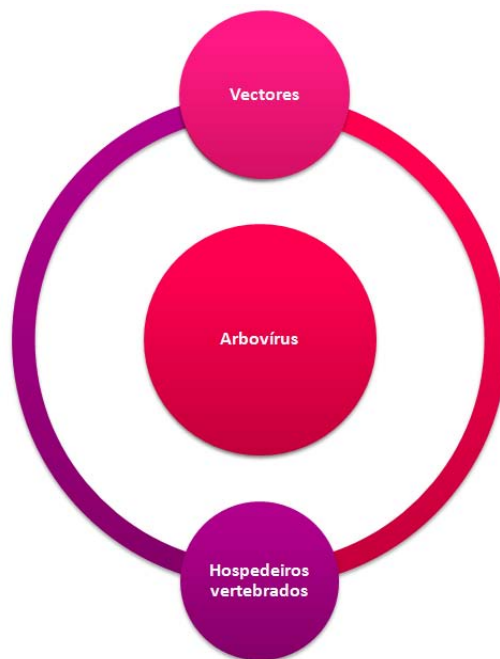


Figura 1 - Ciclo básico de transmissão dos arbovírus (adaptado de Higgs & Beaty, 2005).

A transmissão horizontal é definida classicamente como a transmissão entre vectores via virémia no hospedeiro. Outra forma de transmissão horizontal sucede quando se dá a transmissão venérea dos vírus durante a cópula dos artrópodes.

A transmissão vertical dos arbovírus acontece quando o agente é transmitido dos artrópodes para a descendência. A forma mais comum de transmissão vertical ocorre quando o vírus se replica nos folículos e a fêmea infecta a sua prole por via transovárica. Noutros casos, os vírus podem ser verticalmente transmitidos, durante a oviposição, quando o ovo passa no oviducto. Uma terceira forma de transmissão vertical é possível, quando os vírus passam dos machos para a prole, através do fluido seminal infectado (Figura 2).

Os arbovírus não exercem efeito deletério nos seus vectores visto que, se tal acontecesse, a probabilidade de transmissão do agente a um novo hospedeiro seria reduzida (Higgs & Beaty, 2005).

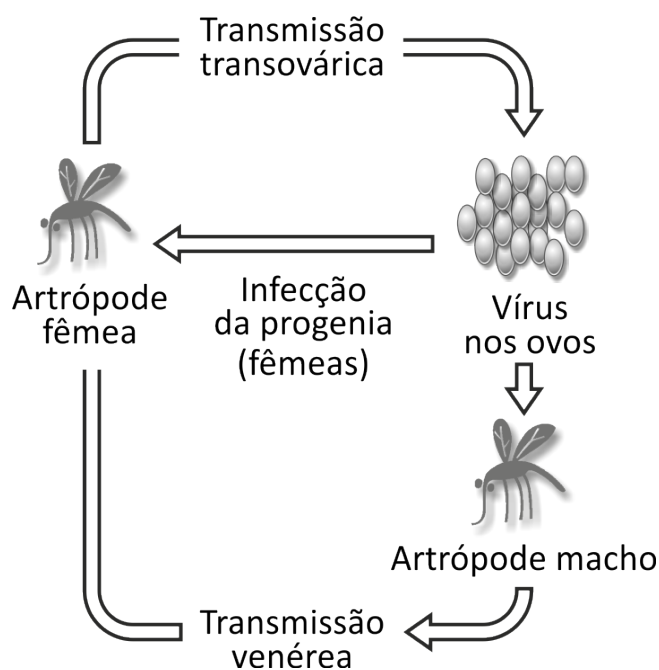


Figura 2- Transmissão vertical de arbovírus (adaptado de Higgs & Beaty, 2005).

Os principais grupos de artrópodes responsáveis pela circulação de arbovírus são (WHO, 2004):

- As carrças, ordem *Acari*, famílias *Ixodidae* e *Argasidae*;
- Os mosquitos, ordem *Diptera*, família *Culicinae*;
- Os flebótomos, ordem *Diptera*, família *Psychodidae*;
- Os culicídeos, ordem *Diptera*, família *Ceratopogonidae*.

As aves e os pequenos mamíferos, que ocorrem em grandes números e estão sujeitos a explosões populacionais, constituem os reservatórios de manutenção ideais.

No reservatório vertebrado, o vírus pode multiplicar-se e produzir uma virémia de título e duração suficientes para permitir a continuação do ciclo quando um novo artrópode hematófago pica e se alimenta do sangue infectado. O vírus dengue e o vírus da febre amarela (género *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) são dois arbovírus conhecidos em que o ser humano é o principal reservatório vertebrado (Nathanson, 2001). Na maioria dos restantes casos, os seres humanos são hospedeiros acidentais de arbovírus, uma vez que usualmente não desenvolvem virémia com título ou duração suficientes para permitir a transmissão a outros artrópodes e, conseqüentemente, a outros vertebrados, pondo assim termo ao ciclo (Higgs & Beaty, 2005; Weaver, 2006; Swanepoel, 2004).

1.1.3. Importância em Saúde Pública

Alguns arbovírus têm grande impacto em Saúde Pública, tendo aumentado a sua incidência nos últimos anos.

A maioria das infecções arbovirais caracteriza-se por uma síndrome febril ou gripal, embora muitos arbovírus provoquem uma infecção sub-clínica, revelada somente pela presença de anticorpos. Algumas destas infecções podem evoluir para síndromes neurológicas, com desenvolvimento de meningites e encefalites, ou hemorrágicas (Deubel & Georges-Courbot, 2002).

O tratamento das arboviroses é sobretudo sintomático não existindo, presentemente, anti-víricos suficientemente eficazes (Aubguenen & Pichard, 2000).

As vacinas desempenham um papel importante na prevenção das doenças uma vez que provocam a imunização do organismo, no entanto, actualmente as únicas vacinas humanas que existem para combater arboviroses são a da encefalite japonesa e a da febre amarela (CDC, 2009a).

A vacina contra o vírus da encefalite japonesa (género *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) é recomendada a pessoas que residam em zonas endémicas (Ásia), que efectuem deslocações de pelo menos um mês para países asiáticos, que desconheçam o itinerário que vão realizar ou então, que tenham a certeza da permanência em meios rurais ou em locais onde estejam a ocorrer surtos da doença (CDC, 2019b).

A vacina da febre amarela está igualmente recomendada como medida de prevenção para viajantes que se deslocam para áreas endémicas (África e Américas Central e do Sul) ou para os residentes nestas regiões (CDC, 2009b).

O desenvolvimento de uma vacina para o vírus dengue tem revelado grandes dificuldades uma vez que não se consegue descobrir um modo de esta imunizar contra os quatro serótipos de maneira a evitar o mecanismo que desencadeia o dengue hemorrágico (Figueiredo, 1999). No entanto as investigações continuam e existem várias farmacêuticas a testar novas vacinas.

Por ano estima-se que ocorram cerca de 200000 casos e 30000 mortes provocadas pelo vírus da febre amarela, transmitido por mosquitos do género *Aedes*. As infecções por este vírus podem ser assintomáticas ou apresentar um quadro clínico semelhante ao gripal. No entanto, aproximadamente 15% dos casos progride para uma forma mais grave da doença que é caracterizada por icterícia, sintomas hemorrágicos e, eventualmente, choque e falência múltipla de órgãos. A taxa de mortalidade destas ocorrências situa-se entre os 20 e os 50% (CDC, 2009b). Desde 1980 tem acontecido o ressurgimento desta doença, especialmente nas regiões tropicais da África Subsaariana, onde têm sido declarados mais de 80% dos casos (WHO/AFRO, 2007).

Entre 50 a 100 milhões de pessoas são afectadas, anualmente, pelo vírus da febre de dengue, transmitido por mosquitos do género *Aedes*. Algumas centenas de milhares de pessoas infectadas desenvolvem febre hemorrágica de dengue ou síndrome de choque por dengue (CDC, 2009c). Mais de um terço da população mundial vive em zonas de risco de transmissão deste vírus.

O vírus Chikungunya (género *Alphavirus*, família *Togaviridae*) tem sido citado como causa de epidemias humanas em muitas zonas de África, Ásia e, mais recentemente, em áreas limitadas na Europa. A doença é caracterizada por febre, cefaleias, fadiga, náuseas, vômitos, dores musculares e articulares e *rash* (CDC, 2008).

Em 2005 e 2006, ocorreu a maior epidemia de febre por Chikungunya nas Ilhas do oceano Índico e na Índia. Só na Índia esta epidemia afectou cerca de 1,3 milhões de pessoas. A ilha mais afectada foi a Ilha da Reunião, onde aproximadamente um terço da população (266000 em 770000) sofreu da doença. Entre Julho e Setembro de 2007 mais de 200 casos de infecção por Chikungunya foram notificados na região nordeste de Itália. Este primeiro surto autóctone na Europa foi associado à presença de *A. Albopictus* que se encontra em altas densidades naquele país (Stock, 2009).

Os casos supracitados são alguns exemplos que demonstram a importância dos arbovírus. No Quadro 1 resume-se a informação sobre estes vírus, os seus vectores e hospedeiros vertebrados, confirmados ou suspeitos, bem como a patologia que causam nos seres humanos e a respectiva distribuição geográfica.

Quadro 1- Arbovírus com maior importância em Saúde Pública (adaptado de Gubler, 2002).

Família/Vírus	Vector	Hospedeiro vertebrado	Doença em humanos^c	Distribuição geográfica
Flaviviridae				
Dengue 1-4 ^a	Mosquitos	Humanos, primatas	SF, FH	Distribuição mundial nos trópicos
Febre amarela	Mosquitos	Humanos, primatas	SF, FH	África, América do Sul
Encefalite japonesa	Mosquitos	Aves, porcos	SF, ME	Ásia, Pacífico
Encefalite do Vale de Murray	Mosquitos	Aves	SF, ME	Austrália
Rocio	Mosquitos	Aves	SF, ME	América do Sul
Encefalite de Saint Louis	Mosquitos	Aves	SF, ME	Américas
West Nile ^a	Mosquitos	Aves	SF, ME	África, Ásia, Europa, EUA
Doença da floresta de Kyasanar ^a	Carraças	Primatas, roedores, camelos	SF, FH, ME	Índia, Arábia Saudita
Febre hemorrágica de Omsk	Carraças	Roedores	SF, FH	Ásia
Encefalite transmitida por carraças	Carraças	Aves, roedores	SF, ME	Europa, Ásia, América do Norte
Bunyaviridae				
Febre por flebótomos ^a	Flebótomos	?	SF	Europa, África, Ásia
Febre do Vale do Rift ^a	Mosquitos	?	SF, HF, ME	África, Médio Oriente
Encefalite de La Crosse	Mosquitos	Roedores	SF, ME	América do Norte
Encefalite da Califórnia	Mosquitos	Roedores	SF, ME	América do Norte
Febre hemorrágica Crimeia-Congo ^a	Carraças	Roedores	SF, FH	Europa, Ásia, África
Oropouche	Mosquitos	?	SF	América Central e do Sul
Togaviridae				
Chikungunya ^a	Mosquitos	Humanos, primatas	SF	África, Ásia, Europa
Ross River ^a	Mosquitos	Humanos, marsupiais	SF	Austrália, Sul do Pacífico
Mayaro ^a	Mosquitos	Aves	SF	América do Sul
O'nyong-nyong	Mosquitos	?	SF	África
Sindbis	Mosquitos	Aves	SF	Ásia, África, Austrália, Europa, América
Barmah Forest ^a	Mosquitos	?	SF	Austrália
Encefalite Equina de Leste	Mosquitos	Aves	SF, ME	América
Encefalite Equina de Oeste	Mosquitos	Aves, coelhos	SF, ME	América
Encefalite Equina Venezuelana ^a	Mosquitos	Roedores	SF, ME	América

^aArbovírus que produzem níveis importantes de virémia humana; ?- desconhecido; ^cSF- Síndrome febril; ME- Meningoencefalite; FH- Febre hemorrágica.

1.1.4. Factores de emergência e de re-emergência

No mundo actual, globalizado, as populações estão ligadas económica, cultural e fisicamente, o que facilita o contacto entre pessoas, animais e microrganismos das várias áreas geográficas.

Os factores que contribuem para a emergência e re-emergência de vírus em novos locais são complexos e na sua maioria, antropogénicos, tais como (Gubler, 2002; Pugliese *et al.*, 2007a):

- Pobreza;
- Alterações climáticas;
- Alterações demográficas (crescimento global da população, invasão humana em focos naturais de doença);
- Alterações no meio ambiente que incluem desflorestação, alterações no uso dos solos e nos sistemas de irrigação;
- Turismo e viagens de negócios;
- Comércio de vida selvagem e tráfico de animais;
- Adaptação de vírus animais ao hospedeiro humano;
- Alteração nos agentes patogénicos devido sobretudo a alterações genéticas que levam a um aumento do potencial epidémico;
- Introdução de agentes exóticos, por humanos, e migrações animais;
- Descontinuidade nas medidas de Saúde Pública.

Além dos factores supracitados, o número de vírus conhecidos tem vindo a aumentar também devido aos avanços técnico-científicos, em áreas como a biologia molecular que têm permitido uma mais rápida e eficiente identificação dos microrganismos em circulação.

1.2. Família *Bunyaviridae*

1.2.1. Introdução

A família *Bunyaviridae*, constituída em 1975, abrange um grande grupo de vírus que partilham propriedades morfológicas, morfogénicas e antigénicas (Schmaljohn & Wooper, 2001). Actualmente esta família é constituída por quatro géneros de vírus que infectam animais - *Orthobunyavirus* (anteriormente designados por *Bunyavirus*), *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* – e um género que infecta plantas - *Tospovirus*. Nos géneros que parasitam animais, com excepção dos *Hantavirus* que são transmitidos por roedores e insectívoros, num ciclo vertebrado-vertebrado, todos os membros são arbovírus (Schmaljohn & Wooper, 2001; Nathenson *et al.*, 1994).

Historicamente os vírus da família *Bunyaviridae* foram classificados, com base nas suas relações antigénicas. Os que estão relacionados pela sua reactividade em testes serológicos foram agrupados em serogrupos. Actualmente, porém, a importância dos métodos moleculares para a caracterização genética de novos vírus descobertos ultrapassa largamente os métodos serológicos de classificação, particularmente no que diz respeito aos hantavírus, difíceis de isolar e propagar em culturas celulares (Schmaljohn & Wooper, 2001).

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) apresenta actualmente uma lista de 48 espécies do género *Orthobunyavirus*, 23 espécies do género *Hantavirus*, sete espécies do género *Nairovirus*, nove espécies do género *Phlebovirus* e oito espécies do género *Tospovirus*. Na família *Bunyaviridae* existem outros vírus, ainda não caracterizados molecular ou antigenicamente (ICTV 2000).

1.2.2. Morfologia, estrutura genómica e replicação

Apesar da variabilidade das características morfológicas dos vírus dos cinco géneros da família *Bunyaviridae*, os viriões desta família são geralmente esféricos, com 80 a 120 nm de diâmetro, e têm um invólucro com uma cadeia bilipídica de cerca de 5 a 7 nm de espessura, através da qual se projectam glicoproteínas (peplómeros) com cerca de 5 a 10 nm. Os invólucros derivam normalmente de membranas de Golgi ou da

membrana da célula infectada. As ribonucleocápsides virais têm entre 2 a 2,5 nm de diâmetro, 200 a 300 nm de comprimento e apresentam uma simetria helicoidal (ICTV, 2000).

O genoma é constituído por ARN, de cadeia simples, e está dividido em três segmentos denominados L (*Large*), M (*Medium*) e S (*Small*), com aproximadamente 7, 4 e 1-2 kb respectivamente. O genoma está associado a proteínas, constituindo nucleocápsides (Figura 3). O segmento L codifica a enzima transcriptase (polimerase viral), o segmento M codifica as glicoproteínas do invólucro, G1 e G2 e, em alguns géneros, também a proteína não estrutural NSm. O segmento S codifica a proteína N da nucleocápside e, em alguns géneros, a NSs, uma proteína não estrutural.

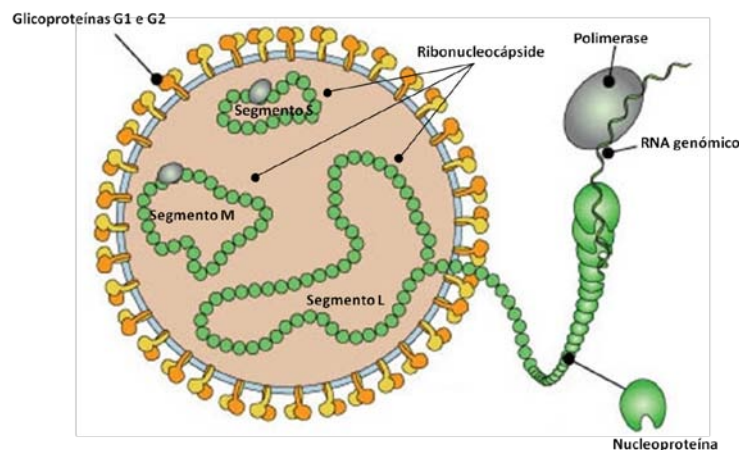


Figura 3 - Representação de um vírus da família *Bunyaviridae* em secção transversal. As projecções da superfície são as proteínas G1 e G2. As três ribonucleocápsides helicoidais compreendem, cada uma, um dos segmentos de ARN (L, Large; M, Medium; S, Small) associados à proteína L (polimerase) (adaptado de Le Mercier, 2007).

No Quadro 2 são apresentadas as massas molares relativas de cada uma das proteínas atrás referidas.

Quadro 2- Massa molar relativa das proteínas (x103) (adaptado de ICTV, 2000).

Segmento de ARN	Proteína	Género				
		<i>Bunyavirus</i>	<i>Hantavirus</i>	<i>Nairovirus</i>	<i>Phlebovirus</i>	<i>Tospovirus</i>
L	Polimerase viral	259-263	246-247	459	238-241	330-332
M	G1	108-120	68-76	72-84	55-75	72-78
	G2	29-41	52-58	30-45	50-70	52-58
	NSm	15-18	Nenhum	78-85, 92-115	Nenhum ou 78	34
S	N	19-25	50-54	48-54	24-30	52
	NSs	10-13	Nenhum	Nenhum	29-31	29

O ARN genómico tem polaridade negativa, isto é, complementar ao ARN mensageiro - mARN, com excepção do género *Phlebovirus*, em que o segmento S tem uma codificação bi-direccional (Schmaljohn & Wooper, 2001).

Todas as fases de replicação dos *Bunyaviridae* ocorrem no citoplasma da célula hospedeira. Os principais passos da replicação são (ICTV, 2000):

- 1) Adsorção do vírus, a receptores celulares, mediada pela interacção da proteína G1, G2 ou ambas;
- 2) Entrada do vírus por endocitose e fusão das membranas virais com as membranas dos endossomas;
- 3) Síntese do mARN pela polimerase do vírus;
- 4) Tradução dos mARN primários dos segmentos L e S; tradução dos mARN do segmento M por ribossomas ligados ao retículo endoplasmático e glicosilação primária das proteínas do invólucro. Clivagem co-translacional de um precursor que irá dar origem às proteínas G1, G2 e, para alguns vírus, à NSm;
- 5) Síntese e encapsidação do ARN que servirá de base ao ARN genómico ou, em alguns casos, ao mARN sub-genómico;

- 6) Replicação do genoma;
- 7) Síntese de mARN e transcrição bi-direccional;
- 8) Morfógenese incluindo a acumulação das proteínas G1 e G2 no aparelho de Golgi, glicosilação terminal, aquisição de membranas modificadas do hospedeiro.

Os vírus amadurecem quando se fundem com as vesículas intracitoplasmáticas associadas ao aparelho de Golgi, e são depois libertados pelo transporte de vesículas até à superfície celular. Segue-se a exocitose ou a lise da célula (Nathenson *et al.*, 1994).

1.3. Género *Phlebovirus*

O género *Phlebovirus* é um dos géneros da família *Bunyaviridae* mais importantes em Saúde Pública. À excepção da Austrália, os flebovírus estão presentes em todo o mundo. Estão divididos em dois grandes grupos antigénicos (ou serogrupos): o grupo Uukuniemi, transmitido por ixodídeos e o grupo dos vírus da febre por flebótomos, que pode ser transmitida por flebótomos e mosquitos (Nichol, 2001; Liu *et al.*, 2003; Swanepoel, 2004).

Estes dois grupos têm características comuns:

- 1) Têm uma estratégia de codificação bi-direccional para o segmento S do ARN;
- 2) Têm as mesmas sequências nas respectivas terminações 5' e 3';
- 3) Mostram pequena, mas significativa, homologia entre as glicoproteínas;
- 4) As proteínas N mostram um elevado grau de homologia;
- 5) Membros de um dos serogrupo estão antígenicamente relacionados com certos membros do outro serogrupo.

Os vírus do género *Phlebovirus* dos grupos Uukuniemi e da febre por flebótomos não se relacionam antígenicamente com membros de outros géneros de vírus *Bunyaviridae*.

No grupo Uukuniemi existe um complexo antigénico e no grupo dos vírus da febre por flebótomos existem oito complexos (ICTV, 2000). Enquanto que o serogrupo Uukuniemi, transmitido por ixodídeos, está geograficamente confinado à Europa, os vírus do serogrupo da febre por flebótomos, transmitidos por flebótomos e culicídeos estão presentes em todo o mundo (Quadro 3).

Quadro 3- Classificação do género Phlebovirus (adaptado de Swanepoel, 2004).

Serogrupo COMPLEXO ANTIGÉNICO Vírus	Vectores	Infecção humana		Doença no gado	Distribuição
		Natural	Laboratorial		
Uukuniemi					
UUKUNIEMI					
<i>Uukuniemi</i>	Carraças	+			Europa
Febre por flebótomos					
NÁPOLES					
<i>Nápoles</i>	Flebótomos	+			Europa, África, Ásia
<i>Toscana</i>	Flebótomos	+			Europa
CANDIRU					
<i>Alenquer</i>	Flebótomos?	+			América do Sul
<i>Candiru</i>	Flebótomos?	+			América do Sul
PUNTA TORO					
<i>Punta Toro</i>	Flebótomos	+			América Central
RIFT VALLEY FEVER					
<i>Febre do Vale o Rift (Zinga)</i>	Mosquitos	+	+	+	África
4 OUTROS COMPLEXOS					
Sem complexo					
<i>Sicília</i>	Flebótomos	+			Europa, África, Ásia
<i>Chagres</i>	Flebótomos	+			América Central

+ - Existência comprovada; ?- não confirmado.

1.3.1. Serogrupo Uukuniemi

O vírus Uukuniemi foi isolado, pela primeira vez, em 1960 a partir de ixodídeos da espécie *Ixodes ricinus*. Posteriormente foi isolado em ixodídeos, aves e ratos do campo na Eslováquia, antiga URSS, Finlândia, Lituânia, Noruega e República Checa (Oker-Blord *et al.*, 1964; Kozuch *et al.*, 1968; Gaidamovich *et al.*, 1971; Saikku & Brummer-Korvenkontio, 1975; Moteiunas *et al.*, 1973; Traavik & Mehl, 1977; Rudolf *et al.*, 2008).

Na Finlândia, Hungria e Checoslováquia foram detectados anticorpos específicos em soros humanos mas não existem provas que a infecção esteja associada a doença humana (Swanepoel, 2004). Os outros membros deste serogrupo foram isolados de ixodídeos associados a passeriformes ou aves marinhas, não tendo por isso importância médica ou veterinária reconhecidas (Swanepoel, 2004).

O vírus Uukuniemi, aparentemente não patogénico para os humanos, é utilizado como modelo para o estudo da família *Bunyaviridae* e do género *Phlebovirus* há mais de três décadas (Flick *et al.*, 2002, Flick *et al.*, 2004; Overby *et al.*, 2007).

1.3.2. Serogrupo dos vírus da febre por flebótomos

1.3.2.1. Vírus Alenquer, Candiru, Chagres e Punta Toro

Os casos conhecidos de febre por flebótomos na América do Sul são ocorrências isoladas, em pessoas que entraram em florestas tropicais por motivos ocupacionais ou recreativos (Swanepoel, 2004; Ashford, 2001).

Os vírus Alenquer e Candiru foram isolados a partir do sangue de doentes com síndrome febril na Amazónia, Brasil. Embora se saiba que são transmitidos por flebótomos pouco mais é conhecido da sua biologia (Swanepoel, 2004).

Os vírus Chagres e Punta Toro foram isolados, no Panamá, em doentes com síndrome febril. Estes dois últimos vírus são transmitidos transovaricamente nos vectores tendo sido encontrados anticorpos específicos em primatas, preguiças, porcos-espinhos e roedores (Swanepoel, 2004).

1.3.2.2. Vírus da febre do Vale do Rift

Em África o membro mais importante do género flebovírus é o vírus da febre do Vale do Rift. Este vírus isolado pela primeira vez em 1930, durante uma epizootia no Vale do Rift, Quénia, causa doença aguda em ruminantes domésticos, na África continental e em Madagáscar (Soldan & González-Scarano, 2005). Foi incluído no grupo dos flebovírus, em 1980, após testes serológicos demonstrarem a sua relação antigénica com os outros vírus do grupo (Shope *et al.*, 1980). Os vectores são uma grande variedade de espécies de mosquitos incluindo *Culex pipiens*, *Culex theileri* e alguns mosquitos do género *Aedes*.

A epizootia ocorre, geralmente, em ruminantes domésticos, particularmente em ovinos, bovinos e caprinos. Os cordeiros apresentam uma taxa de mortalidade de cerca de 90%, enquanto nos ovinos adultos esta é cerca de 25%. O vírus provoca, normalmente, aborto nas ovelhas.

No que diz respeito ao Homem este vírus é transmitido pela picada de mosquitos infectados assim como através do contacto com leite, fluidos ou tecidos de animais infectados, sendo estes dois últimos, provavelmente, as fontes de infecção mais importantes para os seres humanos (Nathenson *et al.*, 2004; Swanepoel, 2004;). Existem ainda casos descritos de infecção laboratorial por aerossóis (Hilborne & Golomb, 2001).

A doença humana geralmente consiste numa síndrome febril ligeira ou moderada. Contudo, podem ocorrer complicações severas tais como hepatite com trombocitopénia, icterícia e manifestações hemorrágicas, que resultam, geralmente, em morte ou ainda, meningoencefalites que podem deixar sequelas (Nathenson *et al.*, 1994; Swanepoel, 2004). No entanto, a complicação mais comum, associada à febre do Vale do Rift é a maculo-retinite, com visão desfocada e perda de acuidade visual, devido a hemorragias na retina e a edema macular (Chevalier *et al.*, 2010). Como resultado, cerca de 1 a 10% dos pacientes afectados têm perdas de visão permanentes (WHO, 2007a).

O vírus da febre do Vale do Rift tem causado epidemias recorrentes na África Subsaariana, no Oeste africano e no Egipto. A mais grave epizootia ocorreu no Quénia, em 1950-51 e resultou na morte de aproximadamente 100000 ovinos. Em 1977-79, no Egipto, ocorreu uma epizootia intensa em gado ovino e bovino. A doença causou, pela

primeira vez, grande número de casos humanos, estimando-se que tenha afectado cerca de 200000 pessoas, causando pelo menos 598 mortes por encefalite e/ou febre hemorrágica. Esta epidemia esteve relacionada com a construção de uma barragem no rio Aswan que fez agravar as inundações das margens dos rios, após as fortes chuvas das monções, tendo assim proporcionado as condições ideais para o desenvolvimento de vectores (WHO, 2007a).

A primeira epidemia de febre do Vale do Rift no Oeste africano foi reportada em 1987 e esteve também relacionada com a construção de uma barragem, desta vez no rio Senegal. O projecto causou a inundação da área mais baixa do rio e alterou as interacções entre animais e humanos, resultando na transmissão do vírus a estes últimos. Só na Mauritânia foram estimadas 224 mortes (Nathenson *et al.*, 1994; Swanepoel, 2004; Soldan & González-Scarano, 2005).

Em Setembro de 2000, o vírus foi pela primeira vez detectado fora do continente africano, tendo sido confirmados casos na Arábia Saudita e no Líbano (WHO, 2007a).

1.3.2.3. Vírus Nápoles e Sicília

Os vírus Nápoles e Sicília são os mais associados à denominada febre por flebotomos (também conhecida por febre dos três dias ou febre de pappataci) e foram identificados em vários países da Bacia do Mediterrâneo e do Médio Oriente. Estes vírus estão presentes no Norte de África, em países como a Argélia no entanto, a sua distribuição é vasta, estendendo-se a oeste até países como o Afeganistão, na Ásia (Quadro 4).

As grandes epidemias causadas pelos vírus Nápoles e Sicília estão associadas a condições socioeconómicas degradadas, guerras ou desastres naturais, que proporcionam condições ideais para a reprodução dos vectores e/ou levam a uma maior exposição de humanos às picadas de flebotomos (Swanepoel, 2004).

Surtos de doenças compatíveis com a descrição actual da febre por flebotomos datam do tempo das guerras Napoleónicas. Em 1886, casos clínicos desta patologia que

se desconhecia serem causados por vírus, foram descritos na Herzegovina (Schwarz *et al.*, 1995a). Doerr e colaboradores reportaram pela primeira vez, em 1909, que um microrganismo, detectado no sangue de soldados infectados, era o agente etiológico da febre por flebótomos (Doerr *et al.*, 1909).

Quadro 4- Países onde foram identificados os vírus Nápoles e Sicília

País	Referência bibliográfica
Itália	Sabin <i>et al.</i> , 1944
Turquia	Tesh <i>et al.</i> , 1976
Somália	Tesh <i>et al.</i> , 1976
Grécia	Tesh <i>et al.</i> , 1976
Arábia Saudita	Tesh <i>et al.</i> , 1976
Ex URSS	Tesh <i>et al.</i> , 1976; Pakshin <i>et al.</i> , 1990
Índia	Goverdhan <i>et al.</i> , 1976
Marrocos	Tesh <i>et al.</i> , 1976; Chastel <i>et al.</i> , 1982
Tunísia	Chastel <i>et al.</i> , 1983; Pauli <i>et al.</i> , 1995
Paquistão	Darwish <i>et al.</i> , 1983; Bryan <i>et al.</i> , 1996
Bangladesh	Gaidamovich <i>et al.</i> , 1984
Chipre	Niklasson & Eitrem, 1985, Eitrem <i>et al.</i> , 1990, Konstantinou, 2007
Afeganistão	Gaidamovich <i>et al.</i> , 1990
Croácia	Borčić & Punda., 1987, Punda-Polić, <i>et al.</i> , 1990;
Egipto	Corwin <i>et al.</i> , 1992, 1993
Sudão	McCarthy <i>et al.</i> , 1996
Israel	Cohen <i>et al.</i> , 1999
Jordânia	Bathieha <i>et al.</i> , 2000
Irão	Tavana, 2001
Iraque	Ellis <i>et al.</i> , 2007
Argélia	Izri <i>et al.</i> , 2008, Moureau <i>et al.</i> , 2010

Em 1910 foi descrita a febre por flebótomos em Malta e em Creta (Blirt, 1910) e em 1935 foram publicadas algumas notas de investigação laboratorial sobre a doença na fronteira indiana (Shortt *et al.*, 1935).

Em Itália, durante a 2.^a guerra Mundial, foram isolados por Sabin, a partir de amostras de sangue colhidas durante uma epidemia de febre por flebótomos naquelas duas regiões, os vírus Nápoles e Sicília (Sabin *et al.*, 1944). Provou-se assim que a febre por flebótomos era causada por dois vírus distintos e que não existia imunidade cruzada (Swanepoel, 2004). Na Bacia do Mediterrâneo a febre por flebótomos foi, durante durante a 2.^a guerra, a mais séria ameaça à eficácia das forças terrestres. A taxa de infecção das tropas foi de cerca de 3 a 10% tendo, em algumas unidades, excedido os 50% e incapacitado um grande número de soldados, por períodos de sete a 14 dias (Hilborne & Golomb, 2001; Hyams *et al.*, 2001).

Nos anos 80 do século passado, tropas russas foram infectadas com os vírus da febre por flebótomos quando entraram num foco não conhecido no Afeganistão e o mesmo aconteceu com tropas das Nações Unidas no Chipre (Service, 2001). Muitos milhares de casos de febre por flebótomos foram descritos provavelmente como febres de origem desconhecida uma vez que a maioria dos clínicos não estava familiarizada com a doença (AFPMB, 2001).

A febre por flebótomos, causada pelos vírus Sicília e Nápoles, é clinicamente caracterizada por um período de incubação de entre três a seis dias, seguido de febres altas (39-40°C), que persistem entre seis e 74 horas. Os sintomas mais comuns incluem cefaleias, anorexia, mialgias, fotofobia e dores retro-orbitais. Marcada leucopénia, caracterizada por linfopénia seguida por neutropénia também pode estar presente. Embora tenha sido referida a persistência de fraqueza ou depressão, durante uma semana ou mais após a fase aguda da doença, os doentes recuperam no decurso de uma a duas semanas (Bartelloni & Tesh, 1976).

A patologia nas crianças é ligeira, resulta numa imunidade permanente para as estirpes homólogas e, actualmente, na Europa esta doença não é causa de preocupação em termos de Saúde Pública. Não existe mortalidade conhecida associada aos vírus Nápoles e Sicília (AFPMB, 2001).

1.3.2.4. Vírus Toscana

O vírus Toscana, incluído no serogrupo dos flebovírus que provocam febre por flebótomos em países da Bacia do Mediterrâneo, apresenta uma grande diferença em relação aos vírus Nápoles e Sicília, nomeadamente o seu neurotropismo. Este flebovírus pode provocar doença neurológica grave, apesar de existirem relatos de casos assintomáticos de infecção (Braitto *et al.*, 1997). No contexto europeu actual o vírus Toscana é merecedor de especial atenção.

Perspectiva histórica

O vírus Toscana foi isolado, pela primeira, vez a partir de *Phlebotomus perniciosus*, colhidos em 1971, no Monte Argentario, região da Toscana, durante um estudo sobre arbovírus em Itália. Mais tarde, entre 1980 e 1985, o vírus foi também isolado a partir de *P. perfiliewi* (Verani *et al.*, 1988), durante um estudo conduzido na mesma região, cujo objectivo era determinar os possíveis vectores e focos de vírus Toscana, bem como a sua importância no que diz respeito à saúde humana.

Infecções experimentais em animais de laboratório, para estudar a patogénese do vírus Toscana, sugeriram que este seria neurotrópico. No entanto, apenas no Verão de 1983 foi isolado pela primeira vez a partir do líquido cefalo-raquidiano (LCR) de uma jovem com meningite asséptica (Leoncini *et al.*, 1986). No mesmo ano foi conseguido o isolamento num paciente que contraiu a infecção no Algarve, em Portugal (Ehrnst *et al.*, 1985). Estudos retrospectivos em amostras de crianças com idade inferior a 14 anos, com doença do SNC, hospitalizadas entre 1980 e 1995, na província de Siena (Sul da Toscana), detectaram 14 casos de infecção por vírus Toscana, sendo o mais antigo datado de 1981 (Braitto *et al.*, 1998a).

Características moleculares e antigénicas

Como em todos os vírus da família *Bunyaviridae*, o vírus Toscana possui ARN de polaridade negativa, com três segmentos (S, M e L) fechados, não covalentemente, e circulares.

O segmento S tem 1869 nucleótidos e codifica, numa estratégia bi-direccional, a proteína N, com 27 kDa (253 aminoácidos), e a proteína NSs, não estrutural, com 37 kDa (316 aminoácidos). O segmento M, com 4215 nucleótidos, tem apenas uma *open reading frame* (ORF) no sentido complementar e codifica, no mesmo sentido, a proteína NSm, com 1339 aminoácidos e aproximadamente 30 kDa, e as proteínas G1 e G2, ambas com a mesma massa molecular (149 kDa). O segmento L, com 6404 nucleótidos, tem uma ORF no sentido complementar que codifica a proteína L, a suposta polimerase viral, com 2095 aminoácidos, com massa molecular de 239 kDa (Giorgi *et al.*, 1991; Accardi *et al.*, 1993; Di Bonito *et al.*, 1997, 1999; Gró *et al.*, 1997).

A proteína N é o principal antigénio viral a induzir resposta imunitária a uma infecção por vírus Toscana (Schwarz *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1998; Cusi *et al.*, 2001). Esta é a primeira a ser expressa nas células infectadas com vírus e encontra-se sempre presente em níveis muito elevados. A proteína N não está exposta na superfície do vírus e o seu papel é interagir com o ARN para o proteger de nucleases (Magurano *et al.*, 1999).

Variabilidade genética

Num estudo sobre a variabilidade genética do vírus Toscana, Collao e colaboradores (2009), concluíram que o segmento S é muito conservado, sendo o gene NS mais variável do que o gene N e, apesar de existir uma diferença de nucleótidos de 12,1% na região codificante do gene N, as sequências de aminoácidos são completamente conservadas (100% de identidade). O segmento L mostrou ser menos conservado do que o do gene N ao nível de nucleótidos e de aminoácidos. O segmento M é o mais divergente sendo esta variação maior do que entre as estirpes de vírus do

grupo da febre do Vale do Rift, mas menos pronunciada do que dentro dos grupos do vírus Sicília ou Nápoles.

Aspectos clínicos

O vírus Toscana apresenta neurotropismo, podendo estar associado a doença neurológica aguda (Ciufolini *et al.*, 1999). A doença tem um período de incubação de cerca de 15 dias e um período de virémia de cerca de dois a três dias. No início surgem anticorpos do tipo IgM, logo seguidos pelo aparecimento de anticorpos do tipo IgG. Uma vez que o período de incubação é relativamente longo, quando a doença se manifesta, geralmente podem ser encontrados anticorpos de ambos os tipos (Magurano *et al.*, 1999). Na bibliografia não existem informações concretas sobre o tempo de persistência dos anticorpos IgG e IgM anti-vírus Toscana no organismo.

Os primeiros sintomas, nomeadamente febre e cefaleias, podem ocorrer durante dois a quatro dias, posteriormente manifestam-se vômitos, dores oculares e rigidez na nuca, associada a meningite asséptica, confusão mental e letargia, seguidos de um período médio a longo de convalescença (Magurano *et al.*, 1999).

A doença evolui sem sequelas neurológicas, com envolvimento encefálico pouco frequente, mas pode resultar em casos de meningoencefalites ou encefalites, algumas vezes sem a ocorrência de meningite (Nicoletti *et al.*, 1996; Braitto 1998b; Dionisio *et al.*, 2003; Baldelli *et al.*, 2004). Alguns pacientes necessitam de cuidados intensivos.

O facto de, por vezes, a infecção por vírus Toscana ser assintomática e não necessitar de hospitalização, pode conduzir a uma subestimativa das taxas de infecção nos residentes dos países endémicos.

Distribuição e seroprevalência

O vírus Toscana é actualmente reconhecido como um dos mais importantes agentes etiológicos de meningites, meningoencefalites ou encefalites em países endémicos como Itália, Espanha, França, e Chipre, durante os meses de Verão, período

que coincide com a actividade do seu vector. Existem diversos estudos de seroprevalência de anticorpos anti-vírus Toscana que confirmam a sua relevância em vários países Europeus.

Vários estudos apontam o vírus Toscana como causa de entre 5,6% e 81% de doença do SNC em Itália (Nicoletti *et al.*, 1991; Braitto *et al.*, 1998b; Valassina *et al.*, 1998, Valassina *et al.*, 2000; Valassina *et al.*, 2002; Di Nicuolo *et al.*, 2005; Venturi *et al.*, 2007). Em Siena, foi encontrada uma seroprevalência de 28,9% numa população saudável (Braitto *et al.*, 1997). Na Umbria 16% da população saudável estudada apresentou anticorpos (Francisci *et al.*, 2003). Na Toscânia e Piemonte, a seroprevalência variou entre 22,5%, numa população urbana, e 77,2%, numa população de trabalhadores florestais (Valassina *et al.*, 2003). Em Turim 2% a 3,7% de pessoas saudáveis mas expostas a picadas de artrópodes apresentaram anticorpos (Pugliese *et al.*, 2007b).

Em Chipre, em 1991, cerca de 20 % da população estudada (dadores de sangue e pacientes hospitalizados) apresentou-se seropositiva (Eitrem *et al.*, 1991). Anteriormente, em 1985, havia sido detectado um soldado com anticorpos anti-vírus Toscana, num estudo que englobou 328 soldados das Nações Unidas (Eitrem *et al.*, 1990).

O primeiro caso de infecção por vírus Toscana descrito em Espanha foi detectado num turista, após uma visita à Catalunha (Eitrem *et al.*, 1991). Numa vigilância sero-epidemiológica realizada em várias regiões daquele país, entre adultos e crianças saudáveis, verificou-se uma prevalência de 26,2% (Mendoza-Montero *et al.*, 1998). Em Madrid, num inquérito seroepidemiológico realizado na população saudável, a seroprevalência foi avaliada em 7,2% em 1993-1994 e em 5,7% em 1999-2000 (De Ory-Manchón *et al.*, 2007). Na costa mediterrânica, a seroprevalência na população saudável é de 5% (Echevarria *et al.*, 2003). Num estudo realizado em Granada, 8,6% dos casos de meningite asséptica foram atribuídos a infecção por vírus Toscana (Navarro *et al.*, 2004).

Na Alemanha, estudos anteriores apontavam para uma baixa seroprevalência (entre 1 e 1,6%) de anticorpos anti-vírus Toscana na população. No entanto, uma vez que foram detectados vários casos de importação de infecção, há já algum tempo que a infecção é considerada em pacientes que apresentam sintomas de meningite e que regressam de países onde o vírus Toscana é endémico (Schwarz *et al.*, 1995b).

Recentemente, foi apresentado, numa reunião científica internacional, o primeiro caso de emergência do vírus Toscana a norte dos Alpes. Meyer-König e colaboradores (2010) relataram uma seroprevalência de 7,7% de anticorpos IgG anti-vírus Toscana na população saudável e verificaram que 6,6% das meningoencefalites de etiologia desconhecida eram, na realidade, infecções autóctones por vírus Toscana, no sudoeste da Alemanha.

O primeiro caso descrito de uma infecção por vírus Toscana adquirida em França foi o de um turista alemão que regressou do sul daquele país (Dobler *et al.*, 1997). Ocorrências posteriores de infecções confirmaram a circulação do vírus no sudeste francês (Hemmersbach-Miller *et al.*, 2004; Peyrefitte *et al.* 2005, Simon *et al.*, 2005; De Lamballerie *et al.*, 2007).

Na Macedónia foi reportado o primeiro caso de infecção por vírus Toscana em 2003, num soldado francês (Chaudier *et al.*, 2003).

Na Grécia existe seroprevalência nas populações estudadas (60% nas ilhas e 35% no oeste continental), no entanto, até à data não foram notificados casos de meningite ou encefalite causados por este vírus (Charrel *et al.*, 2005).

Na Bósnia e Herzegovina, num grupo de 68 doentes com síndrome febril de origem desconhecida, foram detectados 7 soros positivos (Hukić & Salimović-Besić, 2009).

O último país a integrar a lista de infeções autóctones por vírus Toscana foi a Tunísia. Num estudo realizado entre pacientes com meningoencefalite, foram detectados anticorpos, do tipo IgM, em 10% dos casos (Bahri *et al.*, 2010).

No Quadro 5 apresentam-se os casos de importação de infeção por vírus Toscana descritos até ao presente. Existem casos de importação do vírus, de países endémicos como Itália, Portugal, Espanha e Grécia, para países da Europa Central e do Norte tais como Suíça, Alemanha e Suécia. Existe ainda um caso descrito de infeção num turista norte-americano.

As infeções por vírus Toscana devem ser consideradas em turistas com patologia no regresso de países endémicos.

Quadro 5- Casos de importação de infeção por vírus Toscana.

País de origem dos pacientes	N.º de casos importados	País de aquisição da infeção	Ano	Referência
Suécia	1	Portugal (Algarve)	1983	Ehrnst <i>et al.</i> , 1985
EUA	1	Itália (Toscânia)	1985	Calisher <i>et al.</i> , 1987
Suécia	1	Espanha (Catalunha)	?	Eitrem <i>et al.</i> , 1991
Alemanha	3	Itália (Toscânia)	1993	Schwarz <i>et al.</i> , 1993
Alemanha	2	Itália (Toscânia e sul de Nápoles)	1994	Schwarz <i>et al.</i> , 1995c
Alemanha	7 + 1	Itália (Toscânia) + Portugal (Coimbra)	1993-94	Schwarz <i>et al.</i> , 1995b
Alemanha	13	Itália e ?	?	Schwarz <i>et al.</i> , 1996
Alemanha	2	Grécia (Atenas) e França (Marselha)	1993-94	Dobler <i>et al.</i> , 1997
Holanda		Itália	2004	Beersma <i>et al.</i> , 2004
França	1	Itália (Toscânia)	2003	Defuentes <i>et al.</i> , 2005
Alemanha	1	Espanha	2004	Kuhn <i>et al.</i> , 2005
Alemanha	1	Itália (Toscânia)	2006	Imirzalioglu <i>et al.</i> , 2006
Suíça	1	Itália (Ilha de Elba)	2008	Sonderegger <i>et al.</i> , 2008
Suíça	1	Itália (Ilha de Elba)	2010	Gabriel <i>et al.</i> , 2010

?- não referido

Situação em Portugal

O primeiro caso descrito de infecção por vírus Toscana em Portugal foi o de um turista sueco que visitou o Algarve (Albufeira) durante as últimas duas semanas de Agosto de 1983 (Ehrnst *et al.*, 1985).

O indivíduo, internado com possível diagnóstico de encefalite, apresentava sinais e sintomas como cefaleias severas e febre, fotofobia mas não rigidez na nuca, temperatura corporal de 38,4°C, glóbulos brancos periféricos com valores normais e velocidade de sedimentação dos leucócitos de 35 mm/h. O LCR mostrava sinais de meningite asséptica com 134 células, predominantemente mononucleares. O paciente recuperou espontaneamente, sem complicações.

A presença de um flebovírus foi confirmada pela técnica de imunofluorescência indirecta tendo este sido identificado como uma estirpe de vírus Toscana em testes de neutralização por redução em placas. O vírus Toscana (estirpe ELB) foi isolado, a partir do LCR, em células de rim de macaco verde Africano (GMK-AH1) (Ehrnst *et al.*, 1985).

Outro caso descrito foi o de um cidadão alemão que adoeceu no seu país de origem, após ter regressado de Coimbra, com febres que duraram cerca de quatro semanas, cefaleias severas e fotofobia (Schwarz *et al.*, 1995b).

Mais recentemente, no norte de Portugal, num estudo realizado em 106 amostras de LCR colhidas entre 2002 e 2005, em pacientes com até 30 anos de idade e meningite asséptica, foi detectado ARN de vírus Toscana em seis doentes (Santos *et al.*, 2007).

Apesar destes casos relatados, no nosso país nunca foram realizados estudos de seroprevalência no que diz respeito ao vírus Toscana, desconhecendo-se também, de entre as espécies de vectores presentes em Portugal, qual é o vector responsável pelos casos de infecção pelo vírus Toscana.

Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico directo

A detecção da presença do agente etiológico, nos laboratórios de referência para flebovírus, é feita em amostras de LCR dos pacientes, nos dias de virémia, pela técnica de *nested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (nRT-PCR).

Em 1995c, Schwarz e colaboradores desenvolveram uma técnica de nRT-PCR para a detecção dos ácidos nucleicos do vírus Toscana, com *primers* cujo alvo era o segmento S. Valassina e colaboradores (1996) criaram também *primers* direccionados ao segmento S que amplificaram ARN de vírus Toscana em indivíduos com meningite. Estes *primers* não foram eficazes para a detecção do vírus Toscana que circulava em Espanha e Sánchez-Seco e colaboradores (2003) desenvolveram *primers* degenerados para amplificar uma região no segmento L de todos os membros do género *Phlebovirus*.

Avanços posteriores nas técnicas de biologia molecular permitiram o desenvolvimento de uma técnica de nRT-PCR *multiplex* para vírus Toscana (e enterovírus) (Valassina *et al.*, 2002) e também de PCR em tempo real (Pérez-Ruiz *et al.*, 2007). No entanto, face à heterogeneidade viral observada em diferentes países, é ainda necessário aperfeiçoar uma técnica com sensibilidade mais elevada (Charrel *et al.*, 2005).

O método de diagnóstico directo mais conclusivo é o isolamento de vírus em culturas celulares. Proceda-se, normalmente, à inoculação de células VERO E6 (células de rim de macaco verde africano- *Cercopithecus aethiops*). O vírus Toscana também se replica e provoca efeito citopático em células BHK-21 (células de rim de hamster *Mesocricetus auratus*), CV1 (fibroblastos de rim de *Cercopithecus aethiops*) e SW13 (células de carcinoma renal humano) (Charrel *et al.*, 2005).

Para que seja possível o isolamento, o LCR deverá ser colhido nos primeiros dois a três dias da doença, uma vez que este vírus tem um período de virémia muito curto. O isolamento é conseguido em apenas 14% das amostras que apresentaram resultados positivos por nRT-PCR (Charrel *et al.*, 2005).

Diagnóstico indirecto

O diagnóstico indirecto permite a detecção dos anticorpos específicos, logo prova o contacto com o agente infeccioso. O soro é a amostra de eleição para a maioria dos testes laboratoriais, no entanto, em pacientes com infecções do SNC, o LCR deve ser testado para anticorpos virais (Jeffery & Pilay, 2004).

A relação entre o início das manifestações clínicas da infecção e a presença de anticorpos depende do período de incubação da infecção. Em infecções com um período de incubação curto, os anticorpos estão ausentes no início dos sintomas. Nas infecções com períodos de incubação mais longos, como é o caso do vírus Toscana, no início dos sintomas, encontram-se tipicamente anticorpos do tipo IgG e IgM (Storch G, 2001). Assim, anticorpos específicos tipo IgM estão presentes durante a fase aguda, enquanto a presença de anticorpos IgG indica uma infecção prévia.

A detecção de anticorpos específicos, no caso do vírus Toscana, é realizada pela técnica da inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, imunofluorescência indirecta (IFI) e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). As técnicas de IFI e de ELISA são mais sensíveis que a técnica de inibição da hemaglutinação (Ciufolini *et al.*, 1999). Podem ocorrer, no entanto, com estas técnicas, reacções cruzadas entre o vírus Toscana e outros vírus do serogrupo da febre por flebótomos, nomeadamente os vírus Nápoles e Sicília (Tesh *et al.*, 1982).

A confirmação dos anticorpos específicos é feita por testes de neutralização por redução em placas (*Plaque Reduction Neutralization Tests* - PRNT). Este método tem uma realização muito morosa com a desvantagem acrescida de se ter de manusear o vírus activo, por um período longo o que acarreta risco biológico (WHO, 2007b). Actualmente esta técnica é realizada, para os flebovírus, em três instituições de países europeus, nomeadamente Espanha, Itália e Suécia (ENIVD, 2010).

Tratamento, prevenção e imunização

Actualmente não existe tratamento para a doença provocada pela infecção por vírus Toscana, sendo este apenas sintomático.

A prevenção da febre por flebótomos baseia-se essencialmente no controlo dos vectores e na utilização de protecção para evitar a picada.

Não existe vacina disponível para o vírus Toscana, no entanto, estão a ser realizados estudos nesse sentido. Gori Savellini e colaboradores (2008) provaram que a imunização com a combinação de proteínas N+G2 induziu uma protecção total contra o vírus Toscana em ratinhos. Segundo os autores, a análise imunológica mostrou que esta imunização produz uma marcada actividade citotóxica e uma boa actividade neutralizante nos ratinhos. A transferência passiva de imunoglobulinas anti-vírus Toscana não teve sucesso na protecção dos animais, indicando que, para conferir protecção, é necessária uma resposta imune mediada por células. Ainda segundo os mesmos autores, o modelo *in vivo* utilizado no estudo, baseado numa infecção intracraniana, não é o método mais apropriado para avaliar o nível de protecção conferida pelos anticorpos circulantes específicos mas é o único modelo animal disponível no momento, tornando-o válido como primeira abordagem para testar a eficácia de uma futura vacina.

1.4. Vectores dos vírus da febre por flebótomos

Na natureza os flebovírus do grupo da febre por flebótomos, com excepção do vírus da febre do Vale do Rift, são transmitidos aos vertebrados através da picada de flebótomos infectados.

1.4.1. Taxonomia e distribuição

Os flebótomos (do grego fleb(o) + tomo que significa cortador de veias), são insectos hematófagos pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* (Maroli, 2003).

Lewis e colaboradores (1977) consideram a existência de cinco géneros na subfamília *Phlebotominae*, nomeadamente *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. Posteriormente, Leng (1987) acrescentou a estes o género monoespecífico *Chinius*. Actualmente, além destes seis géneros, Léger e Depaquit (2007) consideram mais sete, nomeadamente *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Parvidens*, *Grassomyia*, *Spelaeomyia* e *Demeiollonius*.

À medida que os métodos moleculares se desenvolvem e são aplicados à identificação de espécies de flebótomos é possível obter maior objectividade na organização taxonómica das espécies e as actuais classificações poderão vir a ser alteradas. As técnicas moleculares, aliadas aos métodos biométricos, irão permitir o estabelecimento de relações filogenéticas para muitas espécies cuja posição taxonómica actual não está ainda bem definida (Munstermann, 2005).

Actualmente estão descritos flebótomos em 13 géneros e cerca de 900 espécies, distribuídas por todo o mundo. As regiões onde podem ser encontradas mais espécies são a América, mais propriamente, a América e do Sul e a região que compreende a Europa, Ásia e Norte de África (Quadro 6).

Quadro 6- Distribuição geográfica dos géneros de Phlebotominae (adaptado de Léger & Depaquit , 2007).

Género	N.º de espécies	América	Oceânia	Indo-Malásia	África a Sul do Saara	Eurásia e Norte de África
<i>Brumtomya</i>	22	+				
<i>Lutzomyia</i>	Cerca de 400	+				
<i>Warileya</i>	6	+				
<i>Australophlebotomus</i>	10		+			
<i>Idiophlebotomus</i>	12		+	+		+ (China e Índia)
<i>Chinius</i>	1					+ (China)
<i>Spelaeophlebotomus</i>	2				+	
<i>Parvidens</i>	4				+	
<i>Grassomyia</i>	6			+	+	
<i>Spelaeomyia</i>	4				+	
<i>Demeiollonius</i>	1				+	
<i>Sergentomyia</i>	Cerca de 300		+	+	+	+
<i>Phlebotomus</i>	Cerca de 100			+	+	+

+ - Presença confirmada

Os flebótomos ocorrem numa grande variedade de habitats, contudo, a sua distribuição pode ser limitada por temperaturas extremas ou humidade relativa baixa. Deste modo, a sua ocorrência está restringida a áreas com temperaturas médias acima dos 15,6°C durante pelo menos três meses por ano. Em muitos habitats áridos e semi-áridos (*e.g.* savanas do este de África), as populações de flebótomos são maiores no fim da estação das chuvas e menores no fim da estação seca. Nos desertos quentes e secos (por exemplo sudoeste da Ásia) ou em climas secos temperados com Verões quentes e invernos frios (*e.g.* sul da Europa), os adultos de algumas espécies podem desaparecer inteiramente durante as estações mais secas ou mais frias do ano (AFPMB, 2002).

Podemos encontrar flebótomos em altitudes que vão desde abaixo do nível do mar, em áreas circundantes ao Mar Morto em Israel e na Jordânia, até aos 2800 metros

acima do nível do mar, nos Andes e na Etiópia. Não existem referências a flebótomos na Nova Zelândia nem nas ilhas do Pacífico. A sul do Saara existem poucos flebótomos e nenhuns no Sudeste asiático. Na América, os flebótomos estão limitados principalmente às zonas tropicais (Killick-Kendric & Killick-Kendric, 1999a; AFPMB, 2002).

Todas as espécies com importância médica no Velho Mundo (Regiões Paleártica, Afrotropical, Oriental e Australiana) pertencem ao género *Phlebotomus* e as do Novo Mundo (Regiões Neártica e Neotropical) ao género *Lutzomyia* (Young & Duncan, 1994; Maroli *et al.*, 1997; Léger & Depaquit, 2007). O género *Sergentomyia* é essencialmente herpetófilo e desconhece-se a sua capacidade de transmitir agentes etiológicos aos humanos (Charrel *et al.*, 2006).

1.4.2. Biologia e ecologia

Muitos aspectos da biologia dos flebótomos ainda são desconhecidos. O facto de os seus estádios imaturos serem raramente colhidos na natureza e a dificuldade em estabelecer colónias em laboratório, fazem com que não existam, por exemplo, estimativas das densidades ou longevidade de larvas em condições naturais (Munstermann, 2005).

Os flebótomos são insectos com metamorfose completa (holometábolos). Os ovos são depositados em locais ricos em matéria orgânica e os estádios larvares desenvolvem-se e alimentam-se nela. Os adultos, de ambos os sexos, alimentam-se de açúcares das plantas ou produzidos por afídeos ou coccídeos (Lucientes *et al.*, 2005). As fêmeas, no entanto, efectuam refeições de sangue para que se dê a maturação dos ovos (Chelbi & Zhioua, 2005). Os hospedeiros incluem não só vertebrados endotérmicos, como gado, cães e roedores, ou o Homem mas também vertebrados exotérmicos como répteis e anfíbios (Léger & Depaquit, 2007).

Os flebótomos são telmófagos, ou *pool feeders*, o que significa que as fêmeas possuem uma armadura bucal cuja função é cortar a pele e seccionar os vasos sanguíneos, alimentando-se depois da gota de sangue que se forma à superfície (Lucientes *et al.*, 2005, Weaver 1997; Munstermann, 2005; Léger & Depaquit, 2007).

Algumas espécies de flebótomos são autógenas (*e.g. P. papatasi*), sendo capazes de produzir pequenos números de ovos sem uma refeição de sangue, pelo menos no primeiro ciclo de oviposição (Chelbi & Zhioua, 2005). No entanto, a libertação dos espermatozóides a partir dos espermatóforos e o movimento em direcção à espermateca ocorre, normalmente, apenas nas fêmeas que se alimentam de sangue (AFPMB, 2001; Ilango, 2005). É esta necessidade alimentar que as leva a desempenhar um papel vectorial já demonstrado natural e experimentalmente, na transmissão de vários agentes patogénicos ao homem.

Uma vez que as horas de actividade diária dos flebótomos são condicionadas pela temperatura e humidade relativa do ambiente, a sua actividade restringe-se ao período nocturno, quando a temperatura diminui e a humidade aumenta.

1.4.3. Ciclo de vida

Após a refeição sanguínea, as fêmeas recolhem-se em locais de repouso, escuros e abrigados, cerca de seis a nove dias, para digerirem o sangue e para que os ovos se desenvolvam. Ao fim desse tempo, os ovos são depositados, em locais ricos em matéria orgânica, cerca de 30 a 70 ovos por postura. O período médio até à eclosão dos ovos é de uma a duas semanas.

As larvas passam por quatro estádios sucessivos, durante cerca de quatro a oito semanas. Quando na fase de pupa, os insectos não se alimentam e sofrem uma reorganização extrema para se transformarem em imagos, o que decorre em quatro a seis dias (Figura 4) (AFPMB, 2001; Lucientes *et al.*, 2005). A duração deste ciclo é muito variável e depende de factores bióticos e abióticos. Em condições óptimas, o ciclo de vida pode durar entre 40 a 45 dias (AFPMB, 2001 Lucientes *et al.*; 2005).

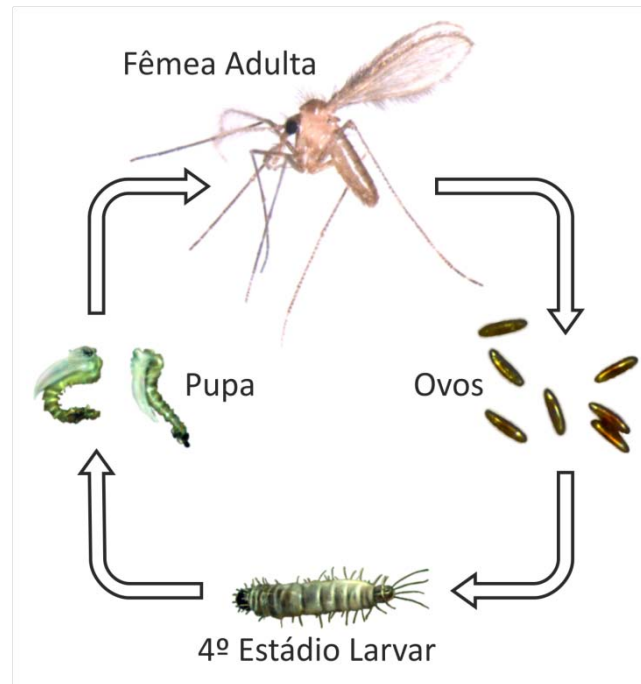


Figura 4 - Ciclo de desenvolvimento dos flebótomos (fotos: Fátima Amaro e Michelle Maroli).

Em Itália observam-se pelo menos dois ciclos de desenvolvimento completos de flebótomos durante a estação mais quente (Junho a Outubro), o que corresponde a duas gerações de adultos. Estas observações, em meio natural, são concordantes com as obtidas em colónias de laboratório de três espécies diferentes de flebótomos, nomeadamente *P. perniciosus*, *P. perfilowi* e *P. papatasi* (Quadro 7) (Maroli, 2003).

Quadro 7- Dias de duração média do ciclo de desenvolvimento de três espécies de flebótomos em colônias de laboratório (adaptado de Maroli, 2003).

Espécie	Ovo		Fase larvar (4 estádios)	Fase de pupa	Ciclo completo
	Maturação	Eclosão			
<i>P. perniciosus</i>	9 (7-12)	6 (4-8)	18 (16-20)	9 (8-11)	42 (42-45)
<i>P. perfiliewi</i>	8 (5-12)	6 (5-8)	22 (18-26)	8 (6-10)	44 (41-48)
<i>P. papatasi</i>	8 (7-9)	7 (6-8)	28 (21-36)	8 (7-9)	51 (43-58)

Os dias foram calculados desde a refeição sanguínea até ao emergir da próxima geração. Entre parênteses estão o mínimo e o máximo observados.

O desenvolvimento óptimo dos flebótomos dá-se a temperaturas entre os 17°C e os 31°C. Temperaturas acima dos 40°C destroem os ovos e as larvas. Temperaturas abaixo dos 10°C atrasam o seu desenvolvimento. A humidade necessária é muito elevada, no entanto, solos permanentemente encharcados não são bons criadouros (Lucientes *et al.*, 2005). Em áreas temperadas, os adultos morrem no final do Verão ou no Outono, no entanto, nas regiões tropicais a reprodução é contínua ao longo do ano (Service, 2001). Nas regiões temperadas os flebótomos passam o Inverno no 4.º estágio larvar.

1.4.3.1. Formas imaturas

Os ovos dos flebótomos são fusiformes.

As larvas são vermiformes e possuem um aparelho bucal mastigador para se alimentarem da matéria orgânica. O corpo das larvas divide-se em 12 segmentos (três torácicos e nove abdominais) cobertos por sedas. O último segmento tem dois lobos dorsais, prolongados por sedas pigmentadas e longas, e por duas sedas espinhosas.

A pupa tem, na sua extremidade posterior, uma estrutura do quarto estágio larvar que serve de suporte após a muda (Ripert *et al.*, 1996).

1.4.3.2. *Imagos*

Os imagos (formas adultas) de flebótomos são pequenos, têm cerca de dois a três milímetros de comprimento, e a sua cor pode variar desde o cinzento prateado ou amarelo pálido a quase preto. Todo o corpo, incluindo as asas, está coberto por sedas. As asas apresentam-se erectas, para cima e para trás, tomando a forma de um V (Figura 5), uma característica peculiar dos flebótomos adultos em repouso (Munstermann, 2005). A cabeça forma um ângulo quase recto com o tórax.



Figura 5- Fêmea de *Phlebotomus* spp evidenciando a característica posição das asas em V e o ângulo quase recto com o tórax (foto: Fátima Amaro)

Os olhos, localizados lateralmente na cabeça, são relativamente grandes e escuros e muito visíveis se vistos de perfil.

As antenas possuem 16 artículos.

O aparelho bucal, cortador e sugador, é formado pelo labro-epifaringe, duas mandíbulas, duas maxilas, hipofaringe e labium. Ao lado das maxilas estão os palpos maxilares. A cavidade bucal, ou cibário, tem dentes ou dentículos de aspecto muito variável sendo o número e forma destas estruturas muito importantes para a distinção entre espécies.

O tórax é composto por três segmentos: o protorax, o mesotorax, muito desenvolvido e com um par de asas, e o metatorax que possui dois balancetes. Cada segmento torácico tem um par de patas.

O abdómen é composto por 10 segmentos dos quais os terminais (três nas fêmeas e quatro nos machos) estão transformados no aparelho genital. O abdómen da fêmea é redondo e robusto (o do macho é mais estreito) e a sua genitália apresenta a forma de C quando visto lateralmente. Estas diferenças reflectem-se nos pesos corporais sendo as fêmeas cerca de 50% mais pesadas do que os machos (Ripert *et al.*, 1996; Maroli, 2003; Munstermann, 2005).

Na fêmea, o nono tergito diferencia-se numa furca que circunda a abertura genital e o décimo segmento está reduzido a dois cercos nos quais desemboca a abertura anal (Figura 6). A espermateca, de forma variável, é a característica identificativa das espécies (Figura 7).

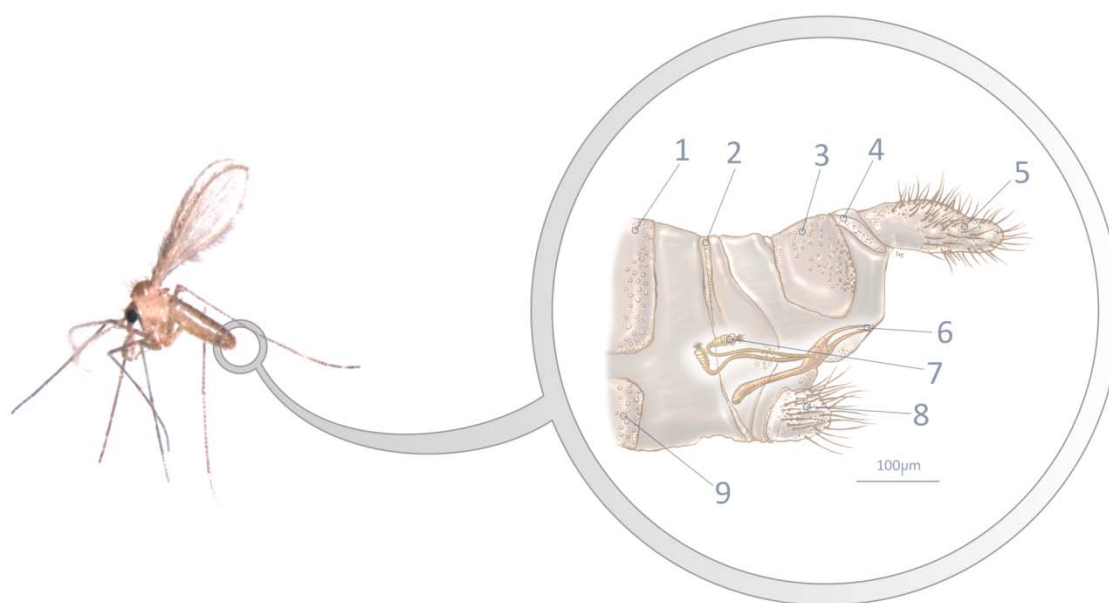


Figura 6 - Imago fêmea e pormenor da extremidade posterior do abdómen. 1 tergito 7; 2 tergito 8; 3 tergito 9; 4 tergito 10; 5 cerco; 6 furca; 7 espermateca; 8 esternito 8; 9 esternito 7 (foto: Fátima Amaro; ilustração de Pedro Gomes, adaptado de Léger & Depaquit, 2007).

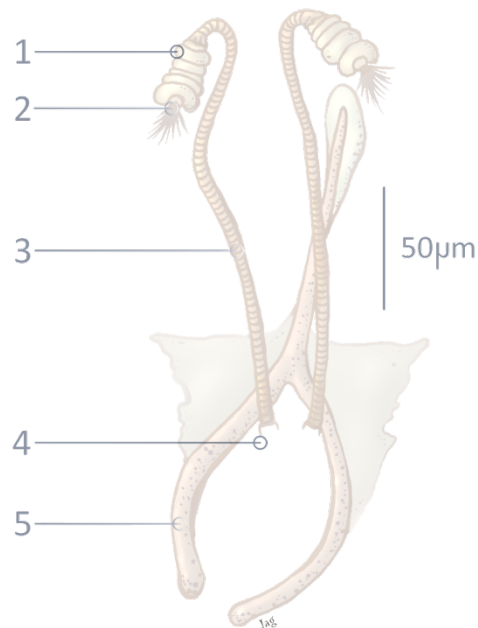


Figura 7 - Anatomia da espermateca em pormenor. 1 corpo; 2 cabeça; 3 canal condutor; 4 base; 5 furca (ilustração de Pedro Gomes, adaptado de Léger & Depaquit, 2007).

No macho, o sétimo e oitavo tergitos estão invaginados enquanto o nono e décimo segmentos estão completamente modificados formando a armadura genital (Figura 8). Esta última é constituída por três pares de apêndices: o primeiro é formado por dois artículos- coxito e estilo (este último pode ter de dois a cinco espinhos); o segundo, rico em sedas, consta dos parâmeros originados na base do coxito e que protegem os dois filamentos penianos que constituem a válvula copuladora e o terceiro compreende os lobos laterais. Os dois cercos, pouco visíveis porque estão cobertos pela base dos dois lobos laterais, estão colocados lateralmente, na margem do ânus. Estes três apêndices são utilizados para fazer a identificação dos flebótomos ao nível da espécie (Ripert *et al.*, 1996).

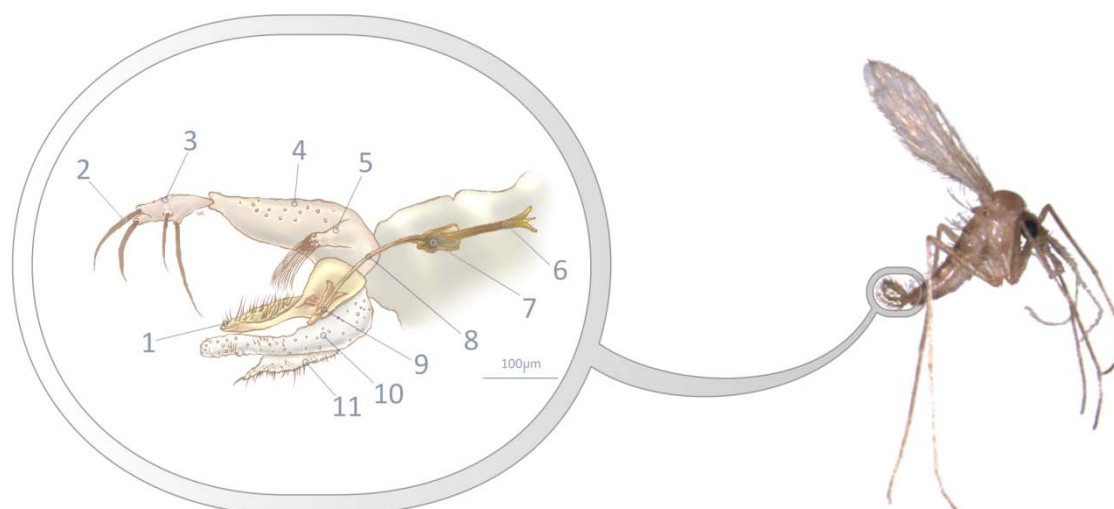


Figura 8 - Imago macho e anatomia de uma genitália masculina. 1 parâmero; 2 espinho; 3 gonostilo; 4 gonocoxito; 5 lóbulo basal do coxito; 6 pistão; 7 bomba genital; 8 filamento genital; 9 edeago; 10 lóbulo lateral do subestilo; 11 cerco. (foto: Fátima Amaro; Ilustração de Gomes, adaptado de Léger & Depaquit, 2007).

1.4.4. Espécies de flebótomos em Portugal

Em Portugal estão descritas cinco espécies de flebótomos, nomeadamente, *Phlebotomus ariasi*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* e *Sergentomyia minuta*.

- *P. ariasi* é uma espécie típica do ocidente da subregião Mediterrânica. Também está descrita em Espanha, França, Itália, Marrocos, Argélia, Tunísia (Pires, 2000).
- *P. papatasi* é a espécie com maior distribuição na região Paleártica. Pode ser encontrado na Bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente e subcontinente indiano (Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal, Butão, Sri Lanka, Maldivas) (Yaghoobi *et al*, 2007; Toprak & Özer, 2007).
- *P. perniciosus* é a espécie mais generalizada no nosso país (Pires, 1979). Existe também em Espanha, França (a norte de Paris), sul da Suíça, Balcãs (nordeste), Itália, Malta, Chipre, Líbia, Tunísia, Turquia, Síria, Argélia e Marrocos (Seccombe *et al.*, 1993, Killick-Kendrick *et al.*, 1999b).

- *P. sergenti* tem uma dispersão geográfica que vai de Portugal aos Himalaias, englobando toda a parte ocidental da bacia mediterrânica (Pires, 2000).
- *S. minuta* tem uma distribuição muito vasta estendendo-se desde as Canárias e Madeira, a oeste, até à Índia, a leste, do Sul de França e da Sicília, a norte, e a sul até à Etiópia, (Pires, 2000).

1.4.5. Microrganismos detectados em flebótomos

A picada dos flebótomos pode causar reacções cutâneas provocadas pela injúria do corte ou pela saliva do insecto. A intensidade das reacções observadas (dor ou aparição de uma pápula ou escara hemorrágica) varia em função da sensibilidade individual da pessoa picada. Alguns indivíduos podem sensibilizar-se progressivamente ou apresentar reacções anafiláticas, mais ou menos violentas, com prurido, edemas ou exantemas (na face, em particular), ou afecções gerais (febre, náuseas, problemas no ritmo cardíaco). Na manipulação dos flebótomos, os indivíduos que fazem capturas com aspiradores de boca, podem ter reacções alérgicas ao pó que cobre o corpo dos insectos e desenvolver alergias respiratórias (Léger & Depaquit, 2007).

Contudo, a importância médica dos flebótomos deve-se essencialmente aos agentes etiológicos por eles transmitidos.

Os flebótomos dos géneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) são vectores de protozoários, bactérias e vírus. As patologias mais importantes transmitidas por flebótomos são a leishmaniose e a febre transmitida por flebótomos (Quadro 8).

Os agentes patogénicos com maior importância médica (e também veterinária), transmitidos pelos flebótomos, são os protozoários do género *Leishmania* (*Trypanosomatidae*) dos quais estes insectos são os vectores exclusivos. As leishmanias são o agente etiológico da leishmaniose cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. A forma cutânea manifesta-se por pequenas úlceras auto-limitadas que saram lentamente. Quando existe destruição das mucosas orais ou nasais, e doença denomina-

se mucocutânea. A forma cutânea difusa acontece quando existe disseminação de pápulas ou nódulos por todo o corpo. Quando os parasitas invadem as células do baço, medula óssea e fígado, causando um envolvimento visceral, a doença é designada por leishmaniose visceral (Goddard, 2003; Munstermann, 2005).

Quadro 8- Exemplos de patologias transmitidas por flebótomos (adaptado de Rutledge & Gupta, 2002).

Doença	Agente	Distribuição geográfica	Vector
Leishmaniose cutânea (Novo Mundo)	e.g. <i>Leishmania amazonensis</i> ^{ab} , <i>L. brasiliensis</i> ^b , <i>L. guyanensis</i> ^{ab} , <i>L. panamensis</i> ^b , <i>L. peruviana</i> (Protozoários)	Regiões Tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul, México, EUA (Texas)	<i>Lutzomyia</i> spp
Leishmaniose cutânea (Velho Mundo)	E.g. <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i> ^b , <i>L. tropica</i> ^a (Protozoários)	Europa, Ásia e África	<i>P. spp</i>
Leishmaniose visceral (Novo Mundo)	<i>L. chagasi</i> (Protozoários)	Regiões tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul	<i>Lutzomyia</i> spp
Leishmaniose Visceral (Velho Mundo)	<i>L. archibaldi</i> , <i>L. donovani</i> ^{bc} , <i>L. infantum</i> ^{bc} (Protozoários)	Regiões tropicais e subtropicais da Europa, Ásia e África	<i>P. spp</i>
Bartonelose	<i>Bartonella bacilliformis</i> (Bactéria)	Colômbia, Equador, Peru	<i>Lutzomyia verrucarum</i> , <i>Lutzomyia columbiana</i>
Estomatite vesicular	Vírus da estomatite vesicular: Alagoas, Indiana, serótipos de New Jersey (vesiculovírus)	Américas do Norte e do Sul, regiões tropicais subtropicais e temperadas	<i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia trapidoi</i> , <i>Lutzomyia ylephiletor</i>
Doença do vírus de Chandipura	Vírus Chandipura (vesiculovírus)	Índia, Oeste de África	<i>P. papatasi</i> ?
Febre por flebótomos (Novo Mundo)	Vírus Alenquer, Candiru, Chagres, Punta Toro (flebovírus)	Panamá, Colômbia	<i>Lutzomyia trapidoi</i> , <i>Lutzomyia ylephiletor</i>
Febre por flebótomos (Velho Mundo)	Vírus Nápoles, Sicília, Toscana (flebovírus)	Europa tropical e subtropical, Ásia, Norte de África	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. perniciosus</i>

^a também pode provocar infecções viscerais; ^b também pode provocar infecções mucocutâneas; ^c também pode provocar infecções cutâneas; ?- suspeito.

Os flebótomos também transmitem as bactérias da espécie *Bartonella bacilliformis*, agente da febre de Oroya ou doença de Carrion (fase aguda da infecção) ou da verruga peruana (fase crónica da infecção) no Peru, Colômbia e Equador.

A fase aguda da doença é causada pela infecção maciça da bactéria nos glóbulos vermelhos que tem como consequência febre e anemia hemolítica. Se a infecção não for tratada a taxa de mortalidade varia entre os 40% e os 85%.

A fase crónica é caracterizada por lesões benignas eruptivas que causam prurido e sangram, assim como por outros sintomas tais como dores osteoarticulares (Maguiña *et al.*, 2000, 2001 Munstermann, 2005; Léger & Depaquit, 2007).

No que diz respeito aos vírus, já foram detectados, em flebótomos, os géneros *Orbivirus*, *Vesiculovirus*, *Phlebovirus* e *Flavivirus*.

Existem 12 espécies do género *Orbivirus* (família *Reoviridae*) transmitidas por flebótomos nas Américas, pertencentes ao grupo do vírus Changuinola. No entanto, a transmissão de orbivirus ao Homem é excepcional. A infecção humana parece resultar apenas em sintomas gripais ligeiros, embora esteja ainda pouco documentada (Polly, 2007).

Entre as nove espécies do género *Vesiculovirus* (família *Rhabdoviridae*) o vírus Chandipura é considerado de grande importância médica. Este vírus é endémico na Índia, suspeitando-se que flebótomos dos géneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* possam ser os seus vectores (Depaquit *et al.*, 2010). Estudos laboratoriais mostraram no entanto que a espécie *P. papatasi* é um reservatório eficiente do vírus, permitindo o seu crescimento e transmissão venérea e transovárica (Tesh *et al.*, 1983; Mavale *et al.*, 2006). *Phlebotomus. argentipes* também permite, experimentalmente, a transmissão do vírus (Mavale *et al.*, 2007).

O vesiculovirus Radi foi isolado em Itália, em *P. perfiliewi* mas não está associado a doença humana (Verani *et al.*, 1991).

No que diz respeito aos flebovírus, uma grande percentagem foi isolada nas Américas Central e do Sul, apesar de a infecção humana, nessa parte do mundo, ser pouco comum. No Panamá os vírus Chagres e Punta Toro foram isolados em flebótomos

do género *Lutzomyia*, assim como os vírus Aguacate, Cacao, Caimito, Chilibre, Frijoles e Nique (Tesh *et al.*, 1975).

É provável que espécies que ingerem sangue humano na Região Neotropical sejam, na sua maioria, silváticas no que diz respeito aos locais de repouso e entrem raramente em habitações humanas (Tesh, 1989).

Os flebovírus Sicília, Nápoles e Toscana foram detectados em várias espécies de flebótomos.

O vírus Sicília foi isolado em *P. papatasi* em países da Bacia do Mediterrâneo e na Ásia e na Argélia, em *P. ariasi* (Tesh *et al.*, 1977; Izri *et al.*, 2008).

O vírus Nápoles foi isolado em *P. papatasi* em Itália e no Egipto (Sabin *et al.*, 1944; Schmidt *et al.*, 1971) e em *P. perfiliewi*, na Sérvia (Gligic *et al.*, 1982).

O vírus Toscana foi isolado em *P. perniciosus* e *P. perfiliewi* em Itália (Verani *et al.*, 1988).

O vírus Arbia foi isolado em *P. perniciosus* e em *P. perfiliewi* (Verani *et al.*, 1988), o vírus Corfou na Grécia em *P. major* (Rodhain *et al.*, 1985), o vírus Massilia foi isolado em França e detectado em Espanha em *P. perniciosus* (Charrel *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010) e o vírus Punique em *P. perniciosus* e *P. longicuspis* na Tunísia (Zihoua, 2010).

Os flavivírus isolados em flebótomos não são reconhecidos como patogénicos para os seres humanos, no entanto, devem ser referidos devido à importância que este género de vírus tem vindo a adquirir nos últimos anos.

O flavivírus Saboya, foi isolado a partir de roedores, aves e morcegos capturados no Senegal (Saluzzo *et al.*, 1986; Butenko, 1996; Konstantinov *et al.*, 2006;) e posteriormente foi isolado em flebótomos no mesmo país (Fontenille *et al.*, 1994; Ba *et al.*, 1999; Traoré- Lamizana *et al.*, 2001). O ciclo deste vírus permanece por explicar suspeitando-se, no entanto, dos três grupos de vertebrados referidos como possíveis reservatórios.

Mais recentemente, foram detectados ácidos nucleicos de flavivírus designados por *insect-only*, em pools de *P. perniciosus* capturados na Argélia e com designação proposta de “*phlebotomine-associated flavivirus*” (Moreau *et al.*, 2010).

1.4.6. Métodos de captura de flebótomos

1.4.6.1. Métodos de colheita de estádios imaturos

A descoberta de estádios imaturos de flebótomos na natureza tem sido muito rara. O primeiro registo da descoberta de uma larva de flebótomo na natureza foi em Roma, em 1907 (Grassi & Bhatthacharya, 1907).

Existem quatro métodos principais que têm sido utilizados na busca sistemática de estádios imaturos de flebótomos em potenciais biótopos (Feliciangeli, 2004):

- 1) Pesquisa directa de materiais (solo, folhas, etc.), amostrados a partir de habitats potenciais, e observados em estereomicroscópios;
- 2) Extracção a partir do solo, utilizando soluções saturadas de açúcar ou sal que levam à flutuação das larvas que são depois colhidas, por exemplo em gaze, ou dessecação dos solos com luz e calor, o que força as larvas a descer no solo onde são colectadas num recipiente;
- 3) Recolha e incubação de solo em laboratório e aguardar que as larvas se transformem em adultos;
- 4) Uso de armadilhas de emergência que consistem em tubos de PVC fechados, com rede numa extremidade, e colocados em potenciais criadouros. Os flebótomos quando emergem têm tendência a deslocar-se para cima e ficam presos na rede. Estas armadilhas devem ser inspeccionadas regularmente ou então deverá utilizar-se uma substância que permita a aderência dos flebótomos à superfície da armadilha

Petrishcheva e Izumskaya (1941), com recurso ao método da flutuação, encontraram apenas 61 larvas e 91 pupas de flebótomos em seis toneladas de solo processado na Crimeia. Hanson (1961), em quatro anos de trabalho intensivo utilizando

também o método da flutuação, em combinação com lavagem através de gaze (método de *screening-flotation*), conseguiu somente 2258 larvas nos solos de uma floresta no Panamá.

Os exemplos referidos demonstram a baixa eficácia dos métodos para a captura de estádios imaturos de flebótomos, por isso, as capturas são geralmente direccionadas para os imagos.

1.4.6.2. Métodos de colheita de imagos

Os factores comportamentais dos flebótomos sobre os quais se fundamentam os métodos e as armadilhas utilizadas para a captura de imagos são:

- Fototropismo positivo (atração pela luz);
- Hematofagia e capacidade de detecção de calor e CO₂.
- Geotropismo negativo (hábito de subir quando se movimentam em direcção a um obstáculo sólido como uma parede ou uma cortina).

Existem diferentes métodos para capturar os flebótomos, vivos ou mortos, consoante o tipo de estudo que se pretende fazer.

Os métodos actualmente mais utilizados para a captura de flebótomos adultos são os aspiradores de boca, as armadilhas adesivas e as armadilhas luminosas tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Este é o método mais produtivo e mais amplamente utilizado com a adição de CO₂, como isco, na forma de gelo seco (Munstermann, 2005).

No Quadro 9 estão resumidos os principais métodos actualmente utilizados na captura de imagos de flebótomos, nomeadamente, os aspiradores de boca, as armadilhas adesivas e as armadilhas luminosas tipo CDC. Estão também referidas as áreas de estudo onde cada um destes métodos melhor se aplicam, como por exemplo, os estudos taxonómicos, de identificação de locais de repouso, de variações na

distribuição diária, sazonal ou vertical e de pesquisa de vírus. Podem ainda encontrar-se as limitações de cada tipo de método.

Quadro 9- Métodos mais utilizados para a captura de flebótomos adultos (adaptado de Maroli et al., 1997).

Método	Áreas de estudo	Limitações
Aspiradores de boca*	1) Estudos taxonómicos; 2) Identificação dos sítios de repouso; 3) Exofilia e endofilia; 4) Análise da ingestão sanguínea; 5) Determinação da infecção natural**; 6) Estabelecimento de colónias; 7) Testes de sensibilidade a insecticidas; 8) Dispersão horizontal e vertical; 9) Actividade dos flebótomos .	O método não permite capturas massivas; Possibilidade de inalação de pó e de eventuais microrganismos patogénicos.
Armadilhas adesivas	1 a 5**, 9; 10) Distribuição e densidade; 11) Variações sazonais; 12) Dispersão vertical; 13) Zoofilia***; 14) Avaliação das medidas de controlo.	O óleo perde as propriedades adesivas devido às condições atmosféricas: temperatura e humidade relativa elevadas, chuva, vento, etc.; Dano nos exemplares quando se retiram do papel adesivo.
Armadilhas luminosas tipo CDC com adição de uma fonte de dióxido de carbono (gelo seco)	1, 4**, 5**, 10, 12, 14; 15) Captura de material vivo.	Os insectos podem ser danificados pelo aspirador da armadilha; Não se controla o nível de sublimação do gelo seco; A proporção de géneros geralmente é favorável às fêmeas; As capturas são selectivas para espécies quimiotrópicas e fototrópicas.

* O método pode ser usado em capturas diurnas e nocturnas;**Apenas se os flebótomos são removidos poucas horas depois da captura e só para alguns agentes; ***Apenas em sítios perto de “isco”.

1.4.7. Prevenção e controlo de picadas de flebótomos

As medidas de controlo direccionadas para os estádios imaturos não são muito utilizadas uma vez que os locais de reprodução de flebótomos são muito difíceis de encontrar na natureza. No entanto, embora a aplicação prática de biolarvicidas seja limitada, existem alguns estudos realizados em colónias de laboratório. De Barjac e colaboradores (1981), mostraram pela primeira vez o papel de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controlo de larvas de *P. papatasi* e de *Lutzomyia longipalpis*. Robert e colaboradores (1997), baseados em trabalho de Schlein (1987) e Yuval e Warburg (1989), utilizaram com sucesso *Bacillus sphaericus* no controlo de *P. martini* no Quênia.

Devido às limitações para a eliminação de estádios imaturos de flebótomos na natureza, o combate a estes vectores é focado nos imagos e em medidas de protecção pessoal (Alexander & Maroli, 2003).

Em locais onde decorreram campanhas contra o vector da malária, com utilização de DDT, verificou-se uma diminuição do número de casos de febre por flebótomos, no entanto, pelo seu impacto ambiental, este insecticida não é autorizado (UNEP, 2001). Além disso, algumas espécies de flebótomos, nomeadamente *P. papatasi*, *P. argentipes* e *P. shortii* desenvolveram resistência a este composto (Rasti *et al.*, 1992; Alexander & Maroli, 2003; Kishore *et al.*, 2004; Gratz *et al.*, 2004;).

Em habitações humanas o uso de redes de malha fina impregnadas com insecticidas/repelentes aparenta ser a melhor solução. A aplicação tópica de compostos sintéticos do grupo dos piretróides, tais como a deltametrina ou a permetrina em pessoas ou a colocação de coleiras impregnadas com os mesmos em animais domésticos também se revela eficaz.

No que diz respeito a repelentes naturais, podem encontrar-se várias referências ao óleo da árvore *Azadirachta indica*, da família dos cedros, presente no subcontinente indiano, e também ao óleo de alho, que indicam que estes são bastante eficientes na prevenção da picada por flebótomos (Maroli, 2005 *a,b*).

Existem estudos sobre várias medidas alternativas para a prevenção da picada por flebótomos, que podem ser adoptadas por populações que se encontram em zonas de risco tais como a construção de barreiras zooprofilácticas. Estas barreiras consistem em abrigos construídos artificialmente para animais, tais como coelhos ou galinhas, em áreas peri-domésticas, que atraem os flebótomos que assim se mantêm afastados da população humana (Zhioua & Shelbi, 2005; Teodoro *et al.*, 2007).

Outro tipo de barreira consiste na plantação de plantas com efeito repelente, ou mesmo insecticida, na periferia de habitações humanas. Existem plantas ornamentais, tais como a buganvília (*Bougainvillea glabra*) ou o jasmim (*Solanum jasminoides*), tóxicas para os flebótomos que morrem após se alimentarem nas suas flores (Schlein *et al.*, 2001).

1.5. Reservatórios dos vírus da febre transmitida por flebótomos

A forma como os flebovírus se mantêm na natureza em condições climatéricas adversas (Inverno nas regiões temperadas e períodos alargados de seca nos trópicos) é, provavelmente, o aspecto menos compreendido acerca da ecologia destes vírus.

Existem várias hipóteses para tentar explicar a manutenção dos arbovírus na natureza, entre eles, a re-introdução anual dos vírus por vertebrados migradores, a persistência local dos vírus nos vectores em diapausa ou nos vertebrados hospedeiros em hibernação, a infecção crónica latente de vertebrados com virémia recorrente, ou a transmissão vertical (transovárica) do vírus no vector (Tesh *et al.*, 1992).

Até ao presente não existem provas inequívocas da existência de reservatórios vertebrados de flebovírus do grupo da febre por flebótomos. Os roedores poderão ser potenciais reservatórios, uma vez que existem casos de detecção de anticorpos específicos contra vários flebovírus, em algumas espécies destes mamíferos. Exemplos são os gerbilos, com grande prevalência de anticorpos neutralizantes para várias estirpes de flebovírus no Irão (vírus Sicília e Karimabad) (Javadian *et al.*, 1977; Ashford, 2001), e várias espécies de roedores potenciais reservatórios do flebovírus Rio Grande, no Texas, ou Icoaraci, Itaporanga, Bujaru ou Anhangá na América do Sul (Ibrahim & Sweet, 1970;

Calisher *et al.*, 1977). Outros roedores como *Apodemus spp.*, *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *Miomys glareolus*, bem como insectívoros das famílias *Talpidae* e *Soricidae* ou carnívoros, como *Mustela nivalis* também poderão estar implicados na manutenção do vírus Sicília na natureza (Chastel *et al.*, 1980; Chastel *et al.*, 1982; Chastel *et al.*, 1983; Le Lay *et al.*, 1983).

Uma estirpe do vírus Toscana foi isolada a partir do cérebro de um morcego da espécie *Pipistrellus kuhlii*, indicando um possível envolvimento desta espécie na ecologia do vírus (Verani *et al.*, 1988). Posteriormente a detecção de genoma viral de vírus Toscana em *S. minuta*, uma espécie que se alimenta exclusivamente em répteis, aponta para a possibilidade da existência de répteis reservatórios desconhecidos (Depaquit *et al.*, 2010).

Em resumo, com os dados que existem actualmente, os roedores, insectívoros, quirópteros, carnívoros e ainda os répteis são os potenciais reservatórios de flebovírus.

Até ao presente os conhecimentos disponíveis parecem indicar que o principal mecanismo de manutenção na natureza do vírus Toscana é a transmissão transovárica. Esta hipótese tem sido confirmada pelo isolamento de flebovírus em machos (não hematófagos) infectados naturalmente (Tesh *et al.*, 1977a; Verani *et al.*, 1988).

Estudos laboratoriais confirmaram que alguns flebovírus podem ser transmitidos transovaricamente das fêmeas infectadas (oral ou parentericamente) à sua descendência (Ciufolini *et al.*, 1985, 1989; Maroli *et al.*, 1993). Assim, os vírus Toscana e Arbia foram mantidos em colónias laboratoriais de *P. perniciosus* durante algumas gerações sucessivas (Ciufolini *et al.*, 1989). É também provável que a transmissão horizontal (venérea) entre flebótomos seja essencial para a manutenção dos focos de infecção (Ashford, 2001, Maroli *et al.*, 1993).

Resultados obtidos em estudos experimentais sobre transmissão transovárica de vírus Toscana em fêmeas de *P. perniciosus* (Tesh *et al.*, 1987), no entanto, mostram uma taxa de infecção da progenia inferior a 100%, sugerindo a impossibilidade do vírus sobreviver indefinidamente por este mecanismo, necessitando, assim, de uma amplificação periódica num hospedeiro vertebrado.

Acredita-se assim que estes arbovírus poderão utilizar mais do que um mecanismo de manutenção para assegurar a sua sobrevivência na natureza (Tesh *et al.*, 1992).

1.6. Contextualização e objectivos do trabalho

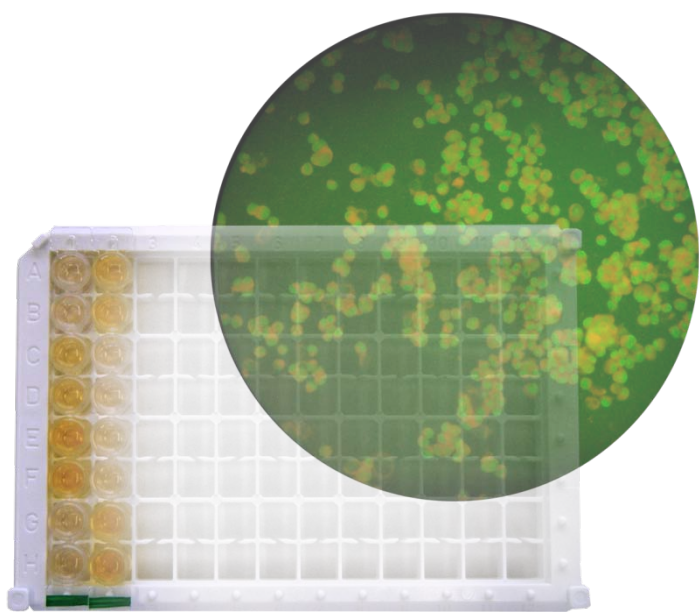
O vírus Toscana, (género *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*) é um vírus neurotrópico que circula na Bacia do Mediterrâneo. Apesar de se desconhecer o vector responsável pela transmissão do vírus no nosso país, sabe-se que o vector confirmado noutros países endémicos é a espécie *P. perniciosus*, uma espécie amplamente distribuída e muito abundante em Portugal. O reservatório do vírus Toscana na natureza é actualmente desconhecido.

Neste contexto, e com o objectivo de esclarecer a importância actual dos *Phlebovirus* em Saúde Pública em Portugal, foram definidos vários objectivos específicos:

- Padronizar o diagnóstico serológico de flebovírus;
- Realizar estudos sero-epidemiológicos na população humana (grupo controlo, grupos de risco e grupos com indivíduos com sintomas compatíveis com a febre transmitida por flebótomos) para detectar contactos anteriores com flebovírus e caracterizar os sinais e sintomas nas infecções recentes ou activas;
- Realizar estudos serológicos em amostras de vertebrados selvagens e domésticos na tentativa de detectar potenciais reservatórios;
- Realizar capturas de flebótomos, identificar os espécimes encontrados, e determinar as espécies mais abundantes e a sua distribuição;
- Detectar, isolar e caracterizar estirpes de flebovírus e flavívirus em flebótomos.

Todos os trabalhos laboratoriais foram executados no Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac (CEVDI) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em colaboração com o Istituto Superiore di Sanità (ISS), laboratório italiano de referência para o estudo de flebovírus, sediado em Roma.

II- Padronização das técnicas de diagnóstico serológico



2.1. Introdução

O Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac (CEVDI) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge é um centro de referência para o estudo dos arbovírus em Portugal. No laboratório de virologia deste Centro é realizado o diagnóstico dos vírus *West Nile*, dengue, febre amarela e encefalite transmitida por carraças (TBE) do género *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, dos vírus Dhori e Thogoto do género *Thogotovirus*, família *Orthomyxoviridae* e ainda do vírus Chikungunya, género *Alphavirus*, família *Togaviridae*.

Para a implementação do diagnóstico de flebovírus neste Centro, foi desenvolvida a técnica de IFI *in house*. Como técnica de confirmação foi seleccionada uma ELISA com kit comercial utilizada no diagnóstico em quase todos os países da região Mediterrânica.

O objectivo foi comparar os parâmetros das duas técnicas, nomeadamente, a sensibilidade e a especificidade e também avaliar o grau de concordância entre ambas, no que se refere à detecção de imunoglobulinas G e M.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Técnica de Imunofluorescência indirecta

A técnica de imunofluorescência permite a detecção qualitativa e quantitativa de anticorpos anti-virais em amostras biológicas. Na técnica de IFI os anticorpos do soro, se presentes, ligam-se ao antigénio em células previamente infectadas com vírus, em suporte sólido (lâminas de antigénio), formando-se imunocomplexos estáveis. Pela adição de um anticorpo secundário, conjugado com compostos fluorescentes, tal como por exemplo a fluoresceína, que reconhece as Ig da espécie animal à qual pertence a amostra de soro, é revelada, por microscopia de fluorescência, a presença dos imunocomplexos, pelo aparecimento de cor verde fluorescente (no caso da utilização da fluoresceína) (Hodinka, 1999; Leland 1999).

2.2.1.1. Preparação das lâminas de antigénio

Para a preparação das lâminas de antigénio processou-se o seguinte protocolo:

1. Inoculou-se 100 µl da suspensão stock de vírus Toscana (estirpe italiana ISS. Phl.3, cedida pelo ISS) em frascos de cultura T-25 com monocamada de células VERO E6¹; manteve-se um frasco não inoculado para controlo negativo (branco);
2. Incubou-se os frascos durante uma hora a 37°C;
3. Acrescentou-se 10 ml de meio de cultura MEM² com 10% de (FBS)³ e com 0,1% de antibiótico e antimicótico⁴ e colocou-se na estufa a 37°C durante três dias até se observar efeito citopático;
4. Após observação de efeito citopático rejeitou-se o meio, lavou-se as células com PBS⁵ e de seguida com 0,5 ml de tripsina-EDTA⁶;
5. Rejeitou-se a tripsina-EDTA, adicionou-se mais 1 ml e deixou-se actuar durante 30 segundos;
6. Rejeitou-se o excesso de tripsina-EDTA e colocou-se na estufa a 37°C durante 10 minutos;
7. Soltou-se as células de cada frasco e suspendeu-se em 4 ml de PBS;
8. Pipetou-se 10 µl da suspensão de células infectadas em cada um dos poços de uma linha de uma lâmina teflonada e outra linha com 10 µl da suspensão de células não infectadas para uma prova de IFI (descrita a seguir) utilizando, como controlo positivo, anticorpo monoclonal anti-vírus Toscana (cedido pelo CDC);
9. Após a validação da qualidade do antigénio, preparou-se uma suspensão de células não infectadas e células infectadas na razão 1:3; pipetou-se as lâminas teflonadas com 10 µl desta solução por poço;
10. Secou-se durante uma hora e fixou-se durante 15 minutos em acetona a -20°C;
11. Secou-se, acondicionou-se em papel absorvente e alumínio e guardou-se a -20°C, por períodos inferiores a um ano, até à sua utilização.

¹ Código ATCC: CRL1586

² *Minimum Essential Medium* ref: 21090-022-Gibco

³ *Fetal bovine serum* ref: 10500-056- Gibco

⁴ *Antibiotic – Antimycotic (100X)*, ref: 15240- Gibco

⁵ *Phosphate Buffered Saline*- ref: BE 17-517 Q- Lonza

⁶ Tripsina, 0,05% (1X) com EDTA; Ref: 25300-054 Gibco

2.2.1.2. Serologia

Para a realização das provas de serologia, as lâminas preparadas anteriormente foram descongeladas e novamente fixadas em acetona gelada durante 10 minutos.

Os soros a testar foram diluídos em PBS a 1:32 para a pesquisa de anticorpos IgG e a 1:16 para a pesquisa de anticorpos IgM.

O procedimento realizado foi o seguinte:

1. Pipetou-se nas lâminas, na primeira coluna de poços, um soro negativo, um branco (PBS) e um soro positivo (CDC). Nos restantes poços colocou-se as diluições dos soros a testar;
2. Incubou-se as lâminas durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida;
3. Lavou-se as lâminas em PBS com agitação, duas vezes durante 5 minutos;
4. Adicionou-se 10 µl do anticorpo secundário, produzido em coelho, conjugado com fluoresceína- anti-imunoglobulinas humanas IgA, IgG, IgM, Kappa e Lambda⁷ (diluído a 1:50) ou IgM⁸ (diluído a 1:40);
5. Incubou-se as lâminas durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida;
6. Lavou-se as lâminas em PBS com agitação duas vezes durante 5 minutos;
7. Passou-se as lâminas por água destilada, secou-se e montou-se em glicerina com Dabco tamponada⁹;
8. Observou-se as lâminas ao microscópio de fluorescência Olympus BX41 com uma ampliação de 400x.

⁷ Ref: F0200- Dako

⁸ Ref: F203- Dako

⁹ 2,5g Dabco (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) + 90 ml de glicerol (Propano-1,2,3-triol) + 10 ml + PBS

2.2.2. Técnica de Enzyme Linked Immunosorbent Assay

A ELISA é uma técnica imunoenzimática que permite a detecção de anticorpos ou de antígenos presentes numa determinada amostra. Nesta técnica ocorre a ligação de um anticorpo (ou de um antígeno) a um substrato seguida pela adição de uma molécula ligada a uma enzima ao anticorpo (ou ao antígeno). A presença do anticorpo (ou do antígeno) é revelada pelo desenvolvimento de cor numa reacção que é catalisada pela enzima que está ligada a esse anticorpo (ou antígeno). Geralmente a técnica de ELISA é executada em placas de poliestireno.

Neste trabalho, os testes de ELISA foram realizados com o kit comercial, *Enzywell Toscana virus IgG/IgM*¹⁰. Este método é utilizado para a determinação qualitativa de anticorpos IgG e IgM anti -vírus Toscana em soros humanos (Soldateschi *et al.*, 1999).

A determinação de IgG foi feita por ELISA indirecta. Nesta caso a fase sólida encontra-se previamente revestida com uma nucleoproteína recombinante de vírus Toscana. As IgG específicas presentes na amostra ligam-se à fase sólida e são detectadas por incubação posterior com anticorpo monoclonal anti-humano, produzido em ratinho, conjugado com peroxidase (POD).

As IgM foram detectadas pelo método de ELISA de captura. No kit utilizado a fase sólida encontra-se revestida com um anticorpo monoclonal anti-IgM humano, produzido em ratinho. As IgM totais presentes no soro ligam-se à fase sólida. Depois da lavagem, adiciona-se um complexo composto por uma nucleoproteína recombinante biotinilada e um conjugado streptavidina-peroxidase (POD).

Em ambos os casos, o complexo total (para IgG: IgG específico anti-vírus Toscana com anti-IgG marcado com POD; para IgM: IgM-nucleoproteína-biotina/streptavidina-POD) é determinado pela adição do substrato que altera a cor na presença de POD. Obtém-se depois uma cor estável pela adição de uma solução de bloqueio.

¹⁰ Diesse

Execução da técnica de ELISA

O procedimento realizado consistiu no seguinte:

- 1) Colocou-se 100 µl das amostras diluídas (10 µl de soro em 1 ml de tampão de diluição¹¹) e dos controlos nos poços da placa de poliestireno;
- 2) Incubou-se as placas durante 45 minutos a 37°C;
- 3) Lavou-se 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem¹²;
- 4) Adicionou-se 100 µl do conjugado a cada poço (anti IgG¹³ para a determinação de IgG; complexo antigénio/conjugado¹⁴ para determinação de IgM);
- 5) Incubou-se as placas durante 4 minutos a 37°C;
- 6) Lavou-se 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem;
- 7) Adicionou-se 100 µl de substrato¹⁵ a cada poço;
- 8) Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente;
- 9) Adicionou-se 100 µl de solução de bloqueio¹⁶ a cada poço;
- 10) Leu-se a absorvância a um comprimento de onda de 450 nm, num intervalo máximo de 30 minutos. Neste caso, para a leitura, foi utilizado um espectrofotómetro *Coda- Automated EIA Analyzer*¹⁷.

De acordo com as instruções do fabricante, uma amostra é considerada positiva quando a absorvância de uma amostra é superior à do cut-off¹⁸. Calculando a razão entre a média dos valores de comprimento de onda da amostra e a média dos valores de comprimento de onda do cut-off, a amostra é considerada positiva se a razão for >1,2; duvidosa se a razão for entre 0,8 e 1,2 e negativa se a razão for <0,8.

¹¹ PBS com 10% de proteínas w/v e azida de sódio (NaN₃) com laranja de metilo como corante

¹² PBS [10X] diluído 1:10

¹³ Anticorpos IgG anti-humanos marcados com peroxidase, numa solução de PBS com fenol a 0,05% e Bronidox (5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxano) a 0,02%

¹⁴ Antigénio recombinante de vírus Toscana ligado a biotina em PBS contendo lactose + streptavidina conjugada com peroxidase em solução tampão

¹⁵ Tetrametilbenzidina 0,26 mg/ml e peróxido de hidrogénio estabilizado em tampão citrato 0,05 mol/l (ph 3,8).

¹⁶ H₂SO₄ 0,3 mol/l

¹⁷ Bio-Rad

¹⁸ Soro humano diluído com uma quantidade conhecida de IgG ou IgM em tampão fosfato salino 0,01 mol/l com BSA 1% e azida de sódio

2.2.3. Determinação da sensibilidade, especificidade e índice de concordância de *Kappa*

No âmbito deste trabalho, os testes serológicos realizados em amostras humanas (n= 978) permitiram-nos avaliar, em termos de sensibilidade e de especificidade, as técnicas de IFI e de ELISA, em relação aos anticorpos tipo IgG e IgM.

A sensibilidade é descrita como a proporção de amostras verdadeiramente positivas e identificadas correctamente pelo teste e é calculada pela razão:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{amostras positivas identificadas no teste}}{\text{amostras verdadeiramente positivas}}$$

A especificidade, descrita como a proporção de amostras verdadeiramente negativas identificadas correctamente pelo teste é calculada pela razão:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{amostras negativas identificadas no teste}}{\text{amostras verdadeiramente negativas}}$$

O valor máximo de sensibilidade e especificidade é 1, ou seja, 100%.

O índice de concordância *Kappa* (K) mede a concordância entre diferentes medidas, métodos ou instrumentos de medição (Fleiss, 1981). A fórmula aplicada para o cálculo deste índice foi:

$$\text{Índice de concordância} = \frac{a+d}{n}$$

Em que:

a é o número de resultados negativos por ambas as técnicas;

d representa o número de resultados positivos por ambas as técnicas e

n o número total de amostras testadas (Quadro 10).

Quadro 10– Estatística de Kappa para medir a concordância entre os métodos utilizados.

		ELISA		
		Negativos	Positivos	Total
IFI	Negativos	a	b	a+b
	Positivos	c	d	c+d
	Total	a+c	c+d	n

O valor de *Kappa* situa-se num intervalo de 0 a 100%, em que 0 significa ausência de concordância e 100% significa uma concordância total entre as técnicas. A partir de 80% o nível de concordância é considerado excelente (Fleiss, 1981).

2.3. Resultados

No total foram determinadas, pela técnica de IFI, 29 amostras positivas para IgG. Quando testadas por ELISA, 26 revelaram-se positivas. No Quadro 11 apresenta-se o número de amostras estudadas e os resultados, positivos e negativos para IgG.

Quadro 11- Número de amostras testadas por ambas as técnicas (IFI e ELISA) para a presença de IgG.

	IFI	ELISA
52	29 positivas	26 positivas
	23 negativas	26 negativas

No que se refere às IgM, foram detectadas, pela técnica de IFI, 11 amostras positivas tendo sido confirmadas, pela técnica de ELISA, cinco das amostras. No Quadro 12 apresenta-se o número de amostras estudadas e os resultados, positivos e negativos para IgM.

Quadro 12-Número de amostras testadas por ambas as técnicas (IFI e ELISA) para a presença de IgM.

n	IFI in house	-Co [®] DIESSE
39	11 positivas	5 positivas
	28 negativas	34 negativas

A sensibilidade do kit de ELISA, segundo o fabricante é de 95% para IgG e 100% para IgM. A especificidade é 96,5% para IgG e 100% para IgM (Soldateschi *et al.*, 1999).

A sensibilidade da IFI *in house* foi de 100 %, tanto para IgG como para IgM. A especificidade da IFI *in house* foi 88% para IgG e 82% para IgM.

A proporção de concordância entre IFI *in house* e ELISA comercial para IgG calculada pelo índice *Kappa* foi 94%. A proporção de concordância entre IFI *in house* e ELISA comercial para IgM foi de 84%. Estes valores de concordância estão no intervalo considerado excelente (Fleiss, 1981).

2.4. Conclusões e discussão

Os métodos serológicos para a detecção de anticorpos são de rápida execução e permitem fornecer informação de diagnóstico poucas horas após a recepção da amostra no laboratório. No presente trabalho foi implementada uma técnica de IFI preparada *in house*. Uma das vantagens da IFI é que se trata de uma técnica rápida e sensível. Para alguns vírus, no entanto, poderá ter como desvantagens o facto de poder ter uma especificidade variável e depender da qualidade da amostra (Jeffery and Pillay, 2004). Por esse motivo é desejável ter sempre uma técnica de confirmação, neste caso a

técnica de ELISA com sensibilidade e especificidade conhecidas. A desvantagem do kit comercial reside no facto de ser bastante dispendioso, sobretudo quando se testa um reduzido número de amostras. Para se tornar rentável, deverá ser testado um grande número de amostras em simultâneo, o que nem sempre é possível uma vez que as solicitações de diagnóstico no caso do vírus Toscana são raras.

Os resultados da comparação das duas técnicas serológicas permitiram concluir que, em relação à detecção de anticorpos IgG, houve diferença de resultados em 3 soros, (de 2 indivíduos), que foram seropositivos por IFI e não por ELISA.

As reacções cruzadas entre anticorpos IgG anti-flebovírus têm sido observadas em diversas técnicas tais como *immunoblot*, testes de fixação do complemento e IFI, nomeadamente entre os vírus Toscana e Sicília (Schwarz *et al.*, 1996) Toscana e Nápoles (Tesh *et al.*, 1976; Eitrem *et al.*, 1991), e Toscana e Punique (Zhioua *et al.*, 2010). Assim, existe a possibilidade de estes resultados discordantes reflectirem a existência de reacções cruzadas com outros flebovírus do grupo da febre por flebótomos que possam existir em circulação no nosso país.

Em relação às IgM, houve discordância em 6 amostras (de 5 indivíduos).

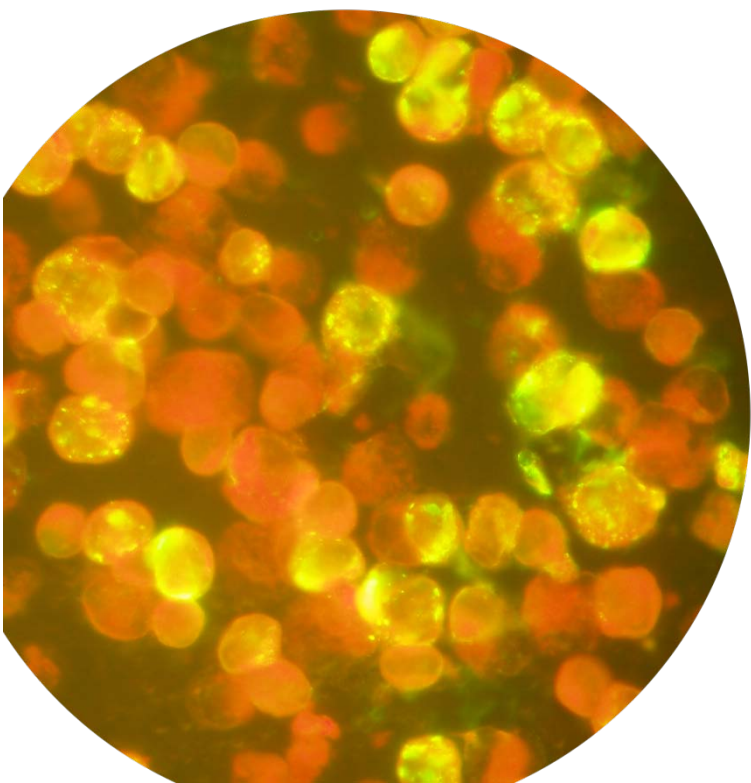
Em dois dos indivíduos foram detectados, nas amostras testadas para IgM, reacções inespecíficas tanto para flebovírus como para outros arbovírus, por IFI, sendo negativas por ELISA.

Uma hipótese para justificar a discordância de resultados é a possibilidade de existir factor reumatóide, não confirmado, no soro dos indivíduos em questão (Hodinka, 1999; Nicoletti *et al.*, 1991). Recentemente foi descrito um caso de infecção por *Yersinia* que causou uma síndrome de artrite reactiva que aparentou ser uma infecção por vírus Toscana e que levou a resultados positivos por IFI para IgM contra este vírus (Tappe *et al.*, 2009).

A sensibilidade da IFI desenvolvida no laboratório é superior à do método de ELISA, no entanto, a especificidade é inferior.

O facto de poderem ser detectadas reacções cruzadas entre os flebovírus do serogrupo da febre por flebótomos na técnica de IFI, poderá ser uma vantagem quando se estão a prospectar áreas onde possam estar presentes vários serótipos ou serótipos desconhecidos de vírus Toscana.

III- Vigilância epidemiológica de flebovírus em populações humanas



3.1. Introdução

Em 1980, Filipe mencionou a detecção, pela técnica de inibição de hemaglutinação, de anticorpos anti-vírus Sicília em soros de uma população portuguesa. Depois desse estudo, e até ao presente, os casos descritos de detecção de anticorpos anti-flebovírus foram esporádicos e são referentes a viajantes estrangeiros que desenvolveram sintomatologia após estadia no nosso território (Ehrnst *et al.* 1985, Schwarz *et al.*, 1995b).

No presente trabalho procedeu-se à avaliação da prevalência de anticorpos anti-flebovírus em vários tipos de populações portuguesas. A amostra de estudo incluiu diferentes populações de indivíduos: uma população controlo, de doadores de sangue, uma população de risco que incluiu indivíduos com actividades no exterior e com exposição comprovada a picadas por artrópodes e, uma população de indivíduos doentes com sintomatologia de doença compatível com infecção por arbovírus.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Amostras estudadas

3.2.1.1. População controlo

A população controlo consistiu num grupo de doadores de sangue, cujas amostras foram obtidas através de um protocolo estabelecido entre o CEVDI e o Instituto Português do Sangue (IPS).

Segundo o IPS, os doadores de sangue são indivíduos saudáveis, com idades entre os 18 e os 65 anos e com peso superior a 50 quilos, sendo cada colheita de sangue precedida de exame médico para despiste de várias doenças, entre as quais doenças cardíacas, hepáticas, pulmonares ou neoplásicas, tendência anormal para hemorragias, gravidez, terapêutica medicamentosa, anemia, alterações de frequência cardíaca ou de pressão arterial, assim como doenças infecciosas como sífilis, hepatites B e C e HIV (IPS 2007).

Devido às características desta população, este grupo foi considerado grupo controlo.

3.2.1.2. População de risco

As populações que vivem em zonas rurais e/ou com actividade no exterior são as que se encontram em maior risco de contrair infecções por flebovírus ou por outros arbovírus (D'Ovidio *et al.*, 2008). Neste trabalho, a população de risco estudada consistiu em vários grupos de indivíduos que se encontravam nessas condições. Assim, foram testadas amostras de quatro grupos, designadamente trabalhadores ao ar livre, anilhadores de aves, técnicos de saúde ambiental e caçadores.

Para este estudo foi realizado, para além de um consentimento informado, um inquérito que os indivíduos preenchiam com os dados epidemiológicos (género, idade, actividade profissional, historial de contacto com potenciais vectores ou reservatórios, etc.

Além destes grupos, e uma vez que os indivíduos com anticorpos anti-leishmania tiveram obrigatoriamente contacto com flebótomos, foram incluídos na população de risco, indivíduos com anticorpos específicos anti-leishmania.

3.2.1.3. População de indivíduos sintomáticos com requisição de diagnóstico laboratorial para vírus transmitidos por vectores

Grupo I: indivíduos com sinais e sintomas neurológicos

Os aspectos clínicos e laboratoriais no decurso da infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo vírus Toscana não são distinguíveis daqueles causados por outros agentes virais. Apenas critérios epidemiológicos, como a sazonalidade e o contacto provável com o vector, podem constituir um critério para a suspeita de infecção por este vírus (Braitto *et al.*, 1998b). Assim, foi realizado um estudo retrospectivo de todos os soros de indivíduos com sintomas neurológicos que deram entrada no CEVDI, com

solicitação de diagnóstico laboratorial para vírus transmitidos por vectores, entre os anos de 2004 e 2008 inclusive.

Grupo II: indivíduos sem sinais ou sintomas neurológicos

Apesar de o vírus Toscana ser conhecido pelo seu neurotropismo, está provado que este nem sempre causa doença do SNC, podendo as infecções manifestar-se como uma síndrome febril ou semelhante a gripe (Braito *et al.* 1997; Portolani, 2002). Por este motivo estudaram-se, igualmente, amostras de indivíduos com pedido de diagnóstico laboratorial para arbovírus e para o vírus da coriomeningite linfocitária (género *Arenavirus*, família *Arenaviridae*), que apresentavam síndrome febril de origem desconhecida.

Nas infecções por vírus da coriomeningite linfocitária, transmitida por roedores, tal como no caso das infecções por arbovírus, a patologia pode ser assintomática ou ligeira, com sintomas semelhantes aos gripais ou manifestar-se como meningite asséptica ou meningoencefalite.

3.2.2. Técnicas utilizadas nos estudos seroepidemiológicos

No âmbito da realização de inquéritos epidemiológicos para a detecção de arbovírus, são recomendadas técnicas de imunofluorescência ou imunoenzimáticas, devido à rapidez com que são executadas e à possibilidade de se testar um grande número de amostras (De Ory-Manchón, 2009; De Ory-Manchon *et al.*, 2007).

Neste trabalho as amostras foram testadas pela técnica IFI. Como teste confirmatório, sempre que se detectaram anticorpos do tipo IgG ou IgM anti-vírus Toscana, foi utilizado o método de ELISA comercial, de acordo com os resultados obtidos na padronização destas técnicas, que revelaram a IFI como mais sensível e a ELISA mais específica. Os procedimentos laboratoriais foram descritos em II- Padronização das técnicas de diagnóstico serológico.

No caso da técnica de IFI, um indivíduo foi considerado como tendo infecção activa ou recente quando a respectiva amostra reunia uma das seguintes condições: i)

demonstração de seroconversão de negativo para positivo; ii) aumento do título de anticorpos, de pelo menos quatro vezes, relativamente a duas amostras consecutivas com 2 a 4 semanas de intervalo e iii) presença de anticorpos IgM \geq 16 (Hodinka, 1999). A presença de anticorpos IgG demonstra uma exposição prévia ao vírus. Em todas as amostras determinadas positivas, quer para IgG quer para IgM, procedeu-se a diluições sucessivas para determinação do título.

A técnica serológica que permite distinguir serótipos dentro do grupo dos flebovírus consiste em testes de neutralização por redução em placas (*Plaque Reduction Neutralization Tests* - PRNT) (Tesh *et al.*, 1975; Liu *et al.*, 2003). As amostras positivas por uma ou por ambas as técnicas anteriores foram enviadas para o ISS para a realização destes testes.

No PRNT, monocadas de células infectadas com diluições sucessivas de vírus interagem com diluições sucessivas de anticorpos nos soros até ser determinado um valor em que uma determinada diluição de anticorpos de um soro neutraliza uma determinada diluição viral (WHO, 2007b).

Os PRNT foram realizados em placas de 24 poços com monocamadas de células VERO E6 sub-confluentes. Os soros foram diluídos 1:10 em meio de manutenção, inactivados a 56°C por 30 minutos, e titulados em duplicado. Volumes iguais da diluição de vírus (80 *Plaque Formation Units*- PFU) e diluições de soro foram misturados e incubados *overnight* a 4°C antes da inoculação. Depois da adsorção durante uma hora a 37°C com CO₂ a 5%, os inóculos foram aspirados e os poços cobertos com uma mistura a 1:1 de goma de tragacanto a 2% e MEM 2X suplementado com 2,5% de FBS inactivado e HEPES¹⁹ 1M a 2%. As culturas foram depois incubadas a 37°C com CO₂ a 5% durante uma semana, após o que foram coradas com cristal violeta²⁰, a 1,5%.

Os títulos dos anticorpos neutralizantes foram calculados como o recíproco da diluição de soro que reduziu em 80% o número das placas virais (NT80), quando comparado com o número de placas do vírus de controle. Títulos \geq 10 foram considerados positivos (Nicoletti *et al.*, 1996).

¹⁹ 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid - SIGMA

²⁰ C₂₄H₂₈N₃Cl

3.2.3. Cálculos estatísticos

O teste estatístico utilizado para se medir a probabilidade de as diferenças encontradas nos grupos da amostra serem devidas ao acaso ou não, partindo do pressuposto que, na verdade, não há diferenças entre os dois grupos na população de onde provêm foi o teste exacto de Fisher realizado com recurso ao software *R Project* (versão 2.11.0). O teste exacto de Fisher testa diferenças entre dois grupos independentes (G1 e G2), em relação a uma variável qualquer que só admita duas alternativas como resposta: Sim/Não, Positivo/Negativo, ou +/- (Zar, 1999).

A hipótese nula foi rejeitada sempre que $p < 0,05$.

3.3. Resultados

3.3.1. População controlo

A população controlo foi composta por 150 indivíduos dos distritos de Lisboa, Setúbal e Santarém. O cálculo do número da amostra teve em conta o número de habitantes de cada distrito de maneira a que cada amostra fosse representativa para o total de soros.

Os distritos de Lisboa, Setúbal e Santarém contribuem com 63,2%, 23,3% e 13,5% da população, respectivamente, para o total nacional. A transposição dos valores de percentagem calculados, para os distritos seleccionados e para a amostra de 150 dadores, resultou em 95 soros para Lisboa, 35 para Setúbal e 20 para Santarém.

No total da amostra foram detectados três soros (2%) com anticorpos IgG. Em termos de percentagens obteve-se 4,2% para Santarém, 1,1% para Lisboa e 2,9% para Setúbal. As amostras positivas de Lisboa e Setúbal foram confirmadas por PRNT, com a estirpe ISS.Ph.3.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas em relação à prevalência de anticorpos para os três distritos ($p=0,34$).

3.3.2. População de risco

A população considerada de risco foi composta por 236 indivíduos.

O primeiro grupo da população de risco foi constituído por trabalhadores do Algarve, região onde exerciam a sua actividade profissional ao ar livre, pelo menos durante os dois anos anteriores ao estudo. A amostra consistiu numa população de 90 indivíduos, sendo 81 do género masculino e 9 do género feminino, com idades compreendidas entre os 26 e os 70 anos.

Neste inquérito detectaram-se três serologias positivas (3,3%) para anticorpos do tipo IgG. Os três casos positivos eram indivíduos do género masculino, com 57, 67 e 70 anos. Um dos soros foi confirmado por PRNT com a estirpe ISS.Ph1.3.

Concluiu-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos etários ($p=0,007$), verificando-se uma maior probabilidade de ocorrência de seropositivos nos grupos etários mais elevadas.

O segundo grupo de risco foi composto por anilhadores de aves, pessoas que passam muito tempo ao ar livre e em contacto com animais. Estudaram-se 37 soros de indivíduos de ambos os géneros, 26 do género masculino e 11 do género feminino, com idades compreendidas entre os 17 e os 67 anos. Um indivíduo (2,7%) do género feminino com 32 anos apresentou anticorpos do tipo IgG anti-vírus Toscana.

Neste grupo a probabilidade de ocorrerem seropositivos para anticorpos IgG anti-vírus Toscana foi igual para os vários grupos etários uma vez que não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,61$).

O terceiro grupo estudado foi constituído por 37 técnicos de saúde ambiental. A população estudada consistiu em 14 indivíduos do género masculino e 23 do género feminino, provenientes de vários pontos do país e com idades compreendidas entre os 25 e os 55 anos.

Destes 37 participantes, um do género feminino (2,7%), com 27 anos apresentou anticorpos do tipo IgG anti-vírus Toscana.

Tal como no inquérito anterior não se encontraram diferenças estatisticamente significativas e podemos dizer que nesta amostra a probabilidade de ocorrerem seropositivos foi igual para os vários grupos etários ($p=0,61$).

O quarto grupo estudado foi composto por 39 caçadores. Estes indivíduos eram todos caçadores na região de Évora, do género masculino e tinham idades compreendidas entre os 21 e os 72 anos.

Um indivíduo (2,6%), com 66 anos de idade, apresentou anticorpos IgG anti-vírus Toscana. Também neste grupo a probabilidade de ocorrerem seropositivos foi igual para os vários grupos etários ($p=0,70$).

No quinto grupo considerado de risco, foram estudados 33 soros de indivíduos com anticorpos anti-leishmania, provenientes de várias localidades não tendo sido possível obter qualquer tipo de informação acerca das idades. Dois indivíduos (6,1%) apresentaram anticorpos IgG anti- vírus Toscana.

No total da população considerada de risco foram detectados anticorpos IgG anti-vírus Toscana em oito indivíduos. No Quadro 13 resume-se o número total de indivíduos estudados em cada grupo, as percentagens de soros positivos IgG anti-vírus Toscana e os valores de p calculados em relação à população controlo (dadores de sangue).

Quadro 13- Resultados do inquérito seroepidemiológico da população considerada de risco e respectivos valores de p calculados em relação à população controlo.

Grupo	n	Positivos (%)	Valor de P
Trabalhadores do Algarve ao ar livre	90	3 (3,3)	0,67
Anilhadores	37	1 (2,7)	1,00
Técnicos de Saúde ambiental	37	1 (2,7)	1,00
Caçadores	39	1 (2,6)	1,00
Indivíduos com anticorpos anti- leishmania	33	2 (6,1)	0,22
Total	236	8 (3,4)	0,53

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as seroprevalências de anticorpos IgG anti-vírus Toscana nas duas populações (população controlo e população de risco).

3.3.3. População de indivíduos sintomáticos com requisição de diagnóstico laboratorial para vírus transmitidos por vectores

Grupo I: indivíduos com sinais e sintomas neurológicos

Estudaram-se 184 soros de 165 indivíduos com vários quadros de doença neurológica provenientes de Serviços de Saúde de todo o país, entre 2004 e 2008, inclusive. As amostras chegaram de dez distritos de Portugal continental, sobretudo do litoral (Figura 9). O distrito com maior número de soros estudados foi Coimbra (n= 52), seguido por Lisboa (n= 48) e Faro (n= 33).

A maioria das solicitações de diagnóstico laboratorial relativas a indivíduos com sintomas neurológicos foi para vírus da coriomeningite linfocitária (n=92), seguido de arbovírus (n=51), e do vírus Toscana, *per se*, em último lugar na lista de solicitações (n=22), uma vez que este também está incluído no painel dos arbovírus (Quadro 14).

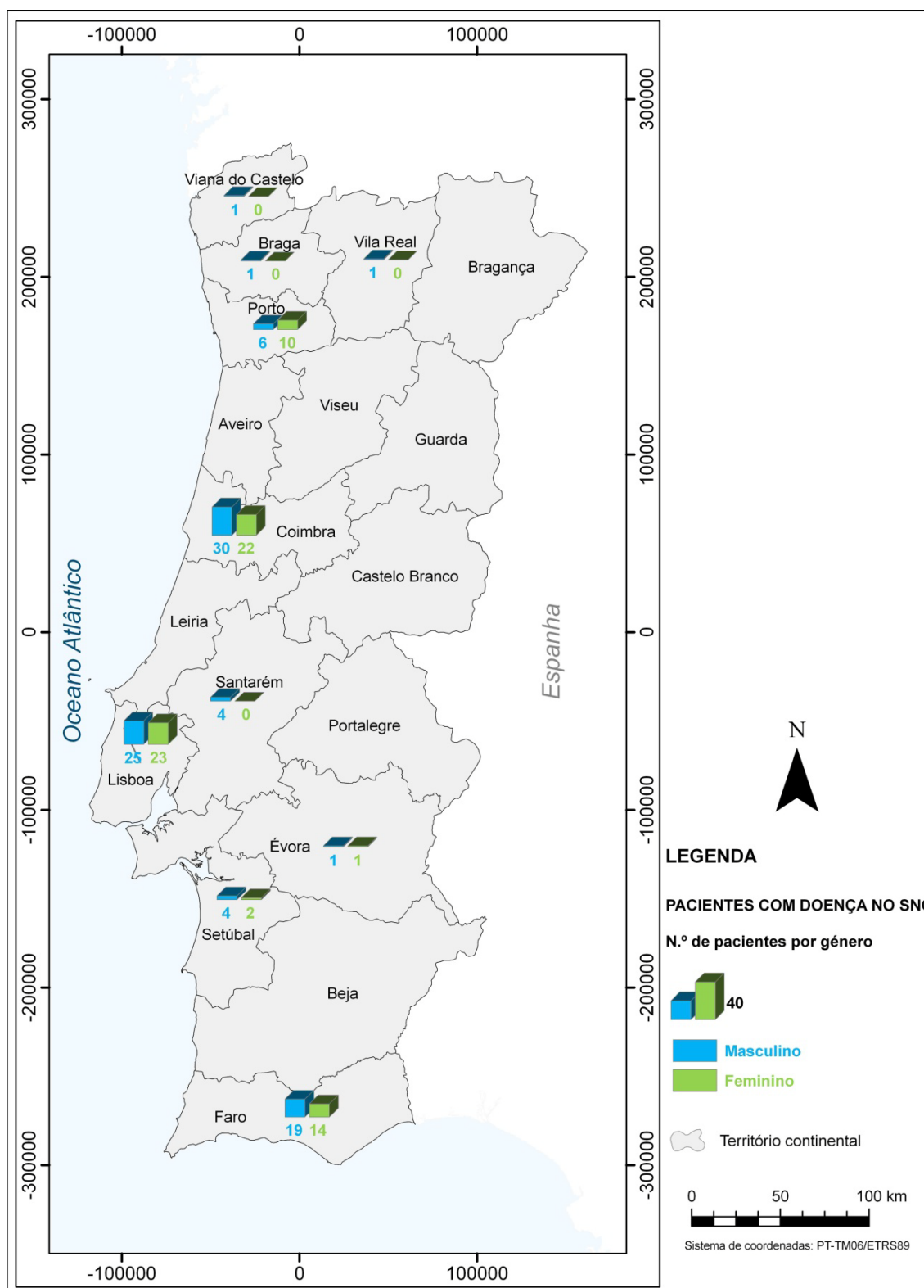


Figura 9 - Distritos dos Serviços de Saúde que solicitaram diagnóstico laboratorial ao CEVDI para indivíduos com sintomas neurológicos.

Quadro 14- Solicitações de diagnóstico laboratorial para indivíduos com sintomas neurológicos.

Diagnóstico solicitado	Ano					Total
	2004	2005	2006	2007	2008	
Vírus Toscana	2	0	8	5	7	22
Arbovírus	11	6	12	12	10	51
Vírus da coriomeningite linfocitária	19	20	26	12	15	92
Total	32	26	46	29	32	165

Foram estudados 72 (43,6%) indivíduos do género feminino e 93 (56,4%) do género masculino (Figura 10).

O número de solicitações de diagnóstico foi semelhante nos vários anos. A média foi de 33 casos por ano, variando entre um mínimo de 26 em 2005 e um máximo de 46 em 2006

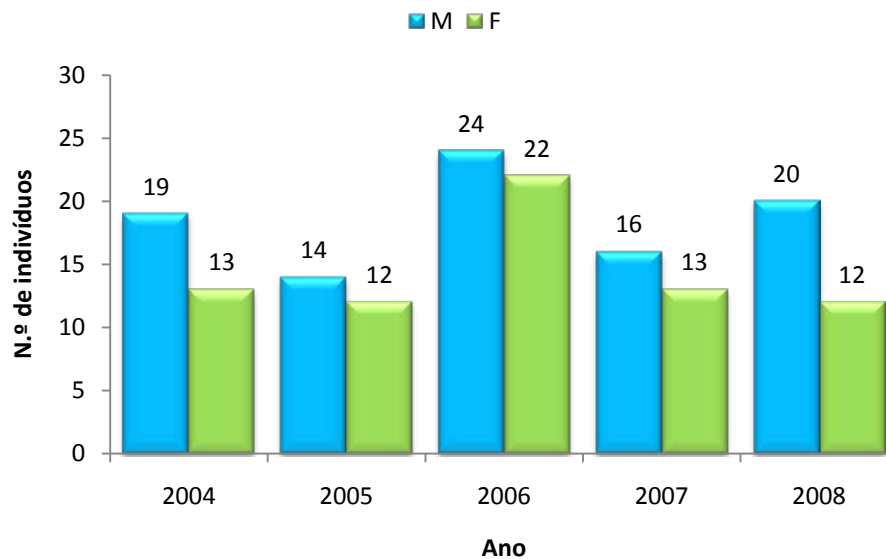


Figura 10 - Distribuição e género dos indivíduos com sintomas neurológicos por ano.

A idade variou entre os dois e os 85 anos (Figura 11).

O maior número de solicitações de diagnóstico laboratorial verificou-se na classe etária dos 30-39 anos apesar de existirem 13 indivíduos cujas idades não foram especificadas nos respectivos relatórios clínicos.

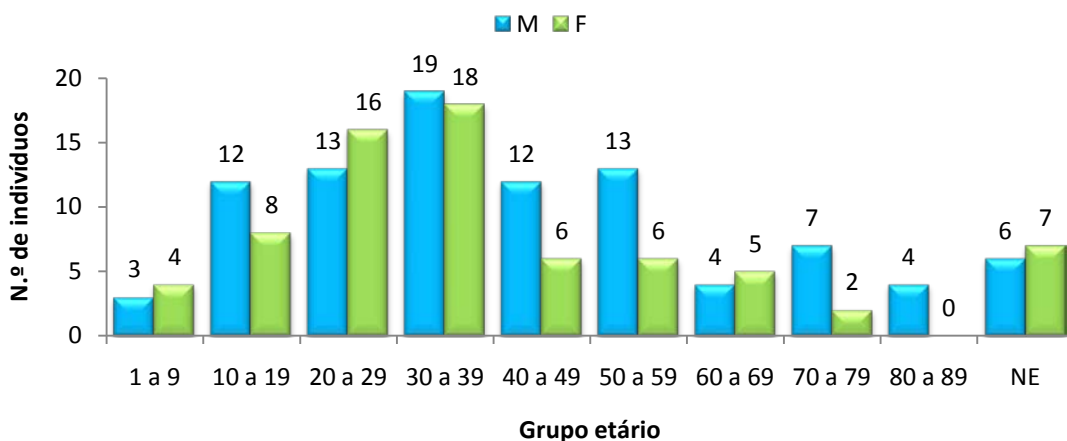


Figura 11 - Número e distribuição por grupos etários dos indivíduos com sintomas neurológicos (NE: idade não especificada).

Relativamente aos sinais e sintomas que levaram os médicos a solicitar o diagnóstico, 73 indivíduos (44,2%) foram clinicamente diagnosticados com meningite. As outras manifestações clínicas mais citadas pelos clínicos foram meningoencefalite em 71 indivíduos (18,8%) e encefalite em 26 (15,8%) (Figura 12).

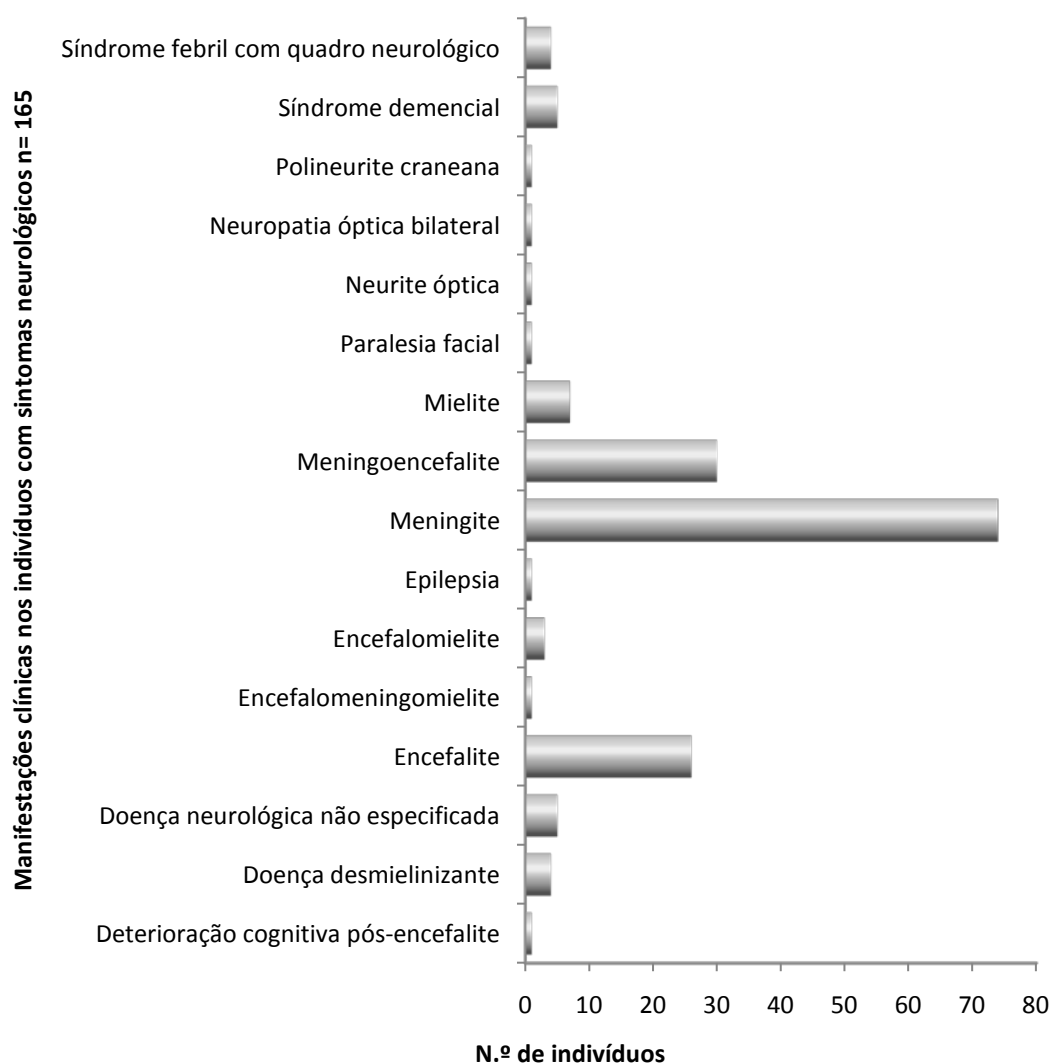


Figura 12 - Manifestações clínicas descritas pelos clínicos nos indivíduos com sintomas neurológicos.

Na população de indivíduos com sintomas neurológicos foram detectados sete soros (4,2%) com anticorpos do tipo IgG. Um destes soros foi positivo para vírus Toscana por PRNT com o serótipo ISS.Phl.3. As amostras positivas para IgG tiveram origem nos distritos de Lisboa (n=2), Porto (n=3), e Faro (n=2). No Quadro 15 encontram-se os dados epidemiológicos e os títulos obtidos pela técnica de IFI.

Quadro 15- Características epidemiológicas e títulos serológicos dos indivíduos IgG positivos.

Indivíduo	Género	Idade	Data de colheita da amostra	Título IFI IgG
1	M	79	Janeiro 2004	128
2	F	45	Agosto 2004	64
3	F	39	Julho 2005	32
4	M	38	Julho 2006	64
5	F	59	Outubro 2006	64
6	F	66	Novembro 2006	32
7	F	24	Setembro 2007	32

Os indivíduos n.º 1, 3 e 6, segundo o relatório clínico, apresentavam encefalite. O indivíduo n.º 5 tinha sintomas de meningite e os indivíduos n.º 2 e 7 foram diagnosticados com meningoencefalite. No caso do indivíduo n.º 5, apenas estava referida febre com quadro neurológico.

Cinco indivíduos testados neste grupo (3%) apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-vírus Toscana e, atendendo aos critérios atrás referidos, foram considerados casos de infecção recente.

No Quadro 16 encontram-se descritos os dados epidemiológicos e os títulos obtidos pela técnica de IFI.

Quadro16- Características epidemiológicas e títulos serológicos dos indivíduos IgG e IgM positivos.

Indivíduo	Género	Idade	Data de colheita da amostra	Título IFI IgG	Título FI IgM
8	M	47	Julho 2005	1024	256
9	M	52	Outubro 2005	64	256
10	M	14	Julho 2006	256	32
11	F	17	Agosto 2006	256	128
12	F	62	Agosto 2006	128	64

Todas as infecções activas foram detectadas nos meses de Verão/início de Outono e em nenhum dos relatórios clínicos constava história de viagens recentes.

O indivíduo n.º 8, género masculino, com 47 anos, de nacionalidade inglesa, estava a residir em Portugal há 11 meses, em Querença, uma zona rural no concelho de Loulé, distrito de Faro. Segundo o Serviço de Saúde onde foi atendido, apresentava um quadro de exantema cutâneo generalizado, com cerca de 48 horas de evolução, acompanhado de cefaleias intensas, alteração do nível de consciência e alterações do comportamento. No exame objectivo, à entrada do Serviço de Saúde, encontrava-se apirético, consciente mas confuso e obnubilado, com *rash* maculo-papular generalizado. No exame neurológico estava sem focalidade aparente, porém com descoordenação discreta dos movimentos corporais. Não apresentava sinais meníngeos, mas tinha intensificação da cefaleia com a flexão cervical. A evolução clínica após tratamento com Aciclovir, Ceftriaxone e Ciprofloxacina foi favorável, com desaparecimento do exantema e melhoria das queixas de cefaleias. O diagnóstico de alta foi de meningoencefalite de etiologia por esclarecer.

O indivíduo n.º 9, género masculino, residia em Penha Garcia em meio semi-rural e tinha 52 anos. Segundo o Serviço de Saúde, o início dos sintomas deu-se em finais de Setembro. Apresentava febre, vómitos, mialgias e cefaleias holocraneanas. O diagnóstico de alta foi de meningite tuberculosa. Cumpru com 12 meses de terapêutica antibacilar. Este soro revelou-se positivo por PNRT (ISS.Phl.3).

O indivíduo n.º 10, género masculino, tinha 14 anos e residia em Coimbra. Segundo o Serviço de Saúde onde foi acompanhado, apresentava cefaleias retro-orbitais e síndrome febril com 2 dias de evolução mas estava apirético. O diagnóstico de saída foi de meningite linfocitária vírica.

O indivíduo n.º 11 era do género feminino, tinha 17 anos e segundo as informações obtidas, apresentava síndrome febril com cefaleias. Tinha estado no Algarve por tempo indeterminado. O diagnóstico de alta foi de meningite aguda viral.

O indivíduo n.º 12, género feminino, tinha 62 anos e residia em meio rural no distrito de Aveiro. Segundo o Serviço de Saúde onde foi atendido, o quadro clínico inicial era sugestivo de gastroenterite aguda (febre, diarreia e vómitos) com cerca de cinco dias de evolução à data do internamento. Posteriormente desenvolveu quadro sugestivo de meningoencefalite (agitação psicomotora, desorientação temporo-espacial).

Em resumo, no total, foram detectados sete indivíduos com infecção prévia por vírus Toscana e cinco indivíduos com infecção recente.

Grupo II: indivíduos sem sinais ou sintomas neurológicos

No grupo dos indivíduos sem quadro neurológico foram estudados 408 soros correspondentes a 373 indivíduos provenientes de vários distritos de Portugal (Figura 13) entre os anos de 2004 e 2008, inclusive. Os Serviços de Saúde que enviaram maior número de solicitações de diagnóstico laboratorial foram os de Lisboa (n= 143), Porto (n= 52) e Faro (n= 34). Foram também testadas amostras de dez indivíduos do arquipélago dos Açores e oito do arquipélago da Madeira. Estas amostras representaram 4,8% do total estudado neste grupo.

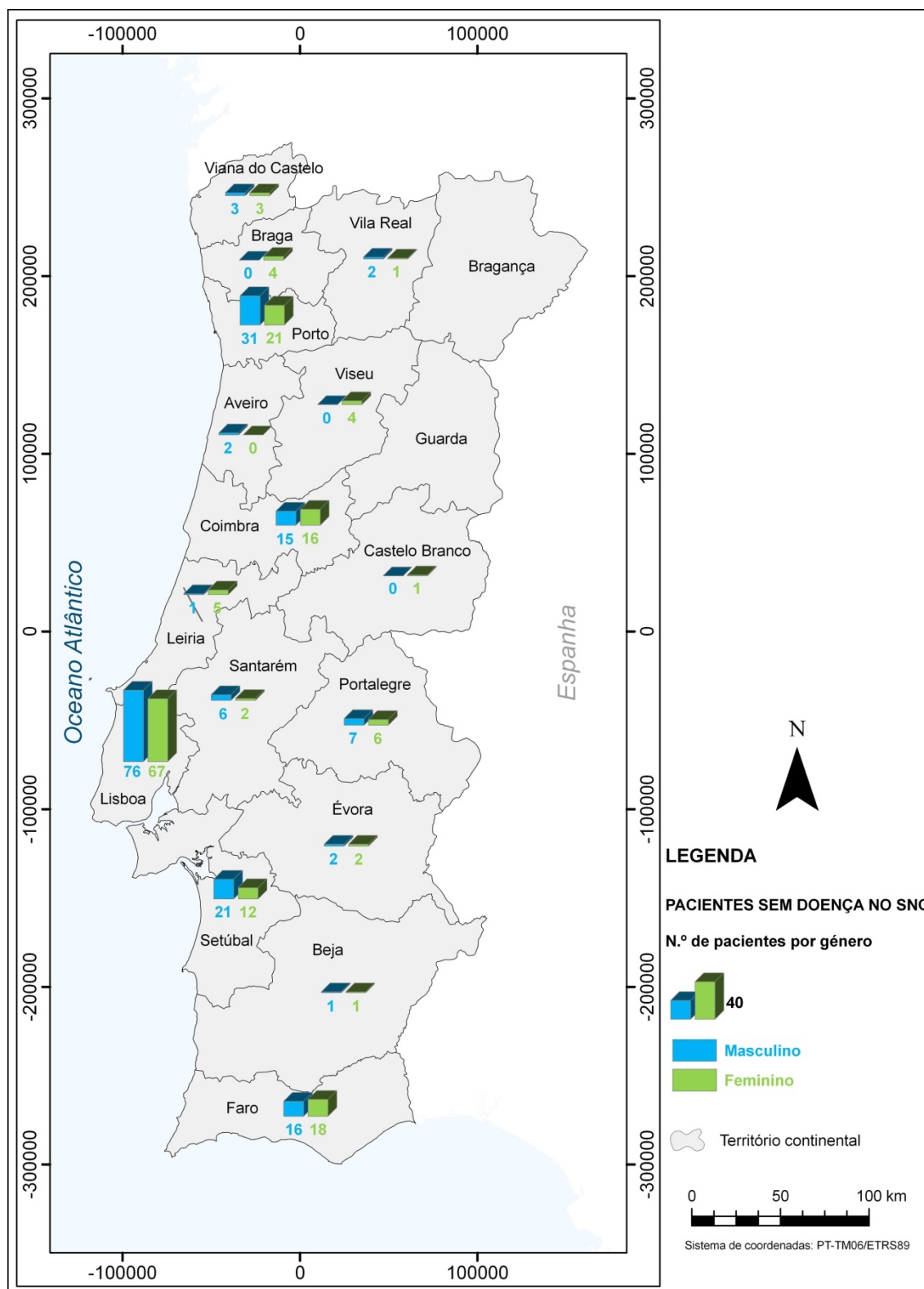


Figura 13 - Distritos de proveniência dos Serviços de Saúde que solicitaram diagnóstico laboratorial para indivíduos sem sintomas neurológicos

A maioria das solicitações de diagnóstico laboratorial recaiu nos arbovírus (n=309) seguido de vírus da coriomeningite linfocitária (n=52), e vírus Toscana (n=12) (Quadro 17).

Quadro 17- solicitações de diagnóstico laboratorial em indivíduos sem sintomas neurológicos nos anos 2004-2008.

Diagnóstico solicitado	Ano					Total
	2004	2005	2006	2007	2008	
Vírus Toscana	2	0	4	2	4	12
Arbovírus	72	37	61	57	82	309
Vírus da coriomeningite linfocitária	5	14	14	7	12	52
Total	79	51	79	66	98	373

No total, 180 indivíduos eram do género feminino (48,3%) e 193 do género masculino (51,7%) (Figura 14). O número médio de solicitações de diagnóstico laboratorial por ano foi 75, tendo havido um mínimo de 71 em 2005 e um máximo de 98 em 2008.

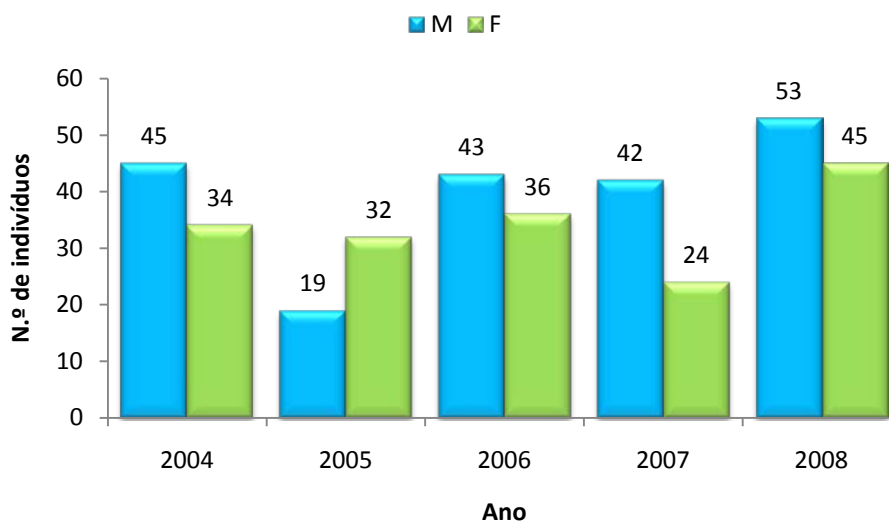


Figura 14 - Distribuição e género dos indivíduos com sintomas neurológicos por ano.

Os indivíduos tinham entre os cinco meses e os 94 anos (Figura 15). Houve um maior número de solicitações no grupo etário dos 30-39 anos, apesar de se referir a existência de um número bastante considerável de indivíduos com idades não especificadas (n=80), que poderá estar ou não distribuído por todos os grupos etários.

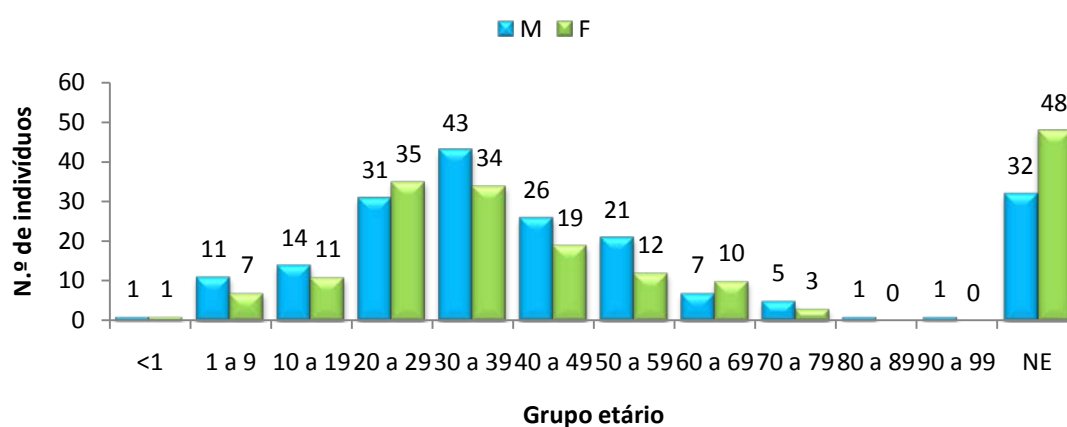


Figura 15 - Número e distribuição por grupos etários dos indivíduos sem sintomas neurológicos (NE: idade não especificada).

Em relação aos sinais e sintomas apresentados pelos indivíduos neste grupo, verificou-se que a manifestação mais referida foi a síndrome febril, em 125 casos (33,5%). No entanto, em 182 casos (48,8%) os relatórios clínicos apresentavam-se incompletos, não estando descrito qualquer sinal ou sintoma da patologia que levou o indivíduo a recorrer aos Serviços de Saúde (Figura 16).

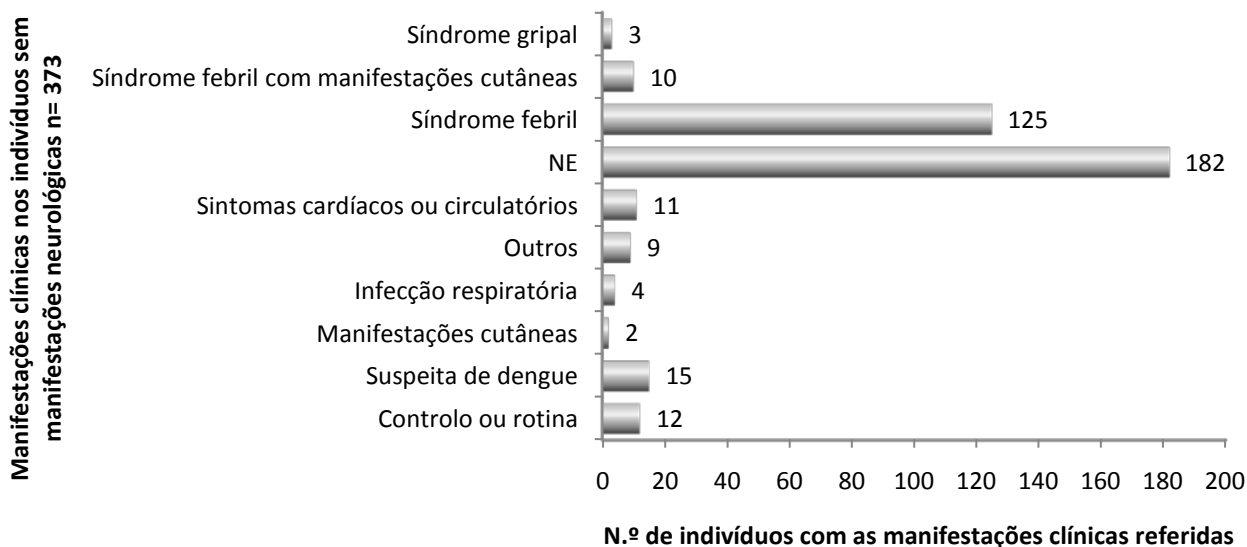


Figura 16 - Manifestações clínicas referidas pelos clínicos nos indivíduos sem sintomas neurológicos.

Neste grupo, cinco amostras (1,3%) apresentaram anticorpos do tipo IgG para o vírus Toscana (Quadro 18). Estas amostras tiveram origem nos Serviços de Saúde dos distritos de Portalegre (n=1), Setúbal (n=1), Faro (n=1), Coimbra (n=1) e Lisboa (n=1).

Quadro 18- Características epidemiológicas e títulos serológicos por IFI dos indivíduos IgG positivos.

Indivíduo	Género	Idade	Colheita da amostra	Título IFI
13	F	NE	Agosto 2004	IgG 32
14	M	32	Setembro 2006	IgG 32
15	M	58	Outubro 2006	IgG 32
			Janeiro 2007	IgG neg
16	M	19	Junho 2007	IgG 32
17	M	52	Abril 2008	IgG 32
18	M	36	Maio 2008	IgG 128; IgM 32
			Junho 2008	IgG 32; IgM 16

neg: amostra negativa

Dois dos indivíduos apresentaram síndrome febril. Nos restantes casos não houve quaisquer referências a sinais ou sintomas nos relatórios apresentados.

Um dos indivíduos testados (n.º18, Quadro 18), do género masculino, com 36 anos, originário do distrito de Lisboa, que tinha regressado de uma viagem ao Gabão, com quadro febril, apresentou anticorpos dos tipos IgG e IgM por IFI, mas não por ELISA, e seroconversão em duas amostras separadas por um período de um mês. Os títulos da amostra de soro recolhida em Maio de 2008 foram de 128 e 32 para IgG e IgM, respectivamente. Em Junho do mesmo ano, os títulos decresceram para 32 e 16, respectivamente. Na suspeita de infecção por outros flebovírus, esta amostra foi também testada para o vírus do Vale do Rift, tendo-se revelado negativa.

Em resumo, neste grupo de população estudada, cinco indivíduos apresentaram anticorpos IgG, sinal de infecção prévia. Um indivíduo tinha uma infecção recente.

3.4. Conclusões e discussão

A detecção de anticorpos IgG anti-vírus Toscana nos inquiridos sero-epidemiológicos na população controlo e nas populações consideradas de risco, comprovaram a circulação do vírus no nosso país.

A população controlo (dadores de sangue) apresentou uma seroprevalência de 2%.

O grupo de populações consideradas de risco, por exercerem a sua actividade profissional ao ar livre, apresentou uma seroprevalência total de anticorpos anti-vírus Toscana de 3,4%, variando entre os 2,7% nos técnicos de saúde ambiental e anilhadores, e os 6,1% nos indivíduos com anticorpos anti-leishmania.

Apesar de, no total, a seroprevalência de anticorpos na população de risco ser superior à da população controlo, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nestes dois grupos, o que indica provavelmente a necessidade de mais estudos, com populações maiores.

Num trabalho realizado por D'Ovidio e colegas (2008), onde foram analisados 329 soros de uma população controlo e 349 soros de trabalhadores florestais e agrícolas

da região da Toscana, a seroprevalência na população considerada controlo (30%) foi superior à da população considerada de risco (23%). Aparentemente existem outros factores que influenciam a taxa de seroprevalência de anticorpos nas populações consideradas de risco, uma vez que estudos semelhantes estão a originar resultados bastante diferentes. Para se compreender este tipo de resultados são necessários mais estudos, num maior número de amostras, onde a população esteja perfeitamente descrita epidemiologicamente e onde seja possível uma real quantificação do risco ao qual os indivíduos se encontram expostos.

Nos grupos de risco onde foi preenchido um inquérito, nenhum dos indivíduos referiu qualquer episódio anterior de doença do SNC. Existe a probabilidade da circulação de estirpes menos virulentas de vírus Toscana que poderão explicar a benignidade ou até mesmo a ausência de manifestações clínicas em caso de infecção.

É também possível que a sintomatologia com baixa severidade possa estar relacionada com factores imunológicos ou genéticos intrínsecos na população portuguesa, uma vez que o vírus circula em Portugal pelo menos desde 1983 (Ehrnst *et al.*, 1985).

Ainda relativamente à população considerada de risco, na população com maior número de amostras (trabalhadores do Algarve ao ar livre) observou-se uma tendência para um maior número de seropositivos IgG entre a população mais idosa. Estes resultados são semelhantes aos encontrados noutros países (De Ory-Mánchon, 2007; Terrosi *et al.*, 2009;) em que se verificou que a seroprevalência de anticorpos aumentou com a idade. De momento desconhece-se o tempo de persistência de anticorpos anti-vírus Toscana, mas existe a probabilidade de a presença de IgG ser detectável para toda a vida. Desta forma, o facto de a prevalência aumentar com a idade poderá estar relacionado com a exposição ao vírus ao longo da vida (De Ory-Mánchon, 1999).

Entre os indivíduos com anticorpos anti-leishmania foram encontradas duas amostras IgG positivas (6,1%). Estatisticamente não se verificaram diferenças significativas quando se comparou a seroprevalência de anticorpos anti-vírus Toscana desta população com a da população controlo. Talvez uma explicação possível seja o reduzido número da amostra populacional porque na realidade esta foi a

seroprevalência mais elevada determinada no presente estudo. Até ao presente não há conhecimento da existência de trabalhos semelhantes para comparação de resultados no entanto é provável que ambos os agentes, flebovírus e leishmanias, possam coexistir na mesma população de vectores e daí a elevada prevalência de anticorpos.

No total dos 538 indivíduos com sintomatologia (neurológica e não neurológica) e solicitação de diagnóstico laboratorial ao CEVDI, 12 apresentaram anticorpos do tipo IgG, o que significa que tiveram contacto prévio com o vírus. Em seis amostras estavam presentes também anticorpos do tipo IgM, sinónimo de infecção activa. Estes dados permitem-nos concluir que em Portugal continental o vírus Toscana além de circular na população, está a provocar doença, à semelhança do que acontece noutros países da Bacia do Mediterrâneo.

No grupo dos indivíduos com sintomatologia neurológica os casos de infecção recente tiveram origem nos distritos de Faro, Lisboa, Coimbra e Aveiro e em nenhuma das fichas de inquérito estavam descritas viagens recentes ao estrangeiro, o que significa que as infecções foram adquiridas no nosso país. No caso das infecções prévias, os indivíduos eram provenientes dos distritos do Porto, Coimbra, Lisboa, Setúbal, Portalegre e Faro no entanto, dado que a infecção não era recente, não se pôde concluir acerca da sua origem autóctone.

Os primeiros relatos de infecções por vírus Toscana em Portugal provieram dos distritos de Faro (Ehrnst *et al.*, 19853) e Coimbra (Schwarz *et al.*, 1995b) e, em 2002-2005, foram diagnosticados casos no norte de Portugal, mais propriamente, no distrito do Porto (Santos *et al.*, 2007). Os dados obtidos neste trabalho confirmam que o vírus é endémico, pelo menos nestes distritos, e que provavelmente está distribuído pelo território continental, seguindo a distribuição geográfica de *P. perniciosus*, o seu vector (Pires, 2000).

No que diz respeito às manifestações clínicas, três dos indivíduos com infecções recentes apresentaram meningite e dois apresentaram meningoencefalite. Um deles apresentou ainda manifestações cutâneas (exantema). Anteriormente foi descrito um caso de erupção cutânea, sem envolvimento do SNC (Sanbonmatsu-Gámez *et al.*, 2009).

Têm também havido várias descrições de infecções por vírus Toscana com manifestações incomuns como surdez temporária ou permanente (Pauli *et al.*, 1995, Martínez-García 2008), encefalite sem meningite (Dionisio *et al.*, 2001) ou até mesmo hidrocefalia (Baldelli *et al.*, 2004). Valentini e colaboradores (2008) sugeriram que diferenças genéticas no vírus possam talvez ser traduzidas em diferentes quadros patológicos nas pessoas infectadas.

No grupo dos indivíduos sem sintomas neurológicos, ficou por esclarecer o caso de infecção recente de um indivíduo com síndrome febril que tinha acabado de regressar do Gabão. Este indivíduo apresentou serologia positiva com títulos elevados para anticorpos anti-vírus Toscana dos tipos IgG e IgM, na técnica de IFI em duas amostras separadas por um período de um mês. Estes resultados não foram confirmados por ELISA nem por PRNT com o serótipo ISS.Ph1.3. Foi levantada a questão se seria um caso de importação de flebovírus, por exemplo o vírus do Vale do Rift, no entanto, a serologia realizada com anticorpos específicos contra este vírus revelou-se negativa. Este caso realça a necessidade da realização de um inquérito epidemiológico aos indivíduos que se apresentam nos Serviços de Saúde, uma vez que a distribuição dos arbovírus é limitada pela distribuição dos seus vectores e é de extrema importância, aquando do diagnóstico clínico, fazer o historial das viagens mais recentes.

Nas amostras de indivíduos provenientes dos arquipélagos da Madeira e Açores não foram detectados anticorpos anti-vírus Toscana. É de salientar que até ao presente não há relatos de artrópodes das espécies, *P. perniciosus* ou *P. perfiliewi* naquelas ilhas, o que torna pouco provável a circulação de vírus Toscana.

As provas de neutralização por placas são testes para a determinação de anticorpos específicos contra diferentes serótipos de flebovírus (Eitrem *et al.*, 1991). No nosso estudo, no total de 29 amostras positivas, cinco amostras (uma amostra com IgM e quatro amostras com IgG) reagiram quando testadas por PRNT com a estirpe ISS. Ph1.3, o que sugere a possibilidade de co-circulação de diferentes genótipos do vírus, como reportado anteriormente em estudos realizados noutros países da bacia do Mediterrâneo (Charrel *et al.*, 2009, Zihoua *et al.*, 2010).

Num inquérito sero-epidemiológico realizado na população portuguesa, em 1980, Filipe reportou a detecção de anticorpos (por testes de inibição de hemaglutinação) anti-vírus Sicília em quatro indivíduos, num total de 1649 estudados. Na altura não foi possível a realização de PNRT e desconhece-se por isso se os anticorpos detectados seriam anticorpos anti-vírus Toscana ou de facto anti-vírus Sicília. No entanto, a presença de anticorpos anti-vírus Sicília na Bacia do Mediterrâneo tem sido descrita unicamente nas regiões do norte da Argélia, Sul de Itália, alguns países balcânicos, Chipre e Turquia (Depaquit, 2010).

No presente trabalho, todos os indivíduos com serologias positivas, quer para anticorpos do tipo IgG, quer para anticorpos do tipo IgM tinham mais de 14 anos. Estes resultados estão de acordo com uma investigação recente (Terrosi *et al.*, 2009), onde a seroprevalência em crianças foi considerada baixa (9,8%), particularmente em crianças com idades compreendidas entre um e dez anos, quando comparada com a dos adultos que apresentaram 19,8% de seroprevalência. Nesse estudo foi também demonstrado que o aparecimento de sintomas mais severos com envolvimento do SNC está correlacionado com a idade. Apenas 9% das crianças estudadas (indivíduos com idades até aos 15 anos) apresentaram doença neurológica enquanto nos adultos (indivíduos com idade superior a 15 anos), a percentagem foi bastante superior (31,4%).

Os nossos resultados vão de encontro aos supracitados. Aparentemente, e tendo em conta a baixa seroprevalência, há uma menor exposição das crianças à picada de artrópodes. A menor severidade dos sintomas neste grupo poderá estar relacionada com factores imunológicos ou genéticos.

Outro dado relevante é o facto de todos os indivíduos, considerados como tendo infecção recente, residirem em ambiente rural. Vários estudos apontam para um maior valor de seroprevalência em zonas rurais devido à maior exposição aos vectores (Sabonmatsu-Gámez *et al.*, 2005, Valassina *et al.*, 2003).

A análise aos ficheiros dos cinco indivíduos com infecções recentes e com sintomas neurológicos, revelou que em um deles foi solicitado o diagnóstico laboratorial de vírus da coriomeningite linfocitária e de vírus *West Nile*. Nos restantes foi solicitado o

diagnóstico laboratorial de vírus da coriomeningite linfocitária. Nenhum destes foi solicitado especificamente para vírus Toscana. Deste modo é importante realçar que entre 2004 e 2008 o laboratório recebeu um número reduzido de pedidos específicos de diagnóstico para vírus Toscana (n=34) se compararmos com o número de pedidos de diagnóstico para vírus da coriomeningite linfocitária (n=144) ou para arbovírus (n=360).

Após o surto de infecções humanas por vírus *West Nile* nos Estados Unidos da América, em 1999, e após a ocorrência de alguns surtos na Europa e norte de África, vários países sul-europeus iniciaram uma vigilância sistemática para detectar esse vírus. Nessa vigilância foi demonstrado que o vírus Toscana era mais comum do que o vírus *West Nile* e muito mais prevalente do que se estimava inicialmente (Moureau *et al.*, 2010).

Aparentemente, em Portugal, o vírus Toscana, contrariamente ao que acontece com outros arbovírus, incluindo o vírus de *West Nile*, ou o vírus da coriomeningite linfocitária, é pouco conhecido e é pouco considerado como uma causa provável da doença neurológica.

O diagnóstico de vírus Toscana deveria ser considerado como exclusão diferencial, pelo menos nos meses de Verão, em caso de doença neurológica ou síndrome febril de origem desconhecida.

IV- Estudo serológico em potenciais reservatórios de flebovírus



4.1. Introdução

O ciclo de manutenção de alguns flebovírus na natureza, como é o caso dos flebovírus pertencentes ao grupo da febre por flebótomos, permanece pouco claro. Embora os flebótomos tenham sido identificados como vectores de alguns flebovírus, desconhece-se se o ciclo de transmissão destes vírus inclui hospedeiros vertebrados que permitam a sua persistência nos meses em que não existe a circulação de flebótomos adultos.

Nos arbovírus é comum a existência de um reservatório vertebrado que desenvolve virémia suficiente para que se dê a transmissão horizontal do agente. Várias hipóteses foram colocadas para explicar a manutenção dos arbovírus na natureza, tal como foi referido na secção 1.5., no entanto, até à data, não se chegou a nenhuma conclusão em relação ao grupo dos flebovírus transmitidos por flebótomos. O ciclo destes últimos poderá seguir um padrão diferente, ainda por revelar, dado que, a virémia nos vertebrados é demasiado baixa e de curta duração.

Com o objectivo de avaliar a eventual circulação do vírus Toscana em vertebrados no nosso país, foram realizados estudos serológicos em amostras de animais selvagens e domésticos, nomeadamente de roedores, lobos, raposas e cães.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Amostras

4.2.1.1. Amostras de roedores

Os soros para este estudo foram obtidos em roedores capturados em quatro Parques Naturais, com o conhecimento e autorização do ICNB: Parque Nacional da Peneda Gerês, Parque Natural da Arrábida, Parque Natural do Vale do Guadiana e Parque Natural da Ria Formosa. Além destes, ainda foram estudados soros de roedores capturados no concelho de Palmela.

As capturas foram realizadas com armadilhas *Sherman* e *Tomahawk* devidamente iscadas e fornecidas com algodão, colocadas ao pôr-do-sol e verificadas na manhã seguinte. Após a captura, os roedores foram levados vivos para o laboratório,

onde foi feita a identificação ao nível do sexo e da espécie e se registaram os dados biométricos. Por último colheu-se sangue da veia retro-orbital, com o animal anestesiado. O sangue de cada roedor foi colhido para um tubo *Microtainer*²¹, deixado coagular durante cerca de uma hora e centrifugado durante dez minutos a 3500 g. O soro foi então separado do coágulo sanguíneo, com pipetas de Pasteur estéreis, tendo sido mantido a -20°C até à sua utilização.

4.2.1.2. Amostras de canídeos

As amostras de raposas (*Vulpes vulpes*) e de lobos (*Canis lupus*), do Norte de Portugal, obtidas no âmbito de um trabalho de colaboração com a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, consistiam em exsudados de pulmão, no caso dos animais que haviam sido encontrados sem vida, ou soros, no caso de animais encontrados vivos e que foram encaminhados para centros de recuperação para posterior libertação.

As amostras de soros dos cães (*Canis familiaris*) foram recolhidas no distrito do Algarve e obtidas no âmbito de um trabalho de colaboração com a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

Todos os soros foram armazenados a -20°C até à sua utilização.

4.2.2. Técnica utilizada para o estudo serológico: imunofluorescência indirecta

A técnica utilizada para a detecção de anticorpos específicos anti-vírus Toscana do tipo IgG nas amostras de vertebrados foi a IFI, preparada de acordo com o procedimento descrito na secção 2.2.1. No entanto, o anticorpo secundário marcado com fluoresceína, foi substituído por outro, compatível com as espécies animais testadas. Assim, para o estudo das amostras de roedores, foi utilizada uma anti-imunoglobulina de ratinho²² ou de rato²³, preparadas em coelho e, no caso das

²¹ BD Microtainer SST™

²² Ref: F0232, Dako

²³ Ref:Star 66, Serotec

amostras dos canídeos, foi utilizado uma anti-imunoglobulina de cão²⁴ preparada em coelho. Considerou-se serologia positiva para IgG a presença de um título nas amostras estudadas.

4.3. Resultados

4.3.1. Serologia em roedores

Foram testados soros de 185 roedores das espécies *Apodemus sylvaticus*, *Mus spretus*, *M. domesticus*, *Rattus rattus* e *R. norvegicus* provenientes dos 5 locais de captura (Quadro 19). Nenhum dos roedores apresentou anticorpos IgG anti-vírus Toscana.

Quadro 19- Distribuição das espécies e número de indivíduos capturados.

Locais de captura dos roedores	<i>A.sylvaticus</i>	<i>M.spretus</i>	<i>M domesticus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>R.norvegicus</i>
Parque Nacional da Peneda-Gerês	13	0	0	0	0
Parque Natural do Vale do Guadiana	9	64	0	9	0
Parque Natural da Arrábida	0	69	0	5	0
Parque Natural da Ria Formosa	0	12	0	0	0
Concelho de Palmela	0	0	1	0	3
Total	22	145	1	14	3

4.3.2. Serologia em canídeos

No total foram testadas 353 amostras de canídeos. As amostras de canídeos selvagens eram provenientes de 49 lobos e 37 raposas. Duas amostras de soro, uma de lobo e uma de raposa, apresentaram anticorpos IgG anti-vírus Toscana com títulos de 32.

²⁴ Ref: F4012, SIGMA

Os restantes soros testados provieram de 196 cães saudáveis, consultados por rotina, e de 71 cães que apresentavam algum tipo de sintomatologia (febre, anorexia, depressão, petéquias, equimoses, esplenomegália, etc.) e que recorreram à consulta veterinária para tratamento. Nestes soros não foi encontrada qualquer serologia positiva.

4.4. Conclusões e discussão

A forma como os flebovírus são mantidos na natureza tem sido amplamente debatida nos últimos anos, dada a reconhecida importância que estes agentes têm em Saúde Pública. É sabido que a sua distribuição coincide com a distribuição dos seus vectores mas pouco se tem desvendado sobre a importância de possíveis reservatórios na manutenção do ciclo, quando os vectores artrópodes entram em diapausa.

Em estudos serológicos levadas a cabo em vertebrados, em Itália, foram detectados anticorpos embora em baixo título para flebovírus em *A. sylvaticus* (Verani *et al.*, 1987). Outros exemplos existem, alguns já referidos, (Secção 1.6.), de anticorpos para diferentes flebovírus detectados em várias espécies de roedores e insectívoros (Ashford, 2001; Chastel *et al.*, 1980; Chastel *et al.*, 1982; Chastel *et al.*, 1983, Le Lay *et al.*, 1983, Calisher *et al.*, 1977, Javadian *et al.*, 1977, Saidi *et al.*, 1977, Ibrahim *et al.*, 1970).

As raposas e os roedores são considerados reservatórios silváticos de *Leishmania* spp, o que prova que são uma fonte de refeições sanguíneas para os flebótomos (Gradoni *et al.*, 1980; Bettini *et al.*, 1980; Gramiccia *et al.*, 1982).

No presente trabalho não foram detectados roedores nem canídeos domésticos com anticorpos anti-vírus Toscana. No entanto, foram detectados anticorpos do tipo IgG nos canídeos selvagens, nomeadamente, num lobo e numa raposa. Este parece ser um dado válido uma vez que não é improvável que os animais possam ter sido picados por flebótomos infectados com o vírus Toscana ou outro flebovírus que circule no nosso país. Os flebótomos necessitam de locais abrigados, com níveis elevados de humidade e abundante matéria orgânica para efectuarem as suas posturas, pelo que é provável que

animais selvagens que repousam em tocas, como as raposas ou os lobos, ou que têm hábitos cavernícolas, tal como os morcegos, possam estar mais expostos à picada destes insectos.

No que se refere a animais domésticos, num estudo serológico realizado recentemente em Espanha, foram encontrados cabras, ovelhas, cães, gatos e cavalos com anticorpos IgG para o vírus Toscana. Verani e colaboradores (1988) também haviam detectado anticorpos em ovelhas.

Todos os casos atrás referidos falam na detecção de anticorpos anti-flebovírus em mamíferos selvagens ou domésticos. No entanto, Hardestam e colaboradores (2007), mostraram, num estudo comparativo sobre a estabilidade de três vírus da família *Bunyaviridae* (o vírus Hantaan transmitido por roedores, o vírus Sicília transmitido por flebótomos e o vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo transmitido por carraças), que o flebovírus Sicília foi o mais estável quando sujeito a todas as temperaturas testadas (37°C, 20°C e 4°C). Assim, foi sugerido que esta resistência poderá reflectir uma adaptação a um hospedeiro exotérmico.

Por outro lado, vários flebovírus foram recuperados tanto em machos como em fêmeas de flebótomos, o que prova a existência de transmissão transovárica e aponta para que a ecologia deste grupo de agentes possa ser bastante diferente do convencional ciclo vertebrado-insecto que é aceite para a maioria dos arbovírus (Tesh *et al*, 1975). A diminuição nas taxas de infecção por flebovírus da progenitura de flebótomos passadas algumas gerações é, no entanto, demonstrada em modelos matemáticos, o que sugere, mais uma vez, a necessidade de existência de um reservatório (Tesh *et al*, 1987).

Como resultado deste trabalho concluímos que os canídeos selvagens poderão desempenhar um papel importante no ciclo de manutenção de flebovírus na natureza, sendo no entanto necessário mais estudos para esclarecer o período de virémia, assim como em mais espécimes de regiões geográficas alargadas.

V- Identificação de flebótomos



5.1. Introdução

A distribuição dos arbovírus está ligada à distribuição dos seus vectores, sendo o conhecimento das espécies presentes numa dada região de grande importância para o estudo da distribuição dos agentes transmitidos e para a previsão da ocorrência de possíveis surtos.

Foi França (1913, 1918) quem identificou, pela primeira vez, flebotomos em Portugal, nomeadamente *Phlebotomus papatasi* e *P. perniciosus*. Desde então, vários estudos têm sido realizados com a captura destes dípteros. Actualmente, estão descritas cinco espécies no nosso país, nomeadamente *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* e *S. minuta*. Todas estas espécies são responsáveis pela transmissão de agentes patogénicos ao Homem, excepto *S. minuta* que se alimenta somente em répteis e não em vertebrados endotérmicos, tal como referido anteriormente.

O objectivo foi capturar flebotomos em zonas com reconhecida abundância de fauna flebotomínica, identificar as espécies presentes, a sua abundância e distribuição geográfica.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Capturas de flebotomos

5.2.1.1. Locais de captura

As áreas escolhidas para a captura de flebotomos foram o Algarve e a zona da Arrábida. O Algarve foi seleccionado uma vez que o primeiro caso reportado da presença de vírus Toscana em Portugal (Ehrnst *et al.*, 1985), que culminou com a inclusão do nosso país na lista de países endémicos para este vírus, ocorreu nessa zona.

A Arrábida foi seleccionada por ser uma zona com abundância de flebotomos onde foi descrita, anteriormente (Pires, 2000, Afonso *et al.*, 2005), a presença de uma grande abundância de *P. perniciosus*, vector de vírus Toscana.

A selecção das estações de captura para a colocação das armadilhas foi determinada pela existência de características essenciais para repouso e reprodução de

flebótomos. Assim, foram escolhidos locais com solo rico em matéria orgânica, presença de animais e respectivos abrigos, que fornecem locais de sombra com elevados níveis de humidade para o repouso dos imagos, e muros ou paredes com fendas onde estes costumam repousar.

5.2.1.2. Métodos utilizados na captura

Para o sucesso das técnicas de detecção e isolamento de flebovírus e de flavivírus (vírus cujo genoma é constituído por ARN), é importante que os flebótomos cheguem vivos ao laboratório ou então que sejam congelados, imediatamente após a captura, a temperaturas muito baixas, para manter a integridade do ARN. A comparação entre diferentes métodos de captura em estudos anteriores indica que as armadilhas luminosas tipo CDC são as mais eficazes para a colheita de insectos vivos do género *Phlebotomus* (Hilmy *et al.*, 1989; Dinesh *et al.*, 2008). Estas armadilhas possuem uma fonte de luz que atrai os insectos para uma zona de onde são automaticamente aspirados para um saco colector.

Para aumentar a eficácia das armadilhas, no âmbito deste estudo foram feitas alterações nos sacos colectores, nomeadamente na malha, de rede mais pequena, e na largura do saco. Para maximizar a eficiência das capturas foi ainda colocado um recipiente com isco (dióxido de carbono) na forma de gelo seco (Figura 19). O CO₂ é um atractivo para todos os dípteros hematófagos, uma vez que estes insectos localizam os potenciais hospedeiros vertebrados através do dióxido de carbono expirado (Silver, 2008; Nathanson, 2007).

O período de prospecção de flebótomos decorreu de Maio a Outubro, nos anos de 2007 e 2008. Uma vez que a actividade diária dos flebótomos é condicionada pela temperatura e humidade relativa do ambiente, esta actividade restringe-se ao período nocturno, quando a temperatura diminui e a humidade aumenta. Por este motivo, as armadilhas, foram colocadas ao entardecer e os sacos colectores verificados logo ao amanhecer do dia seguinte, em cada uma das estações de captura seleccionadas. As

armadilhas foram colocadas durante três noites consecutivas e cada armadilha colocada num determinado local foi contabilizada como uma armadilha/noite. Paralelamente foram também aspirados flebotomos, em repouso, durante o dia, nos locais de abrigo.

Os flebotomos capturados foram aspirados com aspiradores de boca manuais ainda no local de captura (Figura 17), colocados em tubos²⁵ e transportados em recipientes com gelo seco até ao laboratório onde foram armazenados em câmaras frigoríficas a -80°C até ao seu processamento.



Figura 17 - Armadilha tipo CDC com saco colector modificado e recipiente com gelo seco (foto: Fátima Amaro).

5.2.1.3. Identificação de flebotomos

A identificação de fêmeas de flebotomos, ao nível da espécie, é feita com base na morfologia da espermateca das fêmeas, o que implica uma preparação definitiva obrigatória, entre lâmina e lamela, uma vez que as espermatecas encontram-se internamente, no abdómen, e têm que passar por um processo de clarificação e fixação que permita a visualização.

²⁵ NUNC Centrifuge Tubes Screwcap PS/PE

No caso dos machos, a preparação definitiva é facultativa uma vez que a genitália é exterior e as estruturas são visíveis mais facilmente, no entanto, no decorrer deste trabalho, foi sempre realizada a preparação definitiva também para os machos.

A observação das lâminas é realizada com microscópio de contraste de fase.

Seguindo a metodologia de vários autores (Ozbel *et al.*, 2005; Sanbonmatsu *et al.*, 2005), 10% dos espécimes capturados foram separados por sexo, para serem identificados ao nível da espécie por data e local de captura.

Os restantes foram separados, em machos (Figura 18) e fêmeas. Estas últimas foram separadas em fêmeas alimentadas (ou ingurgitadas, isto é, com sangue visível no abdómen) (Figuras 19 A) e fêmeas não alimentadas (Figura 19 B), também de acordo com a data e o local de captura.



Figura 18 - Imago de flebotomo macho (foto: Fátima Amaro).



Figura 19 - Imagos de flebótomos fêmeas. A- fêmeas ingurgitadas; B – fêmea não ingurgitada (fotos: Fátima Amaro).

A clarificação necessária para a identificação dos flebótomos foi feita com clorolactofenol²⁶, numa estufa a 37°C durante cinco dias. A montagem entre lâmina e lamela foi realizada em gotas de bálsamo de fenol²⁷ de acordo com Maroli e colaboradores (1997).

Os flebótomos foram dispostos nas lâminas de maneira a evidenciar as estruturas mais importantes para a identificação. Nas fêmeas, a cabeça foi separada do corpo e colocada em posição dorso-ventral para que a faringe ficasse para cima e com os dentes bem visíveis. O abdómen foi colocado numa posição lateral, para permitir a visualização das espermatecas e dos canais condutores (Figura 20 A). Nos machos, o corpo foi igualmente disposto em posição lateral, de maneira a que a genitália ficasse na posição correcta para a visualização das estruturas mais importantes para a identificação (Figura 20 B).

A identificação taxonómica foi feita com recurso a chaves dicotómicas (Léger *et al.*, 1983; Pires, 2000).

²⁶ 2 partes de hidrato de cloral, 1 parte de fenol e 1 parte de ácido láctico

²⁷ 1 parte de solução saturada de fenol em álcool absoluto e 1 parte de bálsamo do Canadá

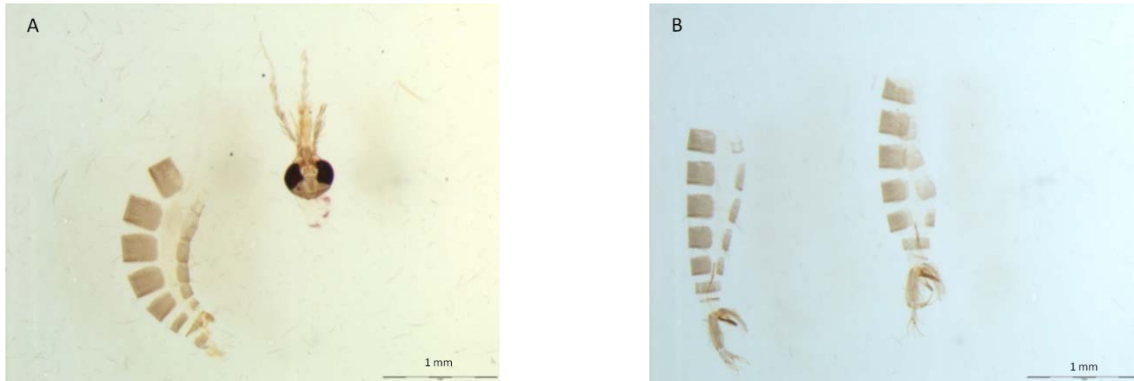


Figura 20 - Disposição das fêmeas (A) e dos machos (B) nas lâminas para identificação (fotos: Fátima Amaro).

5.3. Resultados

5.3.1. Algarve

No Algarve foram colocadas 248 armadilhas/noite, distribuídas por 19 estações de captura (Figura 21) tendo sido capturados 2747 flebótomos, 1422 machos e 1225 fêmeas, das quais 147 encontravam-se ingurgitadas.

V- Identificação de flebótomos

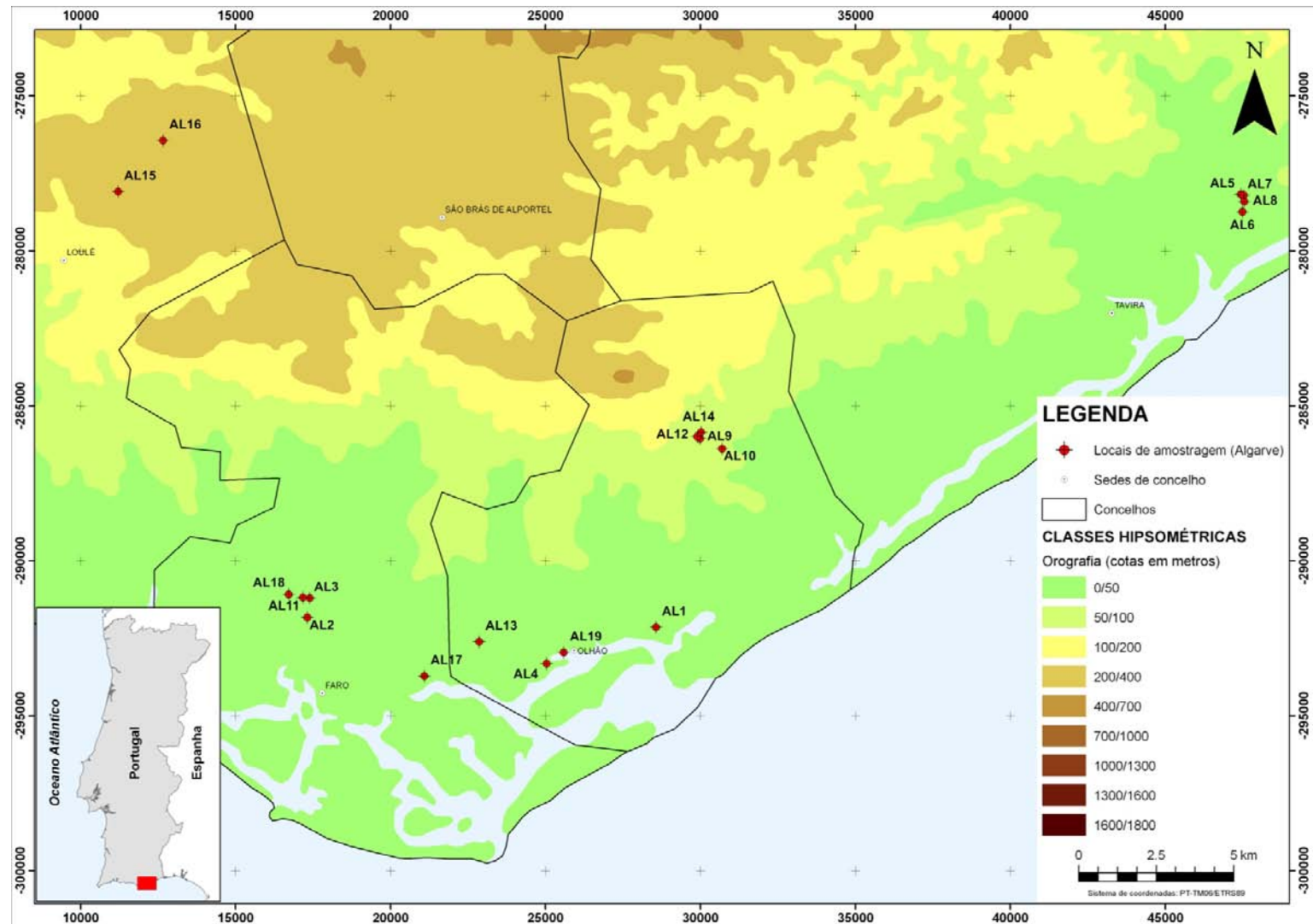


Figura 21 - Estações de captura de flebótomos no Algarve.

No Quadro 20 apresentam-se as informações relativas às estações de captura de flebotomos, nomeadamente as localidades onde se situava cada estação de captura, a altitude a que se encontravam e o tipo de instalações onde as armadilhas foram colocadas.

Quadro 20- Descrição das estações de captura de flebotomos no Algarve.

Localidade	Estação de captura	Altitude (m)	Tipo de instalação
Quelfes	AL1	12	Ar livre, perto de detritos animais, canil
S. Pedro	AL2	13	Capoeira, pocilga
S. Pedro	AL3	11	Capoeira, pombal
Olhão	AL4	4	Canil, gatil
Conceição de Tavira	AL5	50	Canil, Capoeira, coelheira
Conceição de Tavira	AL6	50	Capoeira
Conceição de Tavira	AL7	49	Coelheira, pocilga
Conceição de Tavira	AL8	49	Cavalaria, canil
Moncarapacho	AL9	57	Capoeira, pombal, coelheira
Moncarapacho	AL10	51	Capoeira
S. Pedro	AL11	10	Capoeira, cavalaria
Moncarapacho	AL12	85	Pombal, canil
Pechão	AL13	9	Capoeira
Moncarapacho	AL14	86	Capoeira
Salir	AL15	237	Capoeira
Salir	AL16	253	Capoeira, pocilga
Pechão	AL17	6	Vacaria
S. Pedro	AL18	14	Capoeira, canil
Olhão	AL19	4	Pombal

No ano de 2007 foram colocadas 120 armadilhas/noite. Quatro das nove estações de captura foram positivas para a presença de flebotomos. No total foram capturados 341 espécimes, sendo 173 machos e 168 fêmeas, das quais 25 estavam ingurgitadas (Quadro 21).

Quadro 21-Números de capturas de flebótomos no Algarve em 2007.

Mês	Estação de captura	Armadilha/noite	♂ (%)	♀ Totais (♀ ingurgitadas)	Total de flebótomos capturados (%♂;%♀)
Maio	AL1	8	0	0	0
	AL2	6	0	0	0
	AL4	1	0	0	0
Junho	AL1	5	0	0	0
	AL2	7	0	0	0
	AL3	6	7	0	7 (100;0)
	AL5	9	16	47 (11)	63 (25,4; 74,6)
Julho	AL3	8	2	5	7 (28,6; 71,4)
	AL5	8	2	9 (1)	11 (18,2; 81,8)
	AL6	2	0	0	0
	AL7	3	0	0	0
	AL8	2	0	0	0
Agosto	AL3	6	0	1	1 (0;100)
	AL5	6	104	47 (2)	151 (68,9; 31,1)
	AL6	4	2	13 (4)	15 (13,3; 86,7)
	AL9	6	1	2	3 (33,3; 66,7)
Setembro	AL5	6	31	18 (3)	49 (63,3; 36,7)
	AL6	9	2	9 (4)	11 (18,2; 81,8)
	AL9	6	0	1	1 (0; 100)
Outubro	AL5	6	6	5	11 (54,5; 45,5)
	AL9	6	0	11	11 (0; 100)
Total	n= 9	120	173	168 (25)	341 (50,7; 49,3)

Em 2008 foram colocadas 128 armadilhas/noite. Dez das treze estações de captura foram positivas para a presença de flebótomos. No total foram capturados 2306 espécimes, sendo 1249 machos e 1057 fêmeas, das quais 122 estavam ingurgitadas (Quadro 22).

Quadro 22- Números de capturas de flebótomos no Algarve em 2008.

Mês	Estação de captura	Armadilha/noite	♂	♀♀ totais (♀ ingurgitadas)	Total de flebótomos capturados (%♂;%♀)
Maio	AL3	6	0	1	1 (0; 100)
	AL9	6	2	3	5 (40; 60)
	AL10	12	2	0	2 (100; 0)
Junho	AL3	1	0	0	0
	AL9	3	85	112 (19)	197 (43,1; 56,9)
	AL10	6	14	16 (3)	30 (46,7; 53,3)
	AL11	6	0	(1)	1 (0, 100)
	AL12	6	332	246 (15)	578 (57,4; 42,6)
	AL13	2	0	0	0
Julho	AL9	5	4	5 (1)	9 (44,4; 55,6)
	AL10	4	15	7 (3)	22 (68,2; 31,8)
	AL12	6	79	48 (4)	127 (62,2; 37,8)
	AL14	4	2	3	5 (40; 60)
Agosto	AL1	3	31	50 (2)	81 (38,3; 61,7)
	AL13	3	0	0	0
	AL15	6	257	192 (31)	449 (57,2; 42,8)
	AL16	6	333	297 (40)	630 (52,2; 47,1)
	AL17	4	0	0	0
Setembro	AL1	2	0	0	0
	AL9	3	43	35 (1)	78 (55,1; 44,9)
	AL10	4	4	12	16 (25; 75)
	AL12	3	44	22 (1)	66 (66,7; 33,3)
	AL18	6	1	0	1 (100; 0)
Outubro	AL9	3	1	2 (1)	3 (33,3; 66,7)
	AL10	9	0	0	0
	AL12	6	0	5	5 (100; 0)
	AL19	3	0	0	0
Total	n= 13	128	1249	1057 (122)	2306 (54,2; 45,8)

Em 2007 foram identificadas três espécies. A espécie *P. perniciosus* foi identificada em quatro estações de captura (AL3, AL5, AL6 e AL9), a uma altitude que variou entre os 11 e os 57 metros. *P. sergenti* foi encontrada em AL6 (50 m de altitude) e *S. minuta* em AL3 (11 m de altitude) (Quadro 23).

Quadro 23- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas no Algarve em 2007.

Mês	Estação de captura (altitude em m)	Espécies identificadas
Junho	AL3 (12)	<i>P. perniciosus</i> (♂)
	AL5 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Julho	AL3 (12)	<i>S. minuta</i> (♂)
	AL5 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL6 (50)	<i>P. sergenti</i> (♂)
Agosto	AL5 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL6 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀), <i>P. sergenti</i> (♀)
	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♂)
Setembro	AL5 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL6 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL9	<i>P. perniciosus</i> (♀)
Outubro	AL5 (50)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♀)

Em 2008 foram identificadas quatro espécies. *Phlebotomus perniciosus* foi identificado em oito das dez estações positivas para a presença de flebotomos (AL1, AL3, AL9, AL10, AL12, AL14, AL15 e AL16), entre os 12 e os 253 metros de altitude. Em dois dos locais (AL11 e AL18), por se ter capturado um número reduzido de flebotomos, não se procedeu à identificação de nenhum espécime, tendo sido os insectos capturados destinados à pesquisa de ácidos nucleicos virais.

A segunda espécie com maior distribuição foi *S. minuta*, encontrada em cinco das dez estações de captura (AL10, AL12, AL14, AL15 e AL16), entre os 51 e os 253 metros. A espécie *P. sergenti* foi encontrada em três estações de captura (AL9, AL10 E AL16), entre os 51 e os 57 m e *P. arisasi* numa estação de captura (AL15), a uma altitude de 237 m (Quadro 24).

Quadro 24- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas no Algarve em 2008.

Mês	Estação de captura (altitude em m)	Espécies Identificadas
Junho	AL3 (11)	<i>P. perniciosus</i> (♀)
	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL10 (51)	<i>P. perniciosus</i> (♂)
	AL12 (85)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Julho	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. sergenti</i> (♂)
	AL10 (51)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. sergenti</i> (♂,♀)
	AL12 (85)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>S. minuta</i> (♂)
	AL14 (86)	<i>S. minuta</i> (♂)
Agosto	AL1 (12)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AL15 (237)	<i>P. ariasi</i> (♂) <i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>S. minuta</i> (♂)
	AL16 (253)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. sergenti</i> (♂); <i>S. minuta</i> (♂)
Setembro	AL10 (51)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>S. minuta</i> (♀)
Outubro	AL9 (57)	<i>P. perniciosus</i> (♂)
	AL12 (85)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)

Na figura 22 encontram-se as percentagens relativas dos espécimes identificados. *Phlebotomus perniciosus* foi a espécie mais abundante (91%). As outras três espécies foram identificadas em muito menor percentagem (3%).

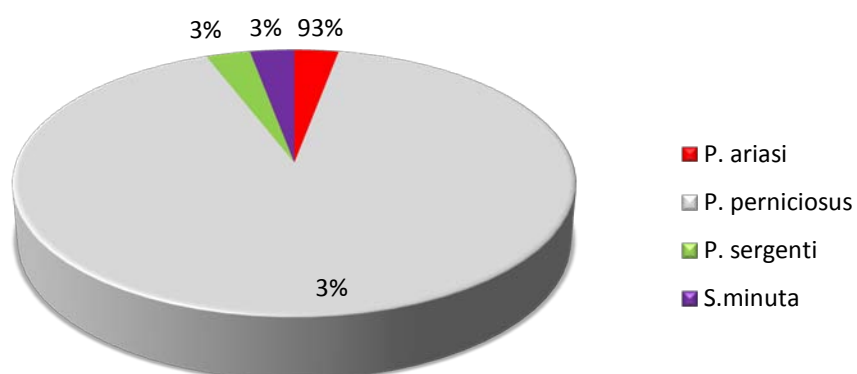


Figura 22 - Abundância relativa das espécies identificadas no Algarve.

5.3.2. Arrábida

Na Arrábida, no total das duas épocas de captura foram colocadas armadilhas em 12 estações (Figura 23), em altitudes que variaram entre os 20 e os 191 metros. No Quadro 25 encontram-se as localidades onde se situava cada estação de captura, a altitude a que se encontravam e o tipo de instalações onde as armadilhas foram colocadas.

Quadro 25- Descrição das estações de captura de flebótomos na zona da Arrábida.

Localidade	Estação de captura	Altitude (m)	Tipo de instalação
Faralhão	AR1	20	Capoeira
Palmela	AR2	40	Canil, coelheira
Grelhal	AR3	74	Canil, coelheira
Aldeia Grande	AR4	48	Capoeira, pombal
Azeitão	AR5	65	Capoeira, curral de ovelhas
Azeitão	AR6	50	Canil
Sesimbra	AR7	191	Capoeira
Azeitão	AR8	103	Cavaliariça
Aldeia Grande	AR9	41	Capoeira
Picheleiros	AR10	42	Canil
Picheleiros	AR11	110	Canil
Maçã	AR12	104	Canil, Capoeira

V- Identificação de flebótomos

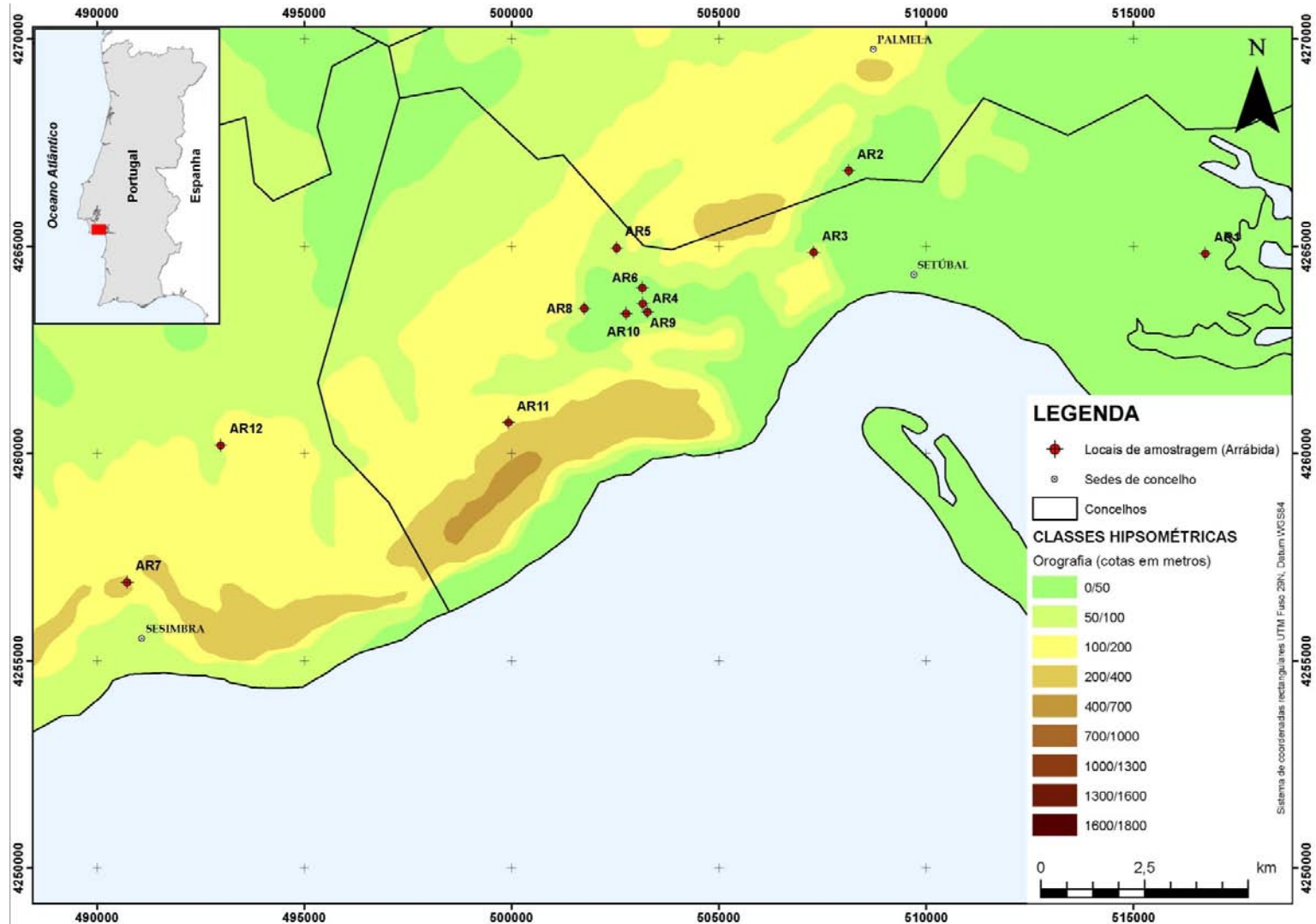


Figura 23 - Estações de captura de flebótomos na zona da Arrábida.

Na Arrábida, foram colocadas 244 armadilhas/noite, distribuídas por 12 estações de captura. Foram capturados 1422 flebótomos machos e 1225 fêmeas, das quais 147 se encontravam ingurgitadas.

Em 2007 foram colocadas 122 armadilhas/noite em nove estações de captura. Cinco das estações foram positivas para a presença de flebótomos. Foram capturados 2154 espécimes, dos quais 985 machos e 1169 fêmeas, estando 605 ingurgitadas (Quadro 26).

Quadro 26- Números de capturas de flebótomos na Arrábida em 2007.

Mês	Estação de captura	Armadilha/noite	♂	♀ totais (♀ ingurgitadas)	Total de flebótomos capturados (%♂;%♀)
Junho	AR1	6	0	0	0
	AR2	6	1	11 (10)	12 (8,3; 91,7)
	AR5	8	106	76 (44)	182 (58,2; 41,8)
	AR7	5	0	0	0
Julho	AR2	4	0	0	0
	AR5	13	218	405 (172)	623 (35; 65)
	AR6	4	0	0	0
	AR8	4	0	0	0
Agosto	AR3	9	4	7 (3)	11 (36,4; 63,6)
	AR4	9	27	28 (14)	55 (49,1; 50,9)
	AR5	6	326	352 (222)	678 (48,1; 51,9)
Setembro	AR3	6	43	50 (10)	93 (46,2; 53,8)
	AR4	6	16	13	29 (55,2; 44,8)
	AR5	6	218	192 (122)	410 (53,2; 46,8)
	AR9	6	5	7	12 (41,7; 58,39)
Outubro	AR3	6	3	8 (1)	11 (27,3; 72,7)
	AR4	6	11	3 (2)	14 (78,6; 21,4)
	AR5	6	7	17 (5)	24 (29,2; 70,8)
	AR9	6	0	0	0
Total	n= 9	122	985	1169 (605)	2154 (45,7; 54,3)

Em 2008 foram colocadas 122 armadilhas/noite em seis estações de captura. No total capturaram-se 2777 flebótomos, dos quais, 923 machos, e 1854 fêmeas, 851 das quais estavam ingurgitadas. Em AR11, além da captura pelas armadilhas, procedeu-se também à aspiração de flebótomos nos locais de repouso.

Todas as estações de captura foram positivas para a presença de flebótomos (Quadro 27).

Quadro 27- Números de capturas de flebotomos na Arrábida em 2008.

Mês	Estação de captura	Armadilha/noite	♂	♀ totais (♀ ingurgitadas)	Total de flebotomos capturados (%♂;%♀)
Maio	AR3	6	6	11 (2)	17 (35,3; 64,7)
	AR4	6	0	0	0
	AR5	6	0	0	0
Junho	AR3	6	31	63 (15)	94 (33; 67)
	AR4	6	20	3	23 (87; 13)
	AR5	6	133	274 (100)	407 (32,7; 67,3)
	AR11	4	1	12 (1)	13 (7,7; 92,3)
Julho	AR3	6	4	47 (2)	51 (7,8; 92,2)
	AR5	6	161	470 (289)	631 (25,5; 74,5)
	AR10	2	0	6 (2)	6 (0, 100)
	AR11	4	121	269 (182)	390 (31; 69)
	AR12	4	9	64 (4)	73 (12,3; 87,7)
Agosto	AR3	6	5	7	12 (41,7; 58,3)
	AR5	5	162	158 (105)	320 (50,6; 49,4)
	AR11	6	35	83 (66)	118 (29,7; 70,3)
	AR12	6	3	10 (3)	13 (23,1; 76,9)
Setembro	AR3	6	72	192 (58)	264 (27,3; 72,7)
	AR5	6	126	116 (16)	242 (52,2; 47,9)
	AR10	1	0	0	0
	AR12	6	30	53 (5)	83 (36,1; 63,9)
Outubro	AR3	6	0	0	0
	AR5	6	1	5 (1)	6 (16,7; 83,3)
	AR12	6	3	11	14 (21,4; 78,6)
Total	n= 6	122	923	1854 (851)	2777 (33,2; 66,8)

Na zona da Arrábida foram identificadas três espécies de flebotomos em 2007. *Phlebotomus perniciosus* foi encontrada em todas as estações de captura positivas (AR1, AR3, AR4, AR5 e AR9), entre os 40 e os 74 metros de altitude. *P. ariasi* foi identificado em dois locais (AR11 e AR12, entre os 65 e os 74 metros) e *P. sergenti* em dois locais (AR4 e AR5, entre os 48 e os 65 metros) (Quadro 28).

Quadro 28- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas na Arrábida em 2007.

Mês	Estação de captura	Espécies identificadas
Junho	AR1 (20)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Julho	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. sergenti</i> (♂)
Agosto	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR4 (48)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. sergenti</i> (♀)
Setembro	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. ariasi</i>
	AR4 (48)	<i>P. perniciosus</i> (♂); <i>P. sergenti</i> (♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀); <i>P. ariasi</i> (♂)
	AR9 (41)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Outubro	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR4 (48)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)

Tal como em 2007, em 2008 também foram identificadas três espécies de flebotomos na Arrábida. Em todos os locais positivos para a presença de flebotomos (AR3, AR4, AR5, AR10, AR11 e AR12), foram encontrados indivíduos da espécie *P. perniciosus*, entre os 42 e os 110 metros de altitude. *P. ariasi* foi identificado em dois locais (AR11 e AR12) entre os 104 e os 110 metros de altitude e *P. sergenti* num local (AR5) a 65 metros de altitude (Quadro 29).

Quadro 29- Estações de captura e espécies de flebotomos identificadas na Arrábida em 2008.

Mês	Estação de captura	Espécies identificadas
Maio	AR4 (48)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Junho	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR4 (48)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀), <i>P. sergenti</i> (♀)
	AR10 (42)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
Julho	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR11 (110)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀), <i>P. ariasi</i> (♂)
	AR12 (104)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀),
Agosto	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR12 (104)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀), <i>P. ariasi</i> (♂)
Setembro	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR12 (104)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀), <i>P. ariasi</i> (♂)
Outubro	AR3 (74)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR5 (65)	<i>P. perniciosus</i> (♂,♀)
	AR12 (104)	<i>P. ariasi</i> (♂)

Na figura 24 encontram-se as abundâncias relativas dos espécimes identificados. *Phlebotomus perniciosus* foi a espécie mais abundante (94%). As outras duas espécies foram identificadas em muito menor percentagem. *Phlebotomus sergenti* apresentou uma percentagem de 4% e *P. ariasi* de 2%

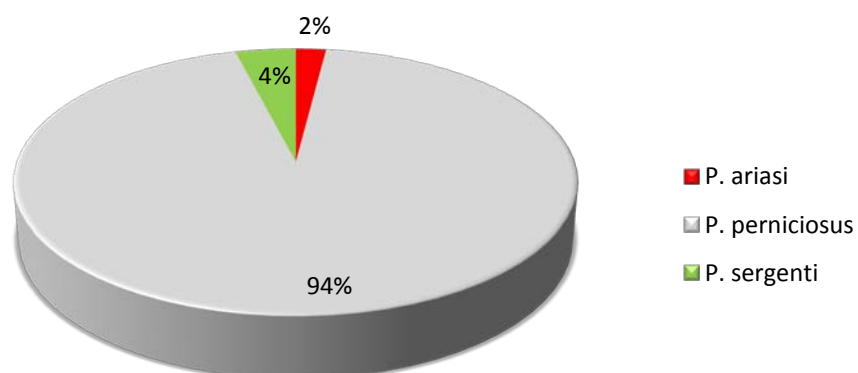


Figura 24 - Abundâncias relativas das espécies identificadas na Arrábida.

5.3.3. Descrição das espécies identificadas

A identificação de quatro das cinco espécies presentes no nosso país foi possível com a observação de preparações definitivas observadas ao microscópio de contraste de fase.

As espécies identificadas na Arrábida foram *P. ariasi*, *P. perniciosus* e *P. sergenti*. No Algarve, além destas, foi também identificada a espécie *S. minuta*.

Na espécie *P. ariasi*, os edeagos são longos, largos, com os ápices dilatados e transparentes, em forma de clava. Os gonostilos apresentam cinco espinhos, dois deles terminais (Figura 25).



Figura 25 - Pormenor da genitália de *P. ariasi* (foto: Fátima Amaro).

A principal característica distintiva nos machos de *P. perniciosus* são os edeagos longos e bifurcados, podendo no entanto ser simples em alguns espécimes (Figura 26).



Figura 26 - Pormenor da genitália de *P. perniciosus* (foto: Fátima Amaro).

As espermatecas de *P. perniciosus* têm canais condutores estriados com diâmetro uniforme e um bolbo na região basal. O corpo de cada espermateca tem, em média, cerca de dez a doze anéis e um colo longo e estreito (Figura 27).

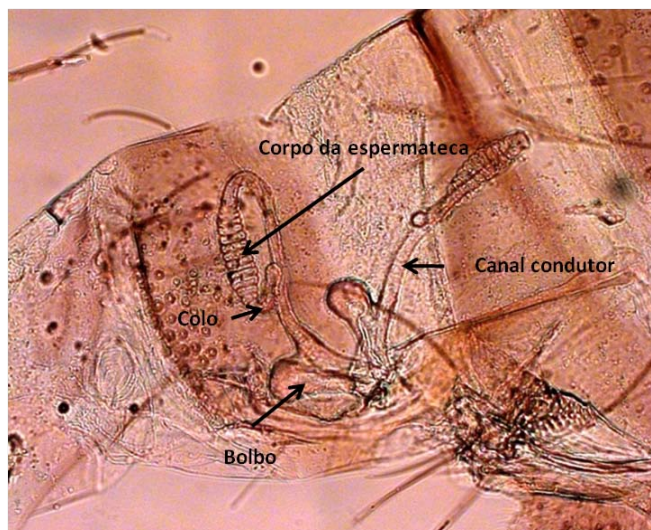


Figura 27 - Pormenor das espermatecas de *P. perniciosus* (foto: Fátima Amaro).

Em *P. sergenti* os edeagos são curtos, afilados em forma de adaga e encurvados. Os gonostilos são largos e apresentam quatro espinhos, dispostos dois a dois (Figura 28).

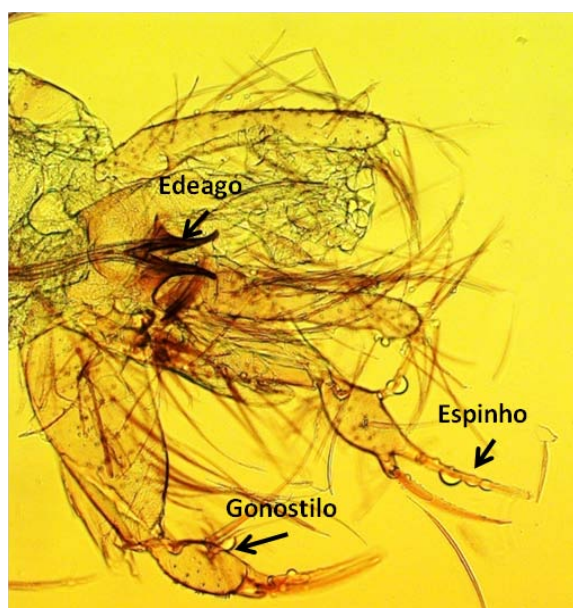


Figura 28 - Pormenor da genitália de *P. sergenti* (foto: Fátima Amaro).

Os corpos das espermatecas da espécie *P. sergenti* são desprovidos de colo e apresentam em média 4 a 5 anéis. Esta espécie não tem bolbo na região basal das espermatecas (Figura 29).

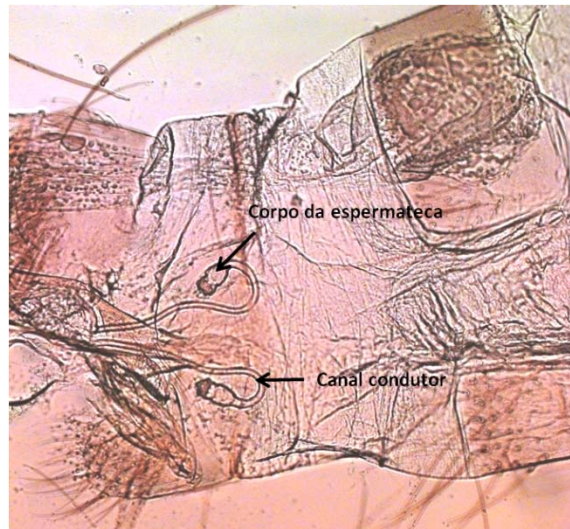


Figura 29 - Pormenor das espermatecas de *P. sergenti* (foto: Fátima Amaro).

Os gonostilos de *S. minuta* apresentam 4 espinhos apicais fortes, inseridos ao mesmo nível (Figura 30).

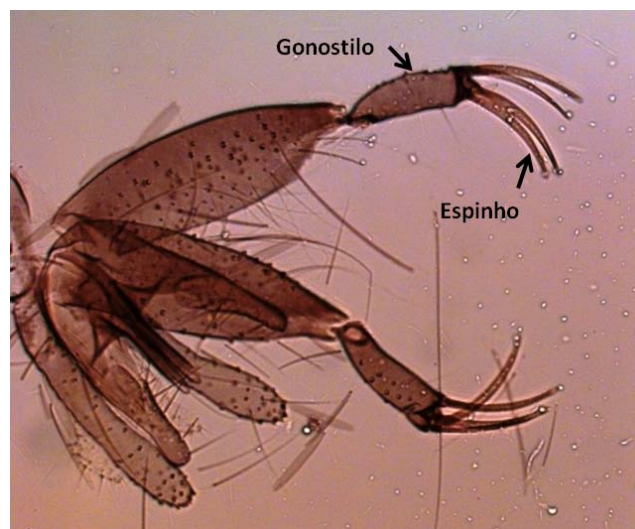


Figura 30 - Pormenor da genitália de *S. minuta* (foto: Fátima Amaro).

No que diz respeito às fêmeas, foram identificadas, nas duas zonas de estudo, duas espécies nomeadamente a *P. perniciosus* e *P. sergenti*. Nos machos, foi possível a identificação das quatro espécies referidas para o Algarve e das três referidas para a Arrábida.

5.4. Conclusões e Discussão

Alguns dos locais seleccionados acabaram por não se revelar ideais para a captura de flebótomos, uma vez que não eram abrigados, como por exemplo a vacaria (AL17) e algumas capoeiras, uma vez que a ausência de vento é um factor determinante para o sucesso das capturas. No entanto, durante o presente estudo capturaram-se flebótomos em vinte das trinta e uma estações seleccionadas para o trabalho de campo. A maioria destas estações consistiam em capoeiras, no entanto também foram encontrados flebótomos em canis e coelheiras.

Estudos sobre as refeições sanguíneas mostram que o leque de hospedeiros dos flebótomos é bastante alargado, incluindo desde aves a roedores, passando por gado ovino, bovino, cães e seres humanos (Rossi *et al.*, 2007, Abdoli *et al.*, 2007, Bongiorno *et al.*, 2003). As refeições sanguíneas identificadas geralmente nos flebótomos correspondem aos animais que se encontram mais perto dos locais de repouso e também, em maior quantidade. Num estudo realizado em Israel (Abbasi *et al.* 2009), 36 em 37 espécimes de *P. papatasi* capturados no interior de habitações humanas tinham realizado refeições sanguíneas em humanos. Por outro lado, quando capturados numa quinta com animais, as fêmeas da mesma espécie tinham-se alimentado em vacas e galinhas. Os flebótomos são assim oportunistas e desde que os factores necessários estejam reunidos (condições de temperatura e humidade, existência de matéria orgânica e ausência de vento), eles podem ocorrer em instalações de uma grande variedade de animais. Este facto pode também justificar o leque grande de animais já detectados com anticorpos para flebovírus e sem papel de reservatório confirmado.

O dióxido de carbono foi utilizado como isco em todas as sessões de armadilhagem. Dado que os machos dos flebótomos não são hematófagos, é

geralmente assumido que estes não são atraídos pelo CO₂, pelo que a razão entre os géneros, quando se utiliza armadilhas CDC iscadas com gelo seco, será mais favorável à captura de fêmeas.

No presente estudo, existiram grandes variações na razão entre os géneros, verificando-se mesmo, em alguns casos, que o número de imagos machos capturados foi superior ao número de imagos fêmeas, principalmente no Algarve. Podemos assim assumir, que as armadilhas utilizadas foram eficazes para a captura de ambos os géneros, à semelhança do que tem sido verificado por outros autores (Dinesh *et al.*, 2008), provavelmente devido ao efeito da luz da armadilha, que atrai ambos os sexos, ou devido à presença das fêmeas dentro das armadilhas que podem atrair os machos.

Em relação às fêmeas, segundo Lonzano e colaboradores (2001), as menos activas são as que já realizaram ingestão de sangue (ingurgitadas) ou aquelas que se encontram em processo de maturação de ovos. Estas últimas mostram uma menor resposta à luz, uma vez que se retiram para os lugares de repouso para realizar a postura. As fêmeas mais activas são assim as mais jovens, ou aquelas que não ingeriram sangue, pois procuram um hospedeiro no qual se possam alimentar.

As estações de captura onde se observou, em alguns meses, uma diferença favorável ao número de fêmeas ingurgitadas em relação ao número das não ingurgitadas, foram AR5 em 2007 e 2008 e AR11, em 2008. AR5 é uma estação de captura com características ideais para a proliferação de flebótomos, consistindo num local muito abrigado, onde as ovelhas são encaminhadas para se alimentar e ser ordenhadas. As fêmeas de flebótomos têm assim grande quantidade de hospedeiros disponíveis, de forma regular. Provavelmente as fêmeas ingurgitadas foram capturadas quando se dirigiam para o seu local de repouso.

No caso de AR11, o maior número de fêmeas ingurgitadas foi obtido com recurso ao aspirador. Das 182 fêmeas ingurgitadas capturadas em Julho, 180 foram capturadas com este método. Em Agosto, todas as fêmeas ingurgitadas foram capturadas igualmente com o aspirador. Estas capturas foram realizadas nas “celas” onde os cães passavam a noite. Estas instalações possuíam os tectos baixos onde os flebótomos se

encontravam em repouso sendo notória a letargia das fêmeas ingurgitadas, que foram aspiradas muito facilmente.

No decurso deste trabalho foram encontradas quatro das cinco espécies presentes em Portugal: *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* e *S. minuta*.

A espécie *P. papatasi* não foi encontrada em nenhuma das estações de captura. Segundo Pires (2000), além de *P. papatasi* ser rara no nosso país, esta espécie parece não ser muito atraída pelas armadilhas tipo CDC. Numa revisão sobre os conhecimentos existentes em flebotomos Lewis (1971) salientou que, aparentemente, esta espécie apresenta um fototropismo negativo, por esse motivo, neste trabalho, foram também realizadas colheitas por aspiração, sem sucesso, para capturar *P. papatasi*.

Na Arrábida não foram identificados espécimes de *S. minuta*. Esta espécie foi, no entanto, encontrada anteriormente por Pires (2000) na Arrábida, embora em número reduzido (25 espécimes).

Phlebotomus sergenti apresenta reduzida abundância em Portugal, excepto no sul (regiões do Algarve e Évora) e foi considerada uma espécie residual por Fernandes (com. pess. in Afonso *et al.*, 2005) na zona da Arrábida. Num estudo realizado por Afonso e colaboradores (2005), entre 2002 e 2003 na zona da Arrábida, no total dos exemplares identificados 0,45% pertenciam a esta espécie enquanto 27,07% eram da espécie *S. minuta*. No presente trabalho, no total dos espécimes identificados na zona da Arrábida 4% pertenciam à espécie *P. sergenti*. Este pode ser um sinal de que as condições ambientais estão a alterar-se nesta zona, permitindo o estabelecimento de *P. sergenti* e o decréscimo nas populações de *S. minuta*. Segundo Afonso e colaboradores (2005) poderá estar a ocorrer um aumento da aridez na região da Arrábida, à semelhança do que tem vindo a acontecer noutros países do oeste da Bacia do Mediterrâneo (Rioux *et al.*, 1997; Rioux 2001).

No que diz respeito à distribuição em altitude, em geral verificou-se que, em ambas as regiões de captura *P. perniciosus* foi encontrado em altitudes que iam de 11 a 253 metros acima do nível do mar. Esta foi a espécie mais representada, estando

presente em todos os locais onde foi realizada a identificação ao nível da espécie. Este resultado está de acordo com Pires (1979) que afirma ser esta a espécie de flebotomo mais abundante e mais amplamente distribuída no nosso país.

Na Arrábida, *P. ariasi* foi identificado a partir dos 65 metros de altitude, embora se tenha encontrado um maior número de espécimes nas armadilhas colocadas a maior altitude, designadamente a 110 metros. No Algarve, *P. ariasi* foi identificado apenas num local a 237 metros de altitude. Estas observações estão de acordo com o descrito por Pires (2000) que refere que esta espécie apresenta a maior densidade entre os 200 e os 399 metros.

Phlebotomus sergenti foi encontrado a partir dos 50 metros em ambas as áreas de estudo. Pires (2000) refere que a altitudes abaixo dos 200-399 metros a presença desta espécie é praticamente nula. Pelo contrário no presente trabalho, *P. sergenti* foi encontrada aos 50 metros de altitude no Algarve e a 65 metros de altitude na Arrábida. Aparentemente, segundo os dados obtidos neste trabalho, esta espécie está a alargar a sua área de distribuição e a ocorrer a altitudes menos elevadas.

Sergentomyia minuta foi encontrado no Algarve em altitudes que variaram entre os 11 e os 253 metros. Pires (2000) referiu que o patamar de maior abundância desta espécie também se situa entre os 200 e os 399 metros, no entanto, a seguir a *P. perniciosus*, no presente estudo, esta foi a espécie encontrada em mais estações de captura e logo a partir dos 11 metros de altitude.

Alguns resultados discordantes na variação altitudinal, em relação a trabalhos anteriores, mostram que a altitude não é um factor ecológico determinante por si só, pelo que a sua influência na distribuição de flebotomos está mais relacionada com a diversidade de habitats e com os gradientes na temperatura, pressão e precipitação que ocorrem a diferentes altitudes, tal como sugerem Guernaoui e colaboradores (2006). Assim, em estudos de distribuição altitudinal é importante não esquecer as condições bióticas e abióticas que se verificam em cada local. A presença de hospedeiros, vegetação específica e disponibilidade de locais de repouso, bem como de locais de criação de larvas ricos em matéria orgânica e com humidade relativa elevada, são

factores determinantes na distribuição dos flebótomos (Guernaoui & Boumezzough, 2009).

VI- Identificação de vírus em flebótomos

```
TGGTTGGGATCGAGGTTCTTGGAGTACGAAGCTCTTGGGTTCTGAACGAGGACCATTGG
.....G.....T.....
GTTCCAGGGAAAACITGGCATGTGGTGTAGGAGGCAICGGAGTCAACTATTTTGGTTAI
.....C.....
TATCTTCAAGAGATAICCAAGAAAGGGAAGTTCTTCATTGCTGAT
.....
```


6.1. Introdução

O contínuo avanço nas técnicas de detecção de agentes etiológicos e o crescente interesse em vírus associados a flebótomos tem demonstrado que o vírus Toscana, e novos flebovírus, estão presentes e a emergir nos países da Bacia do Mediterrâneo com altas taxas de prevalência.

Além dos flebovírus, recentemente começaram a ser também detectados flavivírus em flebótomos (Moreau *et al.*, 2010) mas pouco se sabe ainda sobre o verdadeiro significado destas descobertas, desconhecendo-se por completo a sua importância em termos médicos ou veterinários. Suspeita-se, no entanto, que o número de vírus desconhecidos seja muito maior do que se supunha antes do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

Em Portugal, até ao momento, não foram publicados quaisquer estudos sobre a presença de vírus em flebótomos. Assim, o objectivo do trabalho apresentado no presente capítulo foi pesquisar a presença de flebovírus e de flavivírus nos flebótomos capturados e identificados no Algarve e na Arrábida.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Preparação de pools e macerados

Os flebótomos foram agrupados, por local, data de captura, sexo e estado fisiológico das fêmeas, em *pools*, com um mínimo de um espécime e um máximo de 60 espécimes, consoante o número de flebótomos capturados.

O procedimento de preparação para a extracção de ácidos nucleicos foi o seguinte:

1. Cada *pool* de flebótomos foi colocado numa placa de *Petri* e imerso em PBS com antibiótico²⁸ (0,4%), durante cinco minutos a 4°C;
2. Macerou-se os flebótomos, em azoto líquido, em almofarizes previamente arrefecidos a -20°;

²⁸ Antibiotic – Antimycotic (100X)- Gibco

3. Adicionou-se 2 ml de solução de Hank's²⁹;
4. Centrifugou-se a 3000 g durante 20 minutos a 4°C, para recuperação do sobrenadante;
5. Separou-se uma parte do sobrenadante (200 µl) para o procedimento seguinte e o restante foi armazenado a -80°C para tentativa de isolamento.

6.2.2. Extração de ácidos nucleicos a partir de macerados de flebótomos

Para a extração de ARN para pesquisa de ácidos nucleicos foram utilizados 200 µl do sobrenadante (obtido de acordo com o descrito em 6.2.1.), processados com o kit *PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System*³⁰, de acordo com as instruções do fabricante. A extração é feita pela passagem da amostra em colunas. Todos os tubos e colunas abaixo referidos são fornecidos no kit.

O procedimento efectuado foi o seguinte:

1. Adicionou-se, num tubo, 200 µl do sobrenadante a uma solução contendo 6 µl de 2-mercaptoetanol e 600 µl de solução de lise de ARN³¹;
2. Transferiu-se para uma coluna de homogeneização;
3. Centrifugou-se a 12000 g durante 2 minutos a 25°C;
4. Removeu-se a coluna de homogeneização e manteve-se-se o filtrado;
5. Adicionou-se 600 µl de etanol a 70% a -20°C no tubo que continha o filtrado;
6. Aplicou-se 600 µl da amostra a uma coluna de centrifugação;
7. Centrifugou-se a 12000 g durante 15 segundos a 25°C;
8. Rejeitou-se o filtrado;
9. Repetiu-se os passos 6, 7 e 8 até processar toda a amostra;
10. Adicionou-se 700 µl de tampão de lavagem I³² à coluna de centrifugação;
11. Centrifugou-se a 12000 g durante 15 segundos a 25°C;

²⁹ HBSS (1X) com vermelho fenol- Lonza

³⁰ Invitrogen

³¹ Part nº 46-6001

³² Part n.º 46-6003

12. Rejeitou-se o tubo que continha o filtrado;
13. Colocou-se a coluna num tubo de lavagem novo;
14. Adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem II³³ à coluna de centrifugação;
15. Centrifugou-se a 12000 g durante 15 segundos a 25°C;
16. Rejeitou-se o filtrado;
17. Repetiu-se os passos 14, 15 e 16;
18. Centrifugou-se durante à velocidade máxima, durante 1 minuto, para secar a membrana;
19. Removeu-se a coluna do tubo e colocou-se num tubo de recolha de ARN;
20. Adicionou-se 30 µl de água *RNase free*;
21. Incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente;
22. Centrifugou-se a 12000 g durante 2 minutos a 25°C;
23. Repetiu-se passos 20, 21 e 22;
24. O ARN foi armazenado a – 80°C

6.2.3. Amplificação de ácidos nucleicos de flebovírus

Após a extracção dos ácidos nucleicos, a partir dos macerados de flebótomos, procedeu-se à amplificação de possíveis ácidos nucleicos virais pela técnica de *nRT-PCR*.

Os controlos positivos para a técnica de *nRT-PCR* foram obtidos a partir de 200 µl do stock do vírus (ISS.Ph1.3), por extracção dos ácidos nucleicos utilizando o kit e o procedimento atrás referidos.

Para a detecção de ARN de flebovírus foram utilizados *primers* que reconhecem regiões dos segmentos S e L do genoma de flebovírus (Sánchez-Seco *et al.*, 2003) e que têm sido amplamente utilizados para a detecção e caracterização destes vírus em vários países (Charrel *et al.*, 2009; Venturi *et al.*, 2009; Izri *et al.*, 2008).

Estes *primers* ligam-se às extremidades conservadas nos genomas dos flebovírus Toscana, Nápoles, Sicília, Punta Toro, Rift Valey e Aguacate.

³³ Part n.º 46-6002

Para a amplificação do segmento S dos flebovírus foram utilizados os *primers* TosN123 e TosN829 no RT-PCR e TosN234 e TosN794 na reacção *n*PCR. Estes *primers* amplificam o gene N do segmento S (Quadro 30). Este gene é muito conservado sendo a semelhança de aminoácidos de 99-100% entre as diferentes estirpes de vírus Toscana (Magurano *et al.*, 1999; Charrel *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2008). A dimensão esperada do fragmento amplificado é de 560 pares de bases (pb).

Quadro 30- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação parcial do segmento S de flebovírus.

<i>Primer</i>	Reacção	Sequência
TOSN123	RT-PCR	5' GAGTTTGCTTACCAAGGGTTTG 3'
TOSN829		5' AATCCTAATCCCCTAACCC 3'
TOSN234	<i>n</i> PCR	5' AACCTTGTCAGGGGNAACAAGCC 3'
TOSN794		5' GCCAACCTTGGCGGATACTTC 3'

Os *primers* NPhlebo1+, NPhlebo1-, NPhlebo2+, NPhlebo2- e ATOS2- (Sanchez-Seco *et al.*, 2003) foram utilizados para amplificação da sequência da polimerase viral que se localiza no segmento L dos flebovírus. Estes *primers* (Quadro 31) permitem a amplificação de todos os flebovírus atrás referidos incluindo várias estirpes do vírus Toscana.

Quadro 31- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação parcial do segmento L de flebovírus.

<i>Primer</i>	Reacção	Sequência
NPhlebo1+	RT-PCR	5' ATGGARGGITTGTIWSICIIC 3'
NPhlebo1-		5' AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIG 3'
NPhlebo2+	<i>n</i> PCR	5' WTICCIAICCIYMSAARATG 3'
NPhlebo2-		5' TCYTCYTRTTYTRARRTARCC 3'
ATos2-		5 RTGRAGCTGGAAGGIGWIG 3'

Os *primers* Phlebo1 foram utilizados na reacção de RT-PCR e os Phlebo2 na reacção de *n*PCR. A dimensão esperada do fragmento amplificado é de 244 pb. O *primer* ATos2- é específico para o vírus Toscana e pode ser utilizado no lugar do NPhlebo2- na reacção de *n*PCR. No caso da utilização de ATos2- o tamanho esperado para o fragmento amplificado é 126 pb.

Todas as reacções de RT-PCR foram realizadas com o kit *Super- Script one-step RT-PCR com Platinum[®] Taq*³⁴ num termociclador³⁵.

As misturas de reacção foram preparadas para um volume de 12,5 µl, de acordo com as instruções do fabricante: 6,25 µl de *2X Reaction Mix*³⁶, 0,5 µl de cada *primer* a uma concentração de 25 pmol/µl, 0,5 µl de *RT/Platinum[®] Taq mix* e água *RNase free* para perfazer os 12,5 µl. O ARN molde (2,5 µl resultante das extracções de ácidos nucleicos) foi sempre adicionado em sala separada.

A reacção decorreu nas seguintes condições: síntese de ADN complementar (cADN) a 50°C durante 30 minutos, seguida de 2 minutos de desnaturação a 94°C e de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos à temperatura de *annealing* (62°C ou 45°C para os primers NTOS ou Phlebo, respectivamente) durante 30 segundos, e 72°C durante 1 minuto. A amplificação foi completada com 5 minutos a 72°C para permitir a extensão completa dos produtos de PCR.

O *n*PCR foi realizado com o kit *High Fidelity PCR Master*³⁷ para volumes de 25 µl.

De acordo com o fabricante, a 12,5 µl de *Reaction Mix*³⁸ foram adicionados 0,5 µl de cada *primer* a uma concentração de 25 pmol/µl e água *RNase free* até perfazer os 25 µl. Adicionou-se depois, em sala separada, 5 µl do produto de RT-PCR.

Para a reacção de *n*PCR as condições no termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 35 ciclos a 94°C durante 15

³⁴ Invitrogen

³⁵ Biometra, T3

³⁶ Tampão contendo 0,4Mm de cada dNTP + 2,4 Nm MgSO₄

³⁷ Roche

³⁸ Enzima + tampão de reacção contendo 3 Mm MgCl₂ + nucleótidos

segundos, à temperatura de *annealing* (62°C ou 45°C para os primers NTOS ou Phlebo, respectivamente) durante 15 segundos, e 72°C durante 5 minutos.

Em todas as reacções foram incluídos controlo positivos (ARN de vírus Toscana, estirpe (ISS.Ph1.3) e negativos (H₂O).

6.2.4. Amplificação de ácidos nucleicos de flavivírus

Para a pesquisa de flavivírus utilizou-se um par de *primers* desenhado para as regiões consenso do gene NS5 do género *Flavivirus*, EDL/Fla-U9093 e EDL/Fla-L9279 (Briese *et al.*, 1999; Briese *et al.*, 2002) (Quadro 32).

Quadro 32- Primers utilizados no nRT-PCR para amplificação do gene NS5 dos flavivírus.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
EDL/Fla-U9093	5' AGY MGR GCH ATH TGG TWY ATG TGG 3'
EDL/Fla-L9279	5' TCC CAV CCD GCK GTR TCA TC 3'

Todo o procedimento foi semelhante ao atrás referido no que diz respeito aos kits utilizados nas misturas de reacção e condições de amplificação, no entanto a temperatura de *annealing* foi de 58°C na reacção de RT-PCR e de 60 °C na reacção e *nPCR*. O par de *primers* EDL/Fla-U9093 e EDL/Fla-L9279 foi utilizado não só na reacção de RT-PCR mas também para fazer uma segunda amplificação. A dimensão esperada para o fragmento amplificado foi de cerca de 200 pb.

Em todas as reacções foram incluídos controlo positivos (ARN de vírus *West Nile*, estirpe Eg 101) e negativos (H₂O).

6.2.5. Visualização, purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados

Os produtos de *n*RT-PCR (5 µl, neste caso) adicionados a tampão de amostra contendo azul de Bromofenol³⁹ foram analisados, por electroforese, em gel de agarose⁴⁰ a 1,5% com tampão TBE⁴¹ 1X e 0,7 µl de GelRedTM (para 30 ml de gel) e visualizados sob luz UV. Os pesos moleculares foram determinados por comparação com um marcador de massa molecular⁴².

Os produtos de PCR foram purificados directamente com o kit *Jet Quick-PCR Purification*⁴³. Todos os tubos e colunas abaixo referidos são fornecidos no kit.

De acordo com as instruções do fabricante o protocolo foi o seguinte:

1. Adicionou-se, num tubo, 400 µl de solução H1⁴⁴ ao produto de PCR;
2. Colocou-se uma coluna de centrifugação num tubo colector e adicionou-se a solução do passo anterior;
3. Centrifugou-se a 12000 g durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado;
4. Recolocou-se a coluna no tubo colector e adicionou-se 500 µl da solução H2⁴⁵;
5. Centrifugou-se a 12000 g durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado;
6. Recolocou-se a coluna no tubo colector e centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima;
7. Colocou-se a coluna num tubo novo e adicionou-se 40 µl de água directamente no centro da membrana de sílica da coluna;
8. Centrifugou-se a 12000 g durante 2 minutos e guardou-se a -20°C

Para a sequenciação foram preparadas reacções, com o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*⁴⁶. Assim, para um volume final de 10 µl e para cada um dos dois *primers*, e de acordo com instruções do fabricante, preparou-se

³⁹ 0,25% Azul Bromofenol + 0,25% Xileno Cianol + 30% Glicerol

⁴⁰ SeaKem LE Agarose, LONZA

⁴¹ *Tris-borate-EDTA*

⁴² Promega PCR Markers

⁴³ Genomed

⁴⁴ Contém hidróclorido de guanidina

⁴⁵ Contém etanol, NaCl, EDTA e Tris/HCl

⁴⁶ Applied Biosystems

uma mistura de reacção com 0,7 µl de BigDye,⁴⁷ 0,5 µl de primer, 3,0 µl de tampão⁴⁸ e 2-4 µl de DNA molde e água até perfazer os 10 µl. Os primers utilizados foram os mesmos que foram utilizados para as reacções de *n*PCR.

As sequências foram determinadas num sequenciador *ABI automated DNA capillary sequencer*⁴⁹.

6.2.6. Análise das sequências

As sequências foram corrigidas, tendo em conta as sequências obtidas para cada *primer*, com o programa *Bioedit (Biological sequence alignment editor for Windows)*. A pesquisa da semelhança com outras sequências foi efectuada recorrendo ao algoritmo *BLASTN* (Altschul *et al.*, 1997) na base de dados da *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*⁵⁰.

6.2.7. Construção de árvores filogenéticas

Para a análise filogenética os alinhamentos das sequências obtidas foram efectuados usando o programa *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997). Assim, as sequências dos *primers*, excepto os últimos três nucleótidos nas terminações 3' e 5' foram removidos do alinhamento. As relações filogenéticas entre as diferentes estirpes de vírus foram determinadas por análise *neighbor-joining* no programa *PAUP** versão 4.0b10 (Swofford, 2003). As matrizes de distância foram calculadas utilizando o modelo Kimura de dois parâmetros para a correcção das substituições múltiplas. A análise *bootstrap* foi obtida com 1000 réplicas.

⁴⁷ Ready Reaction Mix BigDye®

⁴⁸ BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)

⁴⁹ Applied Biosystems

⁵⁰ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

6.2.8. Isolamento de vírus

O sobrenadante dos macerados de flebótomos, confirmados por *n*RT-PCR, obtidos conforme anteriormente descrito, foi utilizado para inocular células VERO E6 e C636 (células de mosquito) com o objectivo de isolar flebovírus ou flavívirus. O protocolo consistiu no seguinte:

- 1) Inoculou-se 100 µl do sobrenadante do macerado a testar em frascos T25 com monocamada de células VERO E6;
- 2) Deixou-se adsorver durante uma hora a 37°C;
- 3) Adicionou-se 10 ml de meio de cultura MEM com 10% de FBS e antibiótico (0,1%);
- 4) Após três dias rejeitou-se o meio MEM e adicionou-se 10 ml de meio MEM com 2% de FBS;
- 5) Incubou-se 15 dias a 37°C com mudança semanal de meio;
- 6) Após 15 dias de incubação preparou-se uma lâmina para provas de crescimento do vírus;
- 7) Na ausência de crescimento viral lisaram-se as células por congelamento e descongelamento, centrifugaram-se e voltaram a inocular-se em novo frasco de células por mais três ou quatro passagens cegas de 15 dias.

6.3. Resultados

6.3.1. Detecção de ácidos nucleicos

A pesquisa de ácidos nucleicos virais foi realizada num total de 6940 flebótomos (3042 machos, 2188 fêmeas não ingurgitadas e 1710 fêmeas ingurgitadas), organizados em 269 *pools*: 36 *pools* em 2007 e 77 *pools* em 2008 no Algarve; 70 *pools* em 2007 e 86 *pools* em 2008 na Arrábida.

Os 269 *pools* revelaram-se negativos para a pesquisa de flebovírus através da amplificação dos fragmentos S e L.

A pesquisa de flavivirus foi realizada em 90 *pools* (33% do n.º total de *pools*), que continham um total de 1904 flebótomos (27,4% do n.º total de flebótomos). Um dos *pools* foi positivo para a amplificação de ARN de flavivirus. A amostra positiva foi um *pool* constituído por quatro flebótomos machos, capturados em AL9, em Setembro de 2007.

Após a purificação e sequenciação do fragmento amplificado, as sequências resultantes foram analisadas, corrigidas e alinhadas de acordo com o atrás referido. Foi obtida uma sequência com 165 pb.

Por comparação das sequências via *BLASTN* verificou-se a existência de uma semelhança de 100% com sequências de flavivirus detectadas no CEVDI em culicídeos capturados no nosso país, submetidas ao *GenBank* com os códigos de acesso EU716415, EU716417, EU716418, EU716419, EU716421, EU716422, EU716423, EU716424. A sequência detectada neste trabalho, designada como PoPhlFlav76, apresentou ainda 98% de semelhança com a sequência de um flavivirus detectado em *Ochlerotatus caspius* (OccaFV2, n.º de acesso GQ476993), em Itália (Figura 31).

A possibilidade de contaminação laboratorial foi excluída por amplificação da amostra a partir do ARN stock sem manipulação simultânea de amostras de flavivirus de mosquitos e sempre com controlos positivo e negativo.

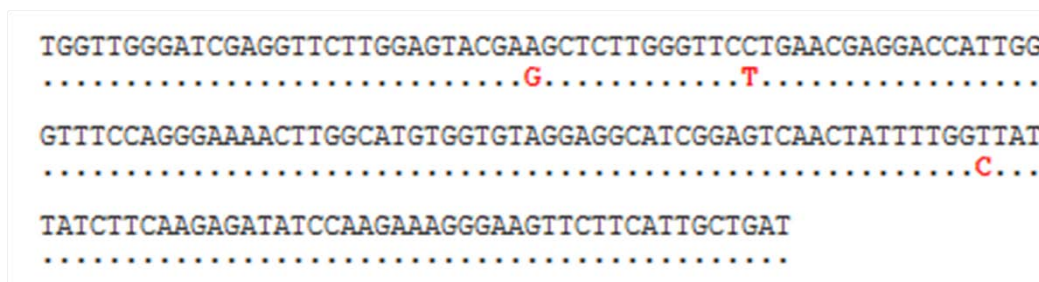


Figura 31 - Alinhamento dos nucleótidos das sequências parciais do gene NS5 dos flavivirus PoPhlFlav76, e OccaFV2. Na linha superior encontra-se a sequência PoPhlFlav76, obtida neste trabalho e na linha inferior a sequência do flavivirus OccaFV2. Os pontos significam identidade e as letras a vermelho as diferenças entre as duas sequências.

Na análise das sequências apresentadas verifica-se a presença de três transições entre a sequência PoPhlFlav76 e OccaFV2 nas posições, G→A; T→C e C→T. Estas variações são silenciosas, não se traduzindo em alteração dos aminoácidos codificados.

A sequência foi submetida ao *GenBank*⁵¹, tendo-lhe sido atribuído o n.º de acesso HM563684.

6.3.2. Árvore filogenética

Na figura 32 apresenta-se a árvore filogenética realizada para comparação de várias sequências com a sequência determinada neste estudo. Para a construção da árvore foram utilizadas a sequência obtida e mais 23 sequências parciais do gene NS5 de flavivírus de mosquitos e de flebótomos.

⁵¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html>

Quadro 33- Sequências parciais do gene NS5 utilizadas na construção da árvore filogenética.

Abreviatura Vírus	Vírus	Estirpe/Origem geográfica	Origem	N.º acesso Genbank	Referência
PAFV	Phlebotomus flavivirus	PoPhlFlav76, Portugal	<i>Phlebotomus</i> sp.	HM563684	CEVDI
PAFV	Phlebotomus flavivirus	Alg_F8, Argélia	<i>P. perniciosus</i>	FJ817076	Moreau <i>et al.</i> , 2010
PAFV	Phlebotomus flavivirus	Alg_F19, Argélia	<i>P. perniciosus</i>	FJ817075	Moreau <i>et al.</i> , 2010
SABV	Saboya virus	Dak Ar D 4600, Senegal	<i>Phlebotomus</i> sp.	EU074010	Moureau <i>et al.</i> , 2007
CFV	Mosquito flavivirus	PoMoFlav_A91, Portugal	<i>Culex univittatus</i>	EU716415	CEVDI
CFV	Mosquito flavivirus	PoMoFlav_A95, Portugal	<i>Ochlerotatus caspius</i>	EU716416	CEVDI
CFV	Cx. theileri flavivirus	PoMoFlav_A131, Portugal	<i>Cx. theileri</i>	EU716420	CEVDI
CFAV*	Cell fusing agent virus	H9-84	Linha celular de <i>A. aegypti</i>	EU074055	Moureau <i>et al.</i> , 2007
CxFV	Culex flavivirus	NIID-21-2, Japan:Tokyo	<i>Cx. pipiens</i>	AB377213	Hoshino <i>et al.</i> , 2007
CxFV	Culex flavivirus	Tokyo, Japan:Tokyo	<i>Cx. pipiens</i>	AB262759	Hoshino <i>et al.</i> , 2007
CxFV	Culex flavivirus	HOU24518, USA	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	FJ502995	Kim <i>et al.</i> , 2009
CxFV	Culex flavivirus	Iowa07, USA	<i>Cx. pipiens</i>	FJ663034	Blitvich <i>et al.</i> , 2009
CxFV	Culex flavivirus	Mex07, Mexico	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	EU879060	Farfan-Ale <i>et al.</i> , 2009
CxFV	Culex flavivirus	Uganda08, Uganda	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	GQ165808	Cook <i>et al.</i> , 2009
KRV*	Kamiti river virus	SR-75, Kenya	<i>A. macintoshi</i>	EU074051	Moureau <i>et al.</i> , 2007
NAKV	Nakiwogo virus	Uganda08, Uganda	<i>Mansonia africana nigerrima</i>	GQ165809	Cook <i>et al.</i> , 2009
OcFV	Mosquito flavivirus	OccaFV1, Italy	<i>Oc. caspius</i>	GQ476994	Calzolari <i>et al.</i> , 2010
OcFV	Mosquito flavivirus	OccaFV2, Italy	<i>Oc. caspius</i>	GQ476993	Calzolari <i>et al.</i> , 2010
OcFV	Mosquito flavivirus	OccaFV3, Italy	<i>Oc. caspius</i>	GQ476995	Calzolari <i>et al.</i> , 2010
OcFV	Mosquito flavivirus	OccaFV4, Italy	<i>Oc. caspius</i>	GQ476991	Calzolari <i>et al.</i> , 2010
OcFV	Mosquito flavivirus	OccaFV5, Italy	<i>Oc. caspius</i>	GQ476992	Calzolari <i>et al.</i> , 2010
QBV	Quang Binh virus	VN180, Vietnam	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	FJ644291	Crabtree <i>et al.</i> , 2009
WangThong	Wang Thong virus	Tailandia	<i>Cx. fuscocephala</i>	AY457040	Não publicado
YFV	Yellow fever virus	17D vaccinal	?	EU074025	Moureau <i>et al.</i> , 2007

* Espécie ainda não reconhecida pelo ICTV

?-Não referido

VI- Identificação de vírus em flebótomos

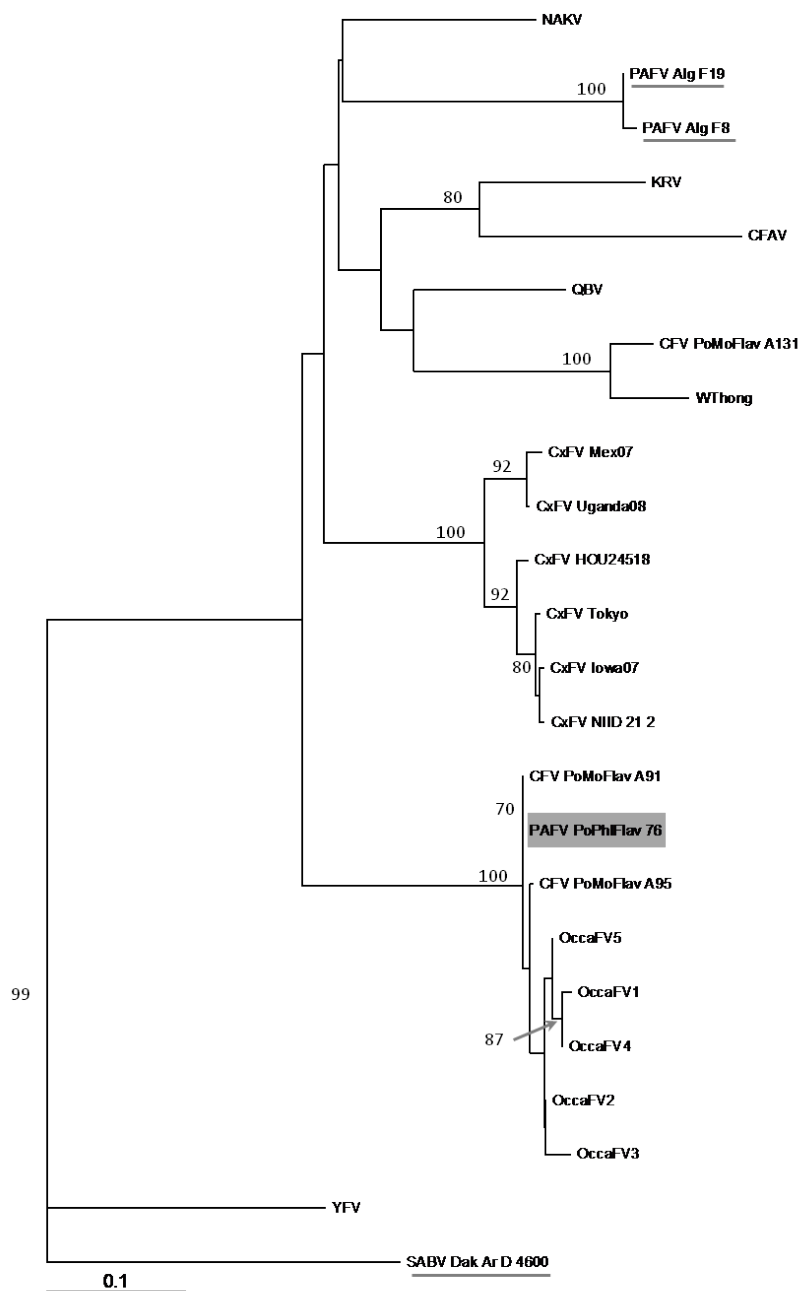


Figura 32 - Árvore filogenética neighbor-joining inferida a partir de seqüências parciais do gene NS5 de 24 flebovírus. As matrizes de distância foram calculadas usando o modelo Kimura 2 parâmetros para a correção de substituições múltiplas. Os valores de *bootstrap* foram obtidos de 1000 réplicas e surgem indicados nos nós (valores >70%). As seqüências do vírus da febre amarela e Saboya foram utilizados como *outgroup*. A seqüência detectada no presente trabalho surge destacada a cinzento e as restantes seqüências de flavivírus obtidas em flebótomos aparecem sublinhadas a cinzento.

A análise da árvore filogenética obtida permite confirmar que a sequência determinada no presente trabalho aparece estreitamente relacionada com os flavivírus anteriormente detectados, em mosquitos do género *Culex* no nosso país, e em mosquitos do género *Ochlerotatus* em Itália. No entanto, esta sequência encontra-se afastada filogeneticamente das sequências obtidas em flebótomos na Argélia. Por outro lado, as sequências de flavivírus derivadas de mosquitos *Culex*, exceptuando aquelas encontradas em mosquitos portugueses, ficaram todas agrupadas. Os CFAV e KRV estão próximos um do outro e numa linhagem distinta.

6.4. Conclusões e discussão

Neste trabalho foi detectada, pela primeira vez em Portugal, a presença de ARN de flavivírus em flebótomos.

Os flavivírus são, na sua maioria, arbovírus que circulam entre hospedeiros vertebrados e mosquitos ou carraças. O vírus *cell fusing agent* (CFAV), isolado inicialmente numa linha de células de *A. aegypti* mantida em laboratório, foi o primeiro flavivírus a ser descrito como infectando apenas insectos (Cammisa-Parks *et al.*, 1992). Mais tarde, em 2003, Sang e colaboradores detectaram, pela primeira vez em mosquitos do género *Aedes* encontrados na natureza, no Quénia, um vírus semelhante ao CFV que foi designado por vírus Kamiti River (KRV).

Em 2003, Cook e colaboradores encontraram pela primeira vez uma estirpe do CFAV na natureza, em Porto Rico, também em mosquitos do género *Aedes*. Mais tarde, no Japão, um vírus semelhante foi descrito pela primeira vez em mosquitos do género *Culex*, tendo sido designado como *Culex flavivirus* (CxFV) (Hoshino *et al.*, 2007). Desde essa altura, têm vindo a ser continuamente descritos novos vírus semelhantes aos CFAV, KRV e CxFV detectados em vários países, entre os quais Espanha (Aranda *et al.*, 2009), México (Farfan-Ale *et al.*, 2009), EUA, Trinidad (Kim *et al.*, 2009), Itália (Roiz *et al.*, 2009), Japão (Hoshino *et al.*, 2009) e Uganda (Cook *et al.*, 2009).

A sequência de flavivírus detectada em flebótomos neste trabalho apresenta 100% de identidade com as sequências detectadas em mosquitos dos géneros *Culex* e *Ochlerotatus*, encontradas no âmbito da vigilância do vírus *West Nile* no nosso país (Zé-Zé *et al.*, em preparação). Podemos admitir assim que existe uma estirpe de flavivírus em circulação em Portugal, que infecta culicídeos e flebotomídeos. Como supracitado, esta estirpe está muito próxima da detectada em mosquitos em Itália, e distante das estirpes detectadas em flebótomos na Argélia.

O vírus Saboya, até há bem pouco tempo o único flavivírus reportado em flebótomos, está bastante afastado filogeneticamente tanto dos flavivírus detectados em Portugal como dos detectados na Argélia nos mesmos vectores. Ao que parece o vírus Saboya circula entre estes artrópodes e vários grupos de vertebrados e deve ter divergido evolutivamente dos vírus *insect only* de maneira a poder alternar o seu ciclo entre vectores e reservatórios. Por outro lado, o facto de a sequência detectada no nosso país pertencer a um vírus que, aparentemente, circula em duas famílias de dípteros não deixa de ser curioso em termos evolutivos uma vez que, geralmente, os arbovírus encontram-se associados a vectores de uma determinada espécie ou de um determinado género.

O *pool* onde se detectou a sequência nucleotídica de flavivírus era constituído por espécimes da espécie *P. perniciosus*. Os flavivírus detectados na Argélia também foram detectados nesta espécie. Aparentemente, como se tem vindo a descrever ao longo do presente trabalho, *P. perniciosus* é uma espécie que permite o desenvolvimento de vários agentes etiológicos e merece particular atenção no que diz respeito ao estudo da capacidade vectorial para novos arbovírus.

VII- Considerações finais e perspectivas futuras



Os flebovírus são mundialmente reconhecidos como importantes agentes etiológicos de doenças infecciosas. Actualmente o vírus Toscana é considerado um vírus emergente na bacia do Mediterrâneo, com grande destaque em termos de Saúde Pública e em relação a outros flebovírus em circulação, uma vez que apresenta grande neurotropismo. Portugal foi o segundo país a ser considerado endémico para o vírus Toscana.

Durante a realização do presente estudo, e seguindo os objectivos propostos, foi padronizada uma técnica de IFI *in house* altamente sensível e específica e implementada uma técnica de ELISA como confirmatória. Actualmente, com a globalização e as alterações climáticas que estão em curso, torna-se de extrema importância a disponibilização de técnicas de diagnóstico laboratorial eficazes que permitam dar respostas rápidas em caso de possíveis epidemias ou surtos de doenças.

Neste trabalho foram realizados inquéritos seroepidemiológicos abrangentes na população portuguesa com o objectivo de detectar anticorpos anti-flebovírus.

Verificou-se que existe circulação de flebovírus em Portugal, nomeadamente de vírus Toscana, de uma estirpe semelhante à italiana (ISS.Ph1.3). Podem existir ainda outros genótipos de flebovírus, do serogrupo da febre por flebótomos, uma vez que testes específicos para determinação do serótipo apenas confirmaram cinco em 29 amostras positivas.

A presença de anticorpos IgG nos vários grupos de indivíduos saudáveis sem que tenha havido história de doença neurológica mostra que o vírus Toscana no nosso país pode ser responsável por infecções assintomáticas, ou pelo menos de baixa gravidade. No entanto, à semelhança do que ocorre nos outros países endémicos, o vírus Toscana é também responsável por casos de infecções sintomáticas que, no presente estudo, se apresentaram sob a forma de meningites, meningoencefalites e exantema. Actualmente estão a surgir relatos de vários tipos de novas manifestações clínicas, mais ou menos graves, que poderão traduzir alterações genéticas no vírus em questão. O facto de os flebovírus serem vírus cujo material genético é constituído por ARN, aumenta o seu

potencial mutagénico e não é de excluir a hipótese de estes se tornarem mais virulentos ao longo do tempo.

O genótipo original do vírus Nápoles foi isolado pela última vez, a partir de um ser humano, em 1985, no Egipto tendo sido o vírus Toscana o único a ser isolado em casos humanos nas últimas duas décadas (Charrel *et al.*, 2005). No entanto, o isolamento do vírus Massilia no sul de França e a sua detecção em Espanha, o isolamento do vírus Punique na Tunísia e a detecção molecular de várias novas linhagens de flebovírus na Argélia, em flebótomos, só nos últimos três anos, aumentaram o número de flebovírus conhecidos e de potenciais agentes patogénicos para o Homem. Este facto realça a necessidade de prosseguir com novas investigações sobre os flebovírus a circular na Bacia Mediterrânica, incluindo Portugal.

A detecção de anticorpos IgG anti-Toscana num lobo e numa raposa vem reacender a questão da existência possível de reservatórios vertebrados que contribuam para a manutenção dos flebovírus na natureza.

No presente trabalho *P. perniciosus*, vector de vírus Toscana, foi a espécie mais capturada durante os anos de estudo e teve uma actividade que se estendeu de Maio a Outubro. Outras três espécies foram capturadas, sendo que as do género *Phlebotomus*, por se alimentarem em animais endotérmicos e, oportunamente, em seres humanos, têm um maior interesse em termos médicos, podendo transmitir vários agentes patogénicos.

Verificou-se que, em comparação com trabalhos anteriores, provavelmente a composição da fauna flebotomínica está a mudar, pelo menos nas áreas estudadas, o que está de acordo com vários autores que afirmam que a distribuição dos flebótomos está a evoluir com as alterações climáticas. Se por um lado a espécie *P. sergenti* está a tornar-se mais abundante na Arrábida, por outro constatou-se que *S. minuta* também está a ocorrer em locais diferentes no Algarve.

Actualmente o local mais a Norte da Europa onde se verifica a existência de flebótomos é a Alemanha (50°19'41.2"N, 07°15'36.9" E) (Naucke *et al.*, 2008). Até ao

presente, não foram encontrados flebovírus na Europa Central, no entanto, no decurso do aquecimento global é possível que venha a acontecer o estabelecimento de ciclos biológicos depois da introdução dos agentes patogénicos uma vez que os arbovírus, de um modo geral, acompanham a distribuição dos respectivos vectores.

Recentemente foram encontrados flebótomos na Suíça e surgiu um caso de leishmaniose autóctone em Surrey, Inglaterra (Aspöck *et al.*, 2008), prova inequívoca que a distribuição das doenças infecciosas e dos artrópodes vectores está a expandir-se devido às alterações climáticas.

Neste trabalho foi detectada, pela primeira vez em Portugal, uma sequência genómica de um flavivírus semelhante a flavivírus *insect-only*. Apesar de actualmente se saber que estes vírus não se replicam em linhas celulares animais, a importância destes novos agentes em termos de Saúde Pública permanece por esclarecer.

Um dos exemplos de vírus detectados em artrópodes cuja importância médica só veio a ser comprovada cerca de 12 anos mais tarde é o flebovírus Toscana, que foi isolado em flebótomos em 1971 e apenas foi isolado num indivíduo doente em 1983 (Leoncini *et al.*, 1999). Esta ocorrência ilustra bem a importância da vigilância contínua de artrópodes vectores e a necessidade de se clarificar o verdadeiro significado da descoberta de novos vírus.

É importante que todos os que se encontram envolvidos em todos os aspectos da vigilância da Saúde Pública estejam atentos à distribuição dos vectores e à epidemiologia das doenças com arbovírus como agentes etiológicos e sejam capazes de preparar a prevenção e o seu controlo caso seja necessário.

Para completar a investigação de flebótomos e vírus transmitidos em Portugal seria importante no futuro:

- Realizar estudos epidemiológicos em populações humanas de outras áreas de Portugal, não abrangidas neste trabalho;

- Determinar os períodos de virémia nos prováveis reservatórios em colaboração com os Serviços de Saúde Veterinários;
- Estudar flebótomos em mais regiões de modo a identificar os flebovírus em circulação;
- Estabelecer colónias de *P. perniciosus* e esclarecer o papel do flavivírus detectado no âmbito deste trabalho nessas colónia
- Divulgar, sistematicamente, os resultados da investigação nesta área de modo a que os flebótomos e os vírus transmitidos, nomeadamente o vírus Toscana, sejam reconhecidos em termos de Saúde Pública em Portugal.

VIII- Referências Bibliográficas

Fernando de Ory Machado

28. De Ory F, Echevarría JM, Pachón I, Ramirez R. Seroprevalencia frente al virus herpes simple tipo 2 en población adulta de la Comunidad de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000; 18: 420-421.
29. García Corbeira P, Högrefé W, Aguilu I, García-de Loma J, Gil A, Bayarri JM, et al. Whole cell lysate enzyme immunoassays vs. Recombinant glycoprotein G2-based immunoassays for HSV-2 seroprevalence Studies. *J Med Virol*. 1999; 59: 502-506.
30. Pataik P, Herrero R, Morrow A, Muñoz N, Bosch FX, Bayarri S et al. Type-specific seroprevalence of herpes simplex virus type 2 and associated risk factors in middle-aged women from 6 countries: the IARC multicentric study. *Sex Transm Dis*. 2007; 34: 1019-1024.
31. Pebody RG, Andrews N, Brown D, Gopal R, de Melker H, François G, et al. The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sex Transm Infect*. 2004; 80: 185-191.
32. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahata AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006; 296: 964-973.
33. Vardi JA, García Corbeira P, Aguilu I, Baccata R, Ballesteros J, Aguilu I. Herpes simplex virus type 2 seroprevalence in Spain. *Sex Transm Dis*. 2001; 28: 47-50.
34. Laumann EO, Gagnon JH, Michael RT, Michaels S. The social organization of sexuality: sexual practices in the United States. Chicago: University Chicago Press; 1994.
35. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos, 3ª ed. Madrid: SETS; 2006.
36. Delgado-Iribarren García-Campero A, Echevarría Mayo JM, León Rega P. Serología de las hepatitis víricas. En: Cacerendo E y Cantón R editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2004.
37. Muñoz Almagro C, Juncosa T, Fortuny C, Guillén JJ, González-Cuevas A, Latorre C. Prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C en mujeres embarazadas y transmisión vertical de este virus. *Med Clin (Barc)*. 2002; 118: 452-454.
38. Domínguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salteras L. Community based seroepidemiological Survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol*. 2001; 65: 688-693.
39. Chineso MM, Chocarro A, Brizmes P, Ochoa C, Pérez J. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en población general. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20: 64-67.
40. Castilla J, Pachou I, González MP, Amela C, Muñoz L, Tello O, et al. Seroprevalence of HIV and HTLV in a representative sample of the Spanish population. *Epidemiol Infect*. 2000; 125: 159-162.
41. Seivedos T, Díez M, Díez A, Muñoz L, García A, Grupo de Trabajo del Estudio de Recién Nacidos. Evolución de la seroprevalencia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en madres de recién nacidos vivos en 8 comunidades autónomas. *Med Clin (Barc)*. 2008; 131: 250-252.
42. del Romero J, Rodríguez C, García S, Ballesteros J, Clavo P, Peña MA. Prevalencia del virus de la inmunodeficiencia humana en varones homosexuales y bisexuales, 1992-2000. *Med Clin (Barc)*. 2002; 119: 413-415.
43. The Primary Care STI Study Group. Seroprevalence of HIV among sexually transmitted infections clinic attendees voluntarily tested for HIV in Barcelona, 1998-2001. *Sex Transm Dis*. 2003; 876-879.
44. Grupo para el Estudio Anónimo no Relacionado de Seroprevalencia de virus de la inmunodeficiencia humana en Consultas de ETS. Seroprevalencia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes de consultas de enfermedades de transmisión sexual, 1998-2000. *Med Clin (Barc)*. 2002; 119: 249-251.
45. Castro E. Chagas disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med*. 2009; 19: 16-23.
46. Pirov M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Meyers RM, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma cruzi* infection in at risk blood donors in Catalonia, Spain. *Transfus*. 2008; 48: 1862-1868.
47. Aguirre AA, Tabor GM. Global factors driving emerging infectious diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1149: 1-3.
48. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 171-181.
49. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 147-156.
50. Petersen LR, Hayes EB. West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am*. 2008; 92: 1307-1322.

1. Abbasi I, Cunio R, Warburg A. Identification of blood meals imbibed by Phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9 (1): 79-86.
2. Abdoli H, Hejazi SH, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Jalai-Zand AR, Arandian MH, Piazak N, Jafari R, Alizadeh M. Some ecological aspects of phlebotomine sand flies in Iran. *Irania J Arthropod-Borne Dis* 2007; 1 (2): 34-39.
3. Accardi L, Grò MC, Di Bonito P, Giorgi C. Toscana virus genomic L segment: molecular cloning, coding strategy and amino acid sequence in comparison with other negative strand RNA viruses. *Virus Res* 1993; 27(2): 119-131.
4. Afonso MO, Campino L, Cortes S, Alves-Pires C. The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII-- Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite*. 2005; 12 (1): 69-72
5. Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Medic Vet Entom* 2003; 17: 1-18.
6. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997, 25; 3389-3402.
7. Aranda C, Sánchez-Seco MP, Cáceres F, Escosa R, Gálvez JC, Masià M, Marqués E, Ruíz S, Alba A, Busquets N, Vázquez A, Castellà J, Tenorio A. Detection and monitoring of mosquito flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9 (2): 171-178.
8. (AFPMB) Armed Forces Pest Management Board. Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center; 2001: 231pp. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=Hpr10wAwoEOC&printsec=frontcover&dq=reginal+disease+vector+ecology+profile+Central+Europe&ei=VOyOSa3UG4iUzATy_PysB
9. (AFPMB) Armed Forces Pest Management Board. Technical guide no 43. Guide to pest surveillance during contingency operations. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center 2002:145 pp. Disponível em: <http://www.afpmb.org/pubs/tims/tg43/tg43.pdf>
10. Ashford RW. Phlebotomus fevers. *In* M.W. Service (Ed). *The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections*. Wallingford: CABI Publishing; 2001: 397-401.
11. Aspöck H, Gerersdorfer T, Formayer H, Walochnik. Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wlen Klin Wochenschr* 2008; 120 (4): 24-29.
12. Aubguenen P, Pichard E. Arboviroses: notions générales et particularités des principales infections. *Rev Fr Lab* 2000: 321: 31-35
13. Ba Y, Trouillet J, Thonnon J, Fontenille D. Phlebotomus of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus. *Bull Soc Pathol Exot* 1999; 92 (2): 131-135.
14. Baldelli F, Ciufolini MG, Francisci D, Marchi A, Venturi G, Fiorentini C, Luchetta ML, Bruto L, Pauluzzi S. Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clin Infect Dis* 2004; 38 (4): 515-520.

15. Bahri O, Fazaa O, Ben Alaya-Bouafif N, Bouloy M, Triki H, Bouattour A. Role of Toscana virus in meningo-encephalitis in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* 2010. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 20378279.
16. Bartelloni PJ, Tesh RB. Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25 (3): 456-462.
17. Bathieta A, Saliba EK, Graham R, Mohareb E, Hijazi Y, Wijeyaratne P. Seroprevalence of West Nile, Rift Valley, and Sandfly arboviruses in Hashimiah, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2000; 6 (4): 358-362.
18. Beersma MF, Grimbergen YA, Kroon FP, Veldkamp PJ. Meningitis caused by Toscana virus during a summer stay in Italy. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148 (6): 286-288.
19. Bettini S, Pozio E, Gradoni L. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) II. *Leishmania* from wild rodentia and carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74: 77-83.
20. Blirt C. Phlebotomus fever in Malta and Crete. *J R Army Med Corps* 1910; 14: 236-258.
21. Blitvich BJ, Lin M, Dorman KS, Soto V, Hovav E, Tucker BJ, Staley M, Platt KB, Bartholomay LC. Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex flavivirus*, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (*Diptera: Culicidae*) in Iowa. *J Med Entomol.* 2009;46 (4): 934-941.
22. Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sandflies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop* 2003; 88: 109-116.
23. Borčić B, Punda V. Sandfly fever epidemiology in Croatia. *Acta Med Jugosl* 1987; 41 (2): 89-97.
24. Bryan JP, Iqbal M, Ksiazek TG, Ahmed A, Duncan JF, Awan B, Krieg RE, Riaz M, Leduc JW, Nabi S, Qureshi MS, Malik IA, Legters LJ. Prevalence of sand fly fever, West Nile, Crimean-Congo hemorrhagic fever, and leptospirosis antibodies in Pakistani military personnel. *Mil Med* 1996; 161 (3): 149-153.
25. Braitto A, Ciufolini MG, Pippi L, Corbisiero R, Fiorentini C, Gistri A, Toscano L. Phlebotomus-transmitted toscana virus infections of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany. *Scand J Infect Dis* 1998b; 30 (5): 505-508.
26. Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Fiorentini C, Ciufolini MG. Toscana virus infections of the central nervous system in children: a report of 14 cases. *J Pediatr* 1998a; 132 (1): 144-148.
27. Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Marchi B, Sancasciani N, Fiorentini C, Ciufolini MG. Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: a serological study. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13 (7): 761-764.
28. Briese T, Jia X-Y, Huang C, Grady LJ, Lipkin WI. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *The Lancet* 1999; 354: 1261-1262.
29. Briese T, Rambaut A, Pathmajeyan M, Bishara J, Weinberger M, Pitlik S, Lipkin WI. Phylogenetic Analysis of a Human Isolate from the 2000 Israel West Nile virus Epidemic. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 528-531.
30. Butenko AM. Arbovirus circulation in the Republic of Guinea. *Med Parazitol (Mosk).* 1996; 2: 40-45.

31. Calisher CH, McLean RG, Smith GC, Szmyd DM, Muth DJ, Lazuick JS. Rio Grande-a new phlebotomus fever group virus from south Texas. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26 (5 Pt 1): 997-1002.
32. Calisher C, Weinberg AN, Muth DJ, Lazuick JS. Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. *The Lancet* 1987: 165.
33. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Caimi M, Defilippo F, Maioli G, Albieri A, Medici A, VEROnesi R, Pilani R, Gelati A, Angelini P, Parco V, Fabbi M, Barbieri I, Lelli D, Lavazza A, Cordioli P, Dottori M. Arboviral Survey of Mosquitoes in Two Northern Italian Regions in 2007 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010 Apr 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20370434.
34. Cammisa-Parks H, Cisar LA, Kane A, Stollar V. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology* 1992; 189 (2): 511-524.
35. CDC. Questions and answers about Japanese Encephalitis. 2001. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/jencephalitis/qa.htm>
36. CDC. Dengue topics. 2009c. Disponível em: <http://www.cdc.gov/Dengue/>
37. CDC. Chikungunya Factsheet 2008. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Chikungunya/CH_FactSheet.html
38. CDC. List of preventable vaccines. 2009a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/vpd-list.htm>
39. CDC. Travellers' Health Yellow Book. Chapter 2: the pre-travel consultation, travel-related vaccine-preventable disease: Yellow fever. 2009b. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.aspx>
40. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (11): 1657-1663. Review.
41. Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, Marty P, de Lamballerie X, Parola P. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (3): 465-468.
42. Charrel RN, Izri A, Temmam S, de Lamballerie X, Parola P. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* files. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 (8): 1299-1300.
43. Charrel RN, Moureau G, Temmam S, Izri A, Marty P, Parola P, et al. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009; 9 (5): 519-530
44. Chastel C, Bach-Hamba D, Launay H, Le Lay G, Hellal H, Beaucournu JC. Arbovirus infections in Tunisia: new serological survey of small wild mammals. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1983; 76 (1): 21-33.
45. Chastel C, Launay H, Bailly-Choumara H, Le Lay G, Beaucournu JC. Arbovirus infections in Morocco: serosurvey in small wild mammals in the northern part of the country. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1982; 75 (5): 466-475.

46. Chastel C, Launay H, Lay G, Valle M, Bach-Hamba D& Beaucournu JC. Petits mammifères sauvages et arbovirus dans la region du basin méditerranéen occidental. Ent méd et Parasitol 1986. 24 (1); 69-76.
47. Chastel C, Launay H, Rogues G, Beaucournu JC. Arbovirus infections in Spain: serological survey on small mammals. Bull Soc Path Exot Filiales 1980; 73 (4): 384-390.
48. Chaudier B, Durand JP, Kraemer, Hovette P. Un cas de meningite à virus Toscana du FYROM (former Yugoslav Republic if Macedonia). Rev Méd Interne 2003; 24: 92-93.
49. Chelbi I, Zhioua E. Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. Proceedings of the Fifth International Symposium on phlebotomine sandflies. Arch Inst Pasteur Tunis 2005; 82 (I) ISOPS V: 33.
50. Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R. Rift Valley fever - a threat for Europe?. Euro Surveill 2010; 15 (10):pii=19506. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19506>
51. Ciufolini MG, Fiorentini C, Di Bonito P, Mochi S, Giorgi C. Detection of Toscana virus-specific immunoglobulins G and M by an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant viral nucleoprotein. J Clin Microbiol 1999; 37 (6): 2010-2012.
52. Ciufolini MG, Maroli M, Guandalini E, Marchi A, Verani P. Experimental studies on the maintenance of Toscana and Arbia viruses (*Bunyaviridae: Phlebovirus*). Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 669-675.
53. Ciufolini MG, Maroli M, Verani P. Growth of two Phleboviruses after experimental infection of their suspected sandfly vector, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg 1985; 34: 174-179.
54. Cohen D, Zaide Y, Karasenty E, Schwarz M, LeDuc JW, Slepon R, Ksiazek TG, Shemer J, Green MS. Prevalence of antibodies to West Nile fever, sandfly fever Sicilian, and sandfly fever Naples viruses in healthy adults in Israel. Public Health Rev 1999; 27 (1-3): 217-230.
55. Collao X, Palacios G, Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Negredo AI, Navarro-Marí JM, Grandadam M, Aransay AM, Lipkin WI, Tenorio A, Sánchez-Seco MP. Genetic diversity of Toscana virus. Emerg Infect Dis. 2009; 15 (4): 574-577.
56. Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. J Gen Virol 2006; 87 (Pt 4): 735-7448.
57. Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, Gould E, Holmes EC, de Lamballerie X. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) from a natural mosquito population in Uganda. J Gen Virol 2009; 90 (Pt 11): 2669-2678.
58. Corwin A, Habib M, Olson J, Scott D, Ksiazek T, Watts DM. The prevalence of arboviral, rickettsial, and Hantaan-like viral antibody among schoolchildren in the Nile river delta of Egypt. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86 (6): 677-679.
59. Corwin A, Habib M, Watts D, Darwish M, Olson J, Botros B, Hibbs R, Kleinosky M, Lee HW, Shope R, et al. Community-based prevalence profile of arboviral, rickettsial, and Hantaan-like viral antibody in the Nile River Delta of Egypt. Am J Trop Med Hyg 1993; 48 (6): 776-783.

60. Crabtree MB, Nga PT & Miller BR Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. Arch Virol 2009; 154: 857-860.
61. Cusi MG, Valensin PE, Donati M, Valassina M. Neutralization of Toscana virus is partially mediated by antibodies to the nucleocapsid protein. J Med Virol 2001; 63 (1): 72-75.
62. Darwish MA, Hoogstraal H, Roberts TJ, Ghazi R, Amer T. A sero-epidemiological survey for Bunyaviridae and certain other arboviruses in Pakistan. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77 (4): 446-450.
63. De Barjac H, Larget I, Killick-Kendrick R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotype H14, to the larvae of phlebotomine flies. Bull Soc Pathol 1981; 74: 485-489.
64. Defuentes G, Rapp C, Imbert P, Durand JP, Debord T. Acute meningitis owing to phlebotomus fever Toscana virus imported to France. J Travel Med 2005; 12 (5): 295-296.
65. De Lamballerie X, Tolou H, Durand JP, Charrel RN. Prevalence of Toscana virus antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. Vector Borne Zoonotic Dis 2007; 7 (2): 275-277.
66. De Ory-Manchón F, Sanz-Moreno JC, Aranguéz-Ruiz E, Ramírez-Fernández R. Age-dependent seroprevalence of Toscana virus in the Community of Madrid: 1993-1994 and 1999-2000. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007 Mar; 25 (3): 187-189.
67. De Ory Manchón F. Seroepidemiological surveys of non vaccine-preventable diseases and their interest in public health. Rev Esp Salud Publica 2009; 83 (5): 645-657.
68. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill. 2010; 15 (10): pii=19507. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>
69. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; 14 (5): 417-423. Review.
70. Deubel V, Georges-Courbot M-C. Les arbovirus et les virus épizootiques. C R Biol 2002; 325: 855-861.
71. Di Bonito P, Mochi S, Grò MC, Fortini D, Giorgi C. Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. J Gen Virol 1997; 78: 77-81.
72. Di Bonito P, Nicoletti L, Mochi S, Accardi L, Marchi A, Giorgi C. Immunological characterization of Toscana virus proteins. Arch Virol 1999; 144 (10): 1947-1960.
73. Dinesh DS, DAS P, Picado A, Davies C, Speybroeck N, Boelaert M, Coosemans M. The efficacy of indoor CDC light traps for collecting the sandfly *Phlebotomus argentipes*, vector of *Leishmania donovani*. Med Vet Entomol 2008; 22 (2): 120-123.
74. Di Nicuolo G, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, Faella FS. Toscana virus central nervous system infections in southern Italy. J Clin Microbiol 2005; 43 (12): 6186-6188.
75. Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, Valassina M. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(5): 383-388. Review

76. Dionisio D, Valassina M, Ciufolini MG, Vivarelli A, Esperti F, Cusi MG, Marchi A, Mazzoli F, Lupi C. Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype toscana. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (8): 1241-1243.
77. Dobler G, Treib J, Haass A, Frösner G, Woesner K, Schimrigk. Toscana virus infection in german travelers returning from the Mediterranean. *Infection* 1997; 25 (5): 325.
78. Doerr R, Franz K, Taussig S. *Das Pappataciefieber*, Deuticke, Leipzig. 1909.
79. D'Ovidio MC, Venturi G, Fiorentini C, Barbati G, Di Renzi S, Vonesch N, Ciufolini MG, Tomao P. Occupational risk associated with Toscana virus infection in Tuscany, Italy. *Occup Med* 2008; 58(8): 540-544.
80. Echevarría JM, de Ory F, Guisasola ME, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Lozano A, Córdoba J, Gobernado M. Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 2003; 26 (1): 79-84.
81. Ehrnst A, Peters CJ, Niklasson B, Svedmir A, Holmgren B. Neurovirulent Toscana virus (a sand fly fever virus) in swedish man after visit to Portugal. *Lancet* 1985; 1212-1213.
82. Eitrem R, Niklasson B, Weiland O. Sandfly fever among Swedish tourists. *Scand J Infect Dis* 1991; 23 (4): 451-457.
83. Eitrem R, Sirkka V, Niklasson B. Incidence of sandfly fever among Swedish United Nations soldiers on Cyprus during 1985. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43 (2): 207-211.
84. Ellis SB, Appenzeller G, Lee H, Mullen K, Swenness R, Pimentel G, Mohareb E, Warner C. Outbreak of sandfly fever in central Iraq, September 2007. *Mil Med* 2008 Oct; 173 (10): 949-953.
85. European Network for Diagnostics of Imported Diseases (ENIVD): Disponível em: <http://www.enivd.de/index.htm>
86. Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, Dorman KS, Platt KB, Bartholomay LC, Soto V, Beaty BJ, Lanciotti RS, Blitvich BJ. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80 (1): 85-95.
87. Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 71-80.
88. Figueiredo LT. Vacinas contra o dengue. *Medicina Ribeirão Preto* 1999; 32: 21-25.
89. Filipe A. Arboviruses in Portugal. *In: Arboviruses in the Mediterranean countries*, Zlb. Bakt. Suppl.9, Stuttgart-New York: Gustav Fisher Verlag.; 1980: 137-141.
90. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. *In The measurement of interrater agreement*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1981. pp. 212-35.
91. Flick K, Katz A, Overby A, Feldman H, Pettersson RF, Flick R. Functional analysis of the noncoding regions of the Uukuniemi virus (*Bunyaviridae*) RNA segments. *J Virol* 2004; 78 (21): 11726-11738.
92. Flick R, Elgh F, Pettersson RF. Mutational analysis of the Uukuniemi virus (*Bunyaviridae* family) promoter reveals two elements of functional importance. *J Virol*. 2002; 76 (21): 10849-10860.

93. Fontenille D, Traore-Lamizana M, Trouillet J, Leclerc A, Mondo M, Ba Y, Digoutte JP, Zeller HG. First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50 (5): 570-574.
94. França C. Notes sur les espèces portugaises du genre *Phlebotomus*. *Bulletin de la Societé Pathologie Exotique* 1918; 11: 730-733.
95. França C. *Phlebotomu papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bulletin de la Societé Pathologie Exotique* 1913; 6: 123-124, 1913.
96. Francisci D, Papili R, Camanni G, Morosi S, Ferracchiato N, Valente M, Ciufolini MG, Baldelli F. Evidence of Toscana virus circulation in Umbria: first report. *Eur J Epidemiol* 2003; 18 (5):457-459.
97. Gabriel M, Resch C, Gunther S, Schmidt-Chanasit J. Toscana virus infection imported from Elba into Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2010 Jun;16 (6): 1034-1036.
98. Gaidamovich SY, Baten MA, Klisenko GA, Melnikova YE. Serological studies on sandfly fevers in the Republic of Bangladesh. *Acta Virol* 1984; 28 (4): 325-328.
99. Gaidamovich SY, Khutoretskaia NV, Aziamov IuV, Tsiupa VI, Mel'nikova EE. Virological study of cases of sandfly fever in Afghanistan. *Vopr Virusol* 1990; 35 (1): 45-47.
100. Gaidamovich SY, Nikiforov LP, Gromashevsky VL, Obukhova VR, Klisenko GA, Chervonsky VI, Mel'nikova EE. Isolation and study of Sumakh virus, a member of the Uukuniemi group, in the U.S.S.R.. *Acta Virol* 1971; 15 (2): 155-160.
101. Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gró MC, Takehara K, Hilditch C, Morikawa S, Bishop DH. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virol* 1991; 180 (2): 738-753.
102. Gligic A, Miscevic Z, Tesh RB, Travassos da Rosa A, Zivkovic V. First isolation of Naples sandfly virus in Yugoslavia. *Acta Biol Jug Mikrobiol* 1982; 19: 167-175.
103. Goddard, J. *Physician's guide to arthropods of medical importance* (4th edn). Boca Raton London New York Washington D.C: CRC Press; 2003: 444 pp.
104. Gori Savellini G, Di Genova G, Terrosi C, Di Bonito P, Giorgi C, Valentini M, Docquier JD, Cusi MG. Immunization with Toscana virus N-Gc proteins protects mice against virus challenge. *Virology* 2008; 375 (2): 521-528.
105. Gradoni L, Pozio E, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74: 421-423.
106. Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S, Evans DA, Peters W, Bettini S, Gradoni L, Pozio E. Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolees, en Italie continentale, a partir de forms viscerales murines, canines et vulpines. *Ann Parasitol Hum Comp* 1982; 57: 527-531.
107. Goverdhan MK, Dhanda V, Modi GB, Bhatt PN, Bhagwat RB, Dandawate CN, Pavri KM. Isolation of phlebotomus (sandfly) fever virus from sandflies and humans during the same season in Aurangabad District, Maharashtra State, India. *Indian J Med Res* 1976; 64 (1): 57-63.

108. Gratz N. Emerging and resurgin vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 1999; 44:51-75.
109. Grassi B, Bhatthacharya A. Ricerche sui flebótomo. *Memorie della Società Italiana di Scienze Naturali* 1907; 4: 353-394.
110. Grò MC, Di Bonito P, Fortini D, Mochi S, Giorgi C. Completion of molecular characterization of Toscana phlebovirus genome: nucleotide sequence, coding strategy of M genomic segment and its amino acid sequence comparison to other phleboviruses. *Virus Res* 1997; 51 (1): 81-91.
111. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002; 33: 330-342.
112. Guernaoui S & Boumezzough A. Habitat preferences of *Phlebotomus* sandflies (*Diptera: Psychodidae*) in Southwestern Morocco. *J Med Entomol* 2009; 46 (5): 1187-1194.
113. Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A. Altitudinal structuring of sand flies (*Diptera: Psychodidae*) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Trop* 2006; 97: 346-351.
114. Hanson, WJ. The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (*Diptera: Psychodidae*). *Ann Entomol Soc Am* 1961; 54: 317-322.
115. Hardestam J, Simon M, Hedlund KO, Vaheri A, Klingström J, Lundkvist A. Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the *Bunyaviridae* family. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (8): 2547-2551.
116. Hemmersbach-Miller M, Parola P, Charrel RN, Durand JP and Brouqui, P: Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. *Eur J Int Med* 2004; 15: 316-317.
117. Hendrickx G, Lancelot R. A perspective on emerging mosquito and phlebotomine-borne diseases in Europe. *Euro Surveill*. 2010;15(10):pii=19503. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19503>
118. Higgs S, Beaty, BJ. Natural. Cycles of vector-borne pathogens. *In* *Biology of disease vectors* (2nd edn). Mrquardt WC (Ed). Elsevier Academic Press 2005: 167-185.
119. Hilborne LH, Golomb BA. Viral diseases. *In* *A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War Illnesses*. Santa Monica, Calif: Rand Corporation 2001. Disponível em: http://www.gulflink.osd.mil/library/randrep/infectious_paper/
120. Hodinka R. Serological tests in clinical virology. *In* *Laboratory diagnosis of viral infections* (3rd edition). Lennette EH, Smith TE (Ed) 1999: 195-211.
121. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007; 359 (2): 405-414.
122. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 2009; 391 (1): 119-129.
123. Hukić M, Salimović-Besić I. Sandfly - Pappataci fever in Bosnia and Herzegovina: the new-old disease. *Bosn J Basic Med Sci* 2009; 9 (1): 39-43.

124. Hyams KC, JRiddle J, Trump DH, and Graham JT. Endemic infectious diseases and biological warfare during the Gulf War: a decade of analysis and final concerns. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65 (5): 664-670.
125. Ibrahim AN, Sweet BH. Application of immunodiffusion methods for typing members of the *Phlebotomus* group of arboviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 135 (1): 23-29
126. Ilango K. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): II. Post copulatory histophysiological changes during gonotrophic cycle. *J Biosci* 2005; 30 (5): 733-747.
127. Imirzalioglu C, Schaller M, Bretzel RG. Sandfly fever Naples virus (serotype Toscana) infection with meningeal involvement after a vacation in Italy. *Med Wochenschr* 2006; 131 (50): 2838-2840.
128. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Family *Bunyaviridae*. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. MHV Van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle, RB Wickner (eds). San Diego: Academic Press; 2000: 599-621.
129. IPS. 2007. Disponível em: <http://www.ipsangue.org>
130. Izri A, Temmam S, Moureau G, Hamrioui B, Lamballerie X, Charrel RN. Sandfly fever Sicilian Virus, Algeria *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (5): 795-797.
131. Javadian E, Tesh R, Saidi S, Nadim A. Studies on the epidemiology of sandfly fever in disease. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26 (2): 294-298.
132. Jeffery K & Pillay D. Diagnostic approaches. In *Principles and practice of Clinical Virology* (5th edition). 2004: 1-21.
133. Karabatsos N (ed). International Catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates (3rd edn). San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985, 1147 pp.
134. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999b; 17: 279-289.
135. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In *Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain; 1999a*: 26-31.
136. Kim DY, Guzman H, Bueno R Jr, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CV, Popov VL, Weaver SC, Beasley DW, Tesh RB. Characterization of *Culex Flavivirus* (*Flaviviridae*) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology* 2009b; 386 (1): 154-159.
137. Kishore K, Kumar V, Kesari S, Bhattacharya SK, Das P. Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* against DDT in endemic Districts of North Bihar, India. *J Commun Dis* 2004;36(1):41-44.
138. Konstantinou GN, Papa A, Antoniadis A. Sandfly-fever outbreak in Cyprus: are phleboviruses still a problem? *Travel Med Infect Dis* 2007; 5: 239-242.
139. Konstantinov OK, Diallo SM, Inapogi AP, Ba A, Kamara SK. The mammals of Guinea as reservoirs and carriers of arboviruses. *Med Parazitol (Mosk)* 2006; 1: 34-9.

140. Kozuch O, Greíková M, Nosek. Poteplí - Uukuniemi virus isolated from *Ixodes ricinus* ticks in Slovakia. J Acta Virol 1968; 12 (5): 475.
141. Kuhn J, Bewermeyer H, Hartmann-Klosterkoetter U, Emmerich P, Schilling S, Valassina M. Toscana virus causing severe meningoencephalitis in an elderly traveller. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76 (11): 1605-1606.
142. Kuno G, Chang G-J J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms and unique traits as well as their evolutionary trends. Clinic Microbiol Rev 2005; 18 (4): 608-637.
143. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. J Virol 1998; 72 (1): 73-83.
144. Léger N, Depaquit J. Phlebotominae. In *Épidémiologie des maladies parasitaires. Arthropodes et affections qu'ils provoquent ou qu'ils transmettent. Tome 4. Ripert (C), coordonnateur. Editi Méd Internat* 2007: 159-175.
145. Léger N, Pesson B, Madulo- Leblond G, Abonnenc E. Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius* Nitzulescu, 1931 (*Diptera*-Phlebotominae) de la region méditerranéenne. Ann Parasitol Hum Comp 1983 ; 58 : 611-623.
146. Leland DS. Clinical Virology: concepts and perspectives. In *Laboratory Diagnosis of Viral Infections* (3rd edition). Lennette EH, Smith TE (Edt) 1999: 1-21.
147. Le Lay Roguès G, Valle M, Chastel C, Beaucournu JC. Small wild mammals and arboviruses in Italy. Bull Soc Path Exot Filiales 1983;76 (4): 333-345.
148. Le Mercier. *Bunyaviridae* 2007. Disponível em: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/82.html.
149. Leng YJ. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. Ann Trop Med Parasitol 1987; 81 (3): 311-317.
150. Leoncini F, Bartolozzi D, Banchi S. Il virus Toscana: un nuovo *Phlebovirus* causa di malattie infiammatorie acute del SNC nell'uomo. Giorn Mal Inf Parass 1986; 38: 649-652.
151. Lerner KL & Lerner BW (Eds). *World of Microbiology and Immunology*. USA: Thomson Gale; 2003: 699pp.
152. Lewis DJ. Phlebotomid sandflies. Bull Wild Hlth Org 1971; 44: 535-551.
153. Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae*). System Entomol 1977; 2 (4): 319-332.
154. Liu Dong-Ying, Tesh RB, Travassos da Rosa APA, Peters CJ, Yang Zahqiu, Guzman H, Xiao, Shu-Yuan: Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. J Gen Virol 2003; 84: 465-473.
155. Lozano R, Ortega M. Datos preliminares sobre el ciclo nictimeral de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus Sergenti* Parrot, 1917 (*Diptera, Psychodidae*). Anal de Biol 2001; 23: 9-18.

156. Lucientes J, Antonio J, Gracia MJ, Peribañez MA. Flebotomos, de la biología al control. Revista electrónica de veterinaria REDVET 2005. 6 (8). Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805/080502B.pdf>
157. McCarthy MC, Haberberger RL, Salib AW, Soliman BA, El-Tigani A, Khalid IO, Watts DM. Evaluation of arthropod-borne viruses and other infectious disease pathogens as the causes of febrile illnesses in the Khartoum Province of Sudan. J Med Virol 1996; 48 (2): 141-146.
158. Maguiña C, Garcia P, Gotuzzo E, Cordero L, Spach D. Bartonellosis (Carrion's disease in the modern era. Clin Infect Dis 2001; 33: 772-779.
159. Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis-new and old. Infect Dis Clin N Am 2000; 14: 1-22.
160. Magurano F, Nicoletti L. Humoral response in Toscana virus acute neurologic disease investigated by viral-protein-specific immunoassays. Clin Diagn Lab Immunol. 1999; 6 (1): 55-60.
161. Maroli M. Flebotomi. In Parassitologia urbana. Città, animali e salute pubblica. Puccini V, Tarsitano E. 2003. Il Sole 24 Ore Edagricole: 344 pp.
162. Maroli M. Use of insect repellents as preventative measures against the sandfly bites (*Diptera: Psychodidae*) Arch Inst Pasteur Tunis 2005; 82: 68 ISOPS.
163. Maroli M, Ciufolini MG, Verani P. Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. Med and Vet Entomol 1993; 7: 283-286.
164. Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (*Diptera: Psychodiade*). Organización Panamericana de la Salud 1997: 72 pp.
165. Martínez-García FA, Moreno-Docón A, Segovia-Hernández M, Fernández-Barreiro A. Deafness as a sequela of Toscana virus meningitis. Med Clin 2008; 130 (16): 639.
166. Mavale MS, Fulmali PV, Geevarghese G, Arankalle VA, Ghodke YS, Kanojia PC, et al. Venereal transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). Am J Trop Med Hyg 2006; 75 (6): 1151-1152.
167. Mavale MS, Fulmali PV, Ghodke YS, Mishra AC, Kanojia P, Geevarghese G. Experimental transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus argentipes* (*Diptera: Psychodidae*). Am J Trop Med Hyg. 2007; 76 (2): 307-309.
168. Mendoza-Montero J, Gámez-Rueda MI, Navarro-Marí JM, de la Rosa-Fraile M, Oyonarte-Gómez S. Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. Clin Infect Dis 1998; 27 (3): 434-436.
169. Meyer-König U, Schneider K, Özdemir S, Weidmann M, Dobler G, Hufert FT. First evidence for Toscana virus associated encephalitis emerging north of the Alps. Oral presentation. ENIVD Meeting May, 2010.
170. Moteiunas LI, Semenov BF, Vargin VV, Karaseva PS. Study of natural focal infections throughout the territory of the Lithuanian SSR. II. Immunologic structure of the population in mixed foci of tick-borne encephalitis and Uukuniemi viruses. Detection of antibodies to Tahyna virus. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1973; 50 (11): 130-133.

171. Moureau G, Bichaud L, Salez N, Ninove L, Hamrioui B, Belazzoug S, de Lamballerie X, Izri A, Charrel RN. Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from northern Algeria. *Open Virol J* 2010; 4: 15-21.
172. Moureau G, Ninove L, Izri A, Cook S, De Lamballerie X, Charrel RN. Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10 (2): 195-197.
173. Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the *Phlebotomidae*. In *Biology of disease vectors* (2nd edn). Mrquardt WC (Ed). Elsevier Academic Press; 2005: 141-151.
174. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Paras Res* 2008; 103: 1432-1955.
175. Navarro JM, Fernández-Roldán C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases *Med Clin* 2004; 122 (11): 420-422.
176. Nathanson N. Epidemiology. In *Virology* (4th Edition). Fields, B, Peter M, Howley MD , Diane E, Griffin Ph.D., Robert A; Lamb Ph.D, Malcolm A, Martin MD, Roizman B, Stephen E, Straus MD , David M, Knipe Ph.D. (Eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers 2001:371-392.
177. Nathanson N, Gonzalez-Scarano F. Bunyaviruses: general features. In *Encyclopedia of virology* R G Webster & A. Granoff eds. San Diego: Academic Press; 1994: 185-192.
178. Nichol ST. *Bunyaviruses*. In *Virology* (4th Edition). Fields, B, Peter M, Howley MD , Diane E, Griffin Ph.D., Robert A; Lamb Ph.D, Malcolm A, Martin MD, Roizman B, Stephen E, Straus MD , David M, Knipe Ph.D. (Eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers 2001: 1603-1633
179. Nicoletti L, Ciufolini MG, Verani P. Sandfly fever viruses in Italy. *Arch Virol* 1996; 11: 41-47.
180. Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D, Paci P, Leoncini F, Padovani P, Traini E, et al. Central nervous system involvement during infection by Phlebovirus toscana of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45 (4): 429-434.
181. Niklasson B, Eitrem R. Sandfy fever among Swedish UN troops im Cyprus. *The Lancet* 1985: 1212.
182. Oker-Blord N, Salminen A, Brummer-Korvekotio M, Kääriäinen L, Weckström P. Isolation of some viruses other than tick-borne encephalitis viruses from *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *Annales Medicinæ Experimentales Fenniae* 1964; 42: 109-112.
183. Overby AK, Pettersson RF, Neve EP. The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (*Bunyaviridae*) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging. *J Virol.* 2007; 81(7): 3198-205.
184. Ozbel Y, Ertabaklar H, Ciufolini MG, Marchi A, Fiorentino C, Erensoy S, Ozacar T, Rastgeldi S, Nicoletti L. A neglected vector-borne disease: papatasi fever and its vectors in Turkey. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005; 82: 55 ISOPS
185. Özer N. Emerging vector-borne diseases in a changing environment. *Turk J Biol* 2005; 29: 125-135.
186. Pakshin MF, Nikitin AM, Demina SN. Data on a study of a natural focus of sandfly fever in Sevastopol during 1945-1988. *Med Parazitol (Mosk)* 1990; (6): 38-40.

187. Pauli C, Schwarz TF, Meyer CG, Jäger G. Neurological symptoms after an infection by the sandfly fever virus. *Dtsch Med Wochenschr* 1995; 120 (43): 1468-1472.
188. Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol* 2007; 39(4): 276-281.
189. Petrishcheva PA, Izumskaya NG. On breeding places of *Phlebotomus* in Sabastopol. *Trudy Voenno-Meditsinskoi Akademii. S. Kirova* 1942; 25: 243-254. (Abstract (1946). *Rev Appl Entomol* (B); 74: 38).
190. Peyrefitte CN, Devetakov I, Pastorino B, Villeneuve L, Bessaud M, Stolidi P, Depaquit J, Segura L, Gravier P, Tock F, Durand F, Vagneur JP, Tolou HJ, Grandadam M. Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (5): 778-780.
191. Pires CA. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (*Diptera, Psychodidae*). *Bolm Soc Port Ciênc Nat* 1979; 19: 197-210.
192. Pires CA. Os flebótomos (*Diptera, Psychodidae*) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa 2000: 228 pp.
193. Polly R. Orbiviruses. *In: Fields Virology*, 5th Edn. 2007 (D.M. Knipe and P. Howley, eds), pp 1975-1997. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
194. Portolani M, Sabbatini AM, Beretti F, Gennari W, Tamassia MG, Pecorari M. Symptomatic infections by Toscana virus in the Modena province in the triennium 1999-2001. *New Microbiol.* 2002; 25(4): 485-488
195. Pugliese A, Beltramo T, Torre D. Emerging and re-emerging viral infections in Europe. *Cell Biochem Funct* 2007a; 25 (1): 1-13.
196. Pugliese A, Beltramo T, Torre Db. Seroprevalence study of Tick-borne encephalitis, *Borrelia burgdorferi*, Dengue and Toscana virus in Turin Province. *Cell Biochem Funct* 2007b; 25(2): 185-188.
197. Punda-Polić V, Calisher CH, Vesenjāk-Hirjan J. Neutralizing antibodies for sandfly fever Naples virus in human sera on the island of Mljet. *Acta Med Jugosl* 1990; 44 (1): 15-20.
198. Rashti MA, Panah HY, Mohamadi HS, Jedari M. Susceptibility of *Phlebotomus papatasi* (*Diptera: Psychodidae*) to DDT in some foci of cutaneous leishmaniasis in Iran. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992 Mar;8(1): 99-100.
199. Reza FM, Mansour N. Entomological studies of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (*Diptera: Psychodidae*) as vectors of cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 37 Suppl 3: 115-3117.
200. Rioux JA. Trente ans de coopération franco-marocaine sur les leishmanioses: dépistage et analyse des foyers. Facteurs de risque. Changements climatiques et dynamique noso-géographique . Association des Anciens Élèves de L'Institut Pasteur 2001 ; 168: 90-101.
201. Rioux JA, Akalay O, Périères J, Dereure J, Mahjour J, Le Houérou HN, Léger N, Desjeux P, Gallego M, Sadiki A, Barkia A, Nachi H. L'évaluation écoépidémiologique du risque "leishmanien" au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation "Phlébotomes-bioclimats". *Ecologia mediterranea* 1997; 23 : 73-92.

202. Ripert C, Pajot FX, Esquerdo Gómez F. Leishmanioses. *In*: Épidemiologie des maladies parasitaires. Tome 1 Protozooses. Éditions Médicales Internationales 1996: 303-354.
203. Robert LL, Perich MJ, Schlein Y, Jacobson RL, Wirtz RA, Lawyer PG, Githure JI. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide Bacillus sphaericus to the larval habitat. *J Am Mosq Control Assoc.* 1997; 13(2):140-4
204. Rodhain F, Madulo-Leblond G, Hannoun C, Tesh RB. Le virus Corfou. Un nouveau Phlebovirus virus isolé de Phlébotomes en Grèce. *Ann Inst Pasteur/Virol* 1985; 126: 161-166.
205. Roiz D, Vázquez A, Seco MP, Tenorio A, Rizzoli A. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virol J.* 2009; 6: 93.
206. Romi, R. Malattie trasmesse da vettori e cambiamenti climatici: analisi della situazione in Italia. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* 2001; 6 (3-4): 131-140.
207. Rudolf I, Hubálek Z, Sikutová S, Svec P. Neglected arthropod-borne viral infections in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2008; 57 (3): 80-89.
208. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni, Maroli M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural Leishmania infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop* 2008; 105 (2) :158-165.
209. Rutledge LC, Gupta RJ. Moths and Sandflies. *In*: Medical and veterinary entomology. Mullen, G; Lance A. Durden: Academic Press; 2002: 147-160.
210. Sabin AB, Philip CB, Paul JR. Phlebotomus (pappataci or sandfly) fever: a disease of military importance; summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA* 1944; 125: 603-606 e 693-699.
211. Saidi S, Tesh R, Javadian E, Sahabi Z, Nadim A. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. II. The prevalence of human and animal infection with five phlebotomus fever virus serotypes in Isfahan province. *Am J Trop Med Hyg.* 1977; 26(2): 288-293.
212. Saikku P, Brummer-Korvenkontio M. Tick-borne viruses in Finland. *Med Biol* 1975; 53 (5): 317-320.
213. Saluzzo JF, Adam F, Heme G, Digoutte JP. Isolation of viruses from rodents in Senegal (1983-1985). Description of a new poxvirus. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1986; 79 (3): 323-333.
214. Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Palop-Borrás B, Navarro-Marí JM. Unusual manifestation of Toscana virus infection, Spain. *Emerg Infect Dis* 2009; 15 (2): 347-348.
215. Sanbonmatsu-Gámez S, Morillas-Márquez F, Pérez-Ruiz M, , Sánchez-Seco MP, Sanchez JM, Collao X, López B. Toscana virus infection in Spanish sandflies. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005; 82: 57 ISOPS.
216. Sánchez-Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003; 71 (1): 140-149.

217. Sánchez-Seco MP, Vázquez A, Collao X, Hernández L, Aranda C, Ruiz S, Escosa R, Marqués E, Bustillo MA, Molero F, Tenorio A. Surveillance of arboviruses in Spanish wetlands: detection of new flavi- and phleboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10 (2): 203-260.
218. Sang RC, Gichogo A, Gachoya J, Dunster MD, Ofula V, Hunt AR, Crabtree MB, Miller BR, Dunster LM. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol.* 2003; 148 (6): 1085-1093.
219. Santos L, Simões J, Costa R, Martins S, Lecour H. Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill* 2007; 12 (6):pii=715. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=715>.
220. Schlein Y. Marking of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) by feeding on sprayed, coloured sugar bait: a possible means of behavioural and control studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 599.
221. Shlein Y, Raymond L, Jacobson RL, Müller G. Sandfly feeding on noxious plants: A potencial method for the control of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65 (4): 300-303.
222. Schmidt JR, Schmidt ML, Said MI. Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of phlebotomus fever viruses from *Phlebotomus papatasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20 (3): 483-490.
223. Schmaljohn CS, Wooper JW. Bunyaviridae: the viruses and their replication. *In Virology* (4th Edition). Fields, B, Peter M, Howley MD, Diane E, Griffin Ph.D., Robert A; Lamb Ph.D, Malcolm A, Martin MD, Roizman B, Stephen E, Straus MD, David M, Knipe Ph.D. (Eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers 2001: 1581-1602.
224. Schwarz TF, Gilch S, Schätzl HM. A recombinant Toscana virus nucleoprotein in a diagnostic immunoblot test system. *Res Virol* 1998; 149 (6): 413-418.
225. Schwarz TF, Gilch S, Jäger G. Travel-related Toscana virus infection. *Lancet* 1993; 342 (8874): 803-804.
226. Schwarz TF, Gilch S, Jäger G. Aseptic meningitis caused by sandfly fever virus, serotype Toscana. *Clin Infect Dis* 1995a; 21 (3): 669-671.
227. Schwarz TF, Jäger G, Gilch S, Nitschko H. Nested RT-PCR for detection of sandfly fever virus, serotype Toscana, in clinical specimens, with confirmation by nucleotide sequence analysis. *Res Virol* 1995c; 146 (5): 355-362.
228. Schwarz TF, Jäger G, Gilch S, Pauli C, Eisenhut M, Nitschko H, Hegenscheid B. Travel-related vector-borne virus infections in Germany. *Arch Virol Supp* 1996; 11: 57-66.
229. Schwarz TF, Jäger G, Gilch S, Pauli C. Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in Germany. *Epidemiol Infect* 1995; 114 (3): 501-510.
230. Seccombe AK, Ready PD, Huddleston LM. A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae, Phlebotominae*). *Occ Pap Syst Ent* 1993; 8: 1-57.
231. Service MW. Phlebotomine sand-flies (*Phlebotominae*) *In: The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections*. Wallingford: CABI Publishing; 2001: 395-397.

232. Shope RE, Peters CJ, Walker JS. Serological relation between Rift Valley fever virus and viruses of *Phlebotomus* fevers serogroup 1980; *Lancet* 1: 886-887.
233. Shortt HE, Poole LT, Stephens ED: Sandfly fever in the Indian frontier. A preliminary note on some laboratory investigations. *Indian J Med Res* 1935; 21: 775-788.
234. Simon F, Laval F, Garnotel E, Tolou H. Méningite puriforme due à une infection autochtone par Toscana virus, region de Marseille, été 2004. *Med Mal Infect. Résumés des communications affichées* 2005; 35 S141-S193.
235. Soldan SS, González-Scarano F. Emerging infectious diseases: the *Bunyaviridae*. *J Neurovirol* 2005; 11: 412-423.
236. Soldateschi D, dal Maso GM, Valassina M, Santini L, Bianchi S, Cusi MG. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (3): 649-652.
237. Sonderegger B, Hächler H, Dobler G, Frei M. Imported aseptic meningitis due to Toscana virus acquired on the island of Elba, Italy, August 2008. *Euro Surveill* 2009; Rapid communications 14 (1): 1-2.
238. Stock I. Chikungunya fever--expanded distribution of a re-emerging tropical infectious disease. *Med Monatsschr Pharm* 2009; 32(1): 17-26. Review.
239. Swanepoel R. *Bunyaviridae*. In *Principles and practice of clinical virology* (5th edn). Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD & Scloub BD (Eds). John Wiley & Sons Ltd 2004: 554-588.
240. Swofford, DL. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10, 2003 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
241. Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Günther S, Ries A, Ziegler U, Müller A, Stich A. Acute Toscana virus infection mimicked by Yersinia-induced reactive arthritis syndrome after journey to Spain. *J Clin Virol* 2010; 47 (1): 104-105.
242. Tavana AM. The seroepidemiological studies on sandfly fever in Iran during imposed war. *Iranian J Publ Health* 2001; 30: 145-146.
243. Teodoro U, Santos D, Santos R, Oliveira O, Poiani L, kühl J, Lonardon M, Silveira T, Monteiro W, Neitzke H. Avaliação De medidas de controle de flebotomídeos no norte do Estado do Paraná. Brasil. *Cad Saúde Pública*; 23 (11): 2597-2604.
244. Terrosi C, Olivieri R, Bianco C, Cellesi C, Cusi MG. Age-dependent seroprevalence of Toscana virus in central Italy and correlation with the clinical profile. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16 (8): 1251-1252.
245. Tesh RB. The epidemiology of *Phlebotomus* (sandfly) fever. *Isr J Med Sci* 1989; 25(4): 214-217.
246. Tesh RB, Lubroth J, Guzman H. Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (*Bunyaviridae: Phlebovirus*) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47 (5): 574-581.
247. Tesh RB, Modi GB. Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (*Rhabdoviridae: Vesiculovirus*) in *Phlebotomus papatasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32 (3): 621-623.

248. Tesh RB, Modi GB. Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission. Am J Trop Med Hyg 1987; 36 (1): 189-193.
249. Tesh RB, Peralta PH, Shope RE, Chaniotis BN, Johnson KM. Antigenic relationships among phlebotomus fever group arboviruses and their implication for the epidemiology of sandfly fever. Am J Trop Med Hyg 1975; 24 (1): 135-144.
250. Tesh RB, Peters CJ, Meegan JM. Studies on the antigenic relationship among phleboviruses. Am J Trop Med Hyg 1982 Jan; 31 (1): 149-55.
251. Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjck-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. Bull World Health Organ 1976; 54 (6): 663-674.
252. Tesh RB, Saidi S, Javadian E, Nadim A. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. Am J Trop Med Hyg 1977; 26: 282-287.
253. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DC The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997; 25: 4876-4882.
254. Toprak S, Özer N. Distribution of sand fly (*Diptera: Psychodidae*) species and efficiency of capturing methods in Sanliurfa Province, Turkey. J Med 2007; 44 (1): 23-28.
255. Traavik T, Mehl R. Uukuniemi group viruses isolated in Norway. Arch Virol 1977; 54 (4): 317-331.
256. Traoré-Lamizana M, Fontenille D, Diallo M, Bâ Y, Zeller HG, Mondo M, Adam F, Thonon J, Maïga A. Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus. J Med Entomol 2001; 38 (4): 480-42.
257. Turell MJ, Perkins PV. Transmission of Rift Valley fever virus by the sand fly, *Phlebotomus duboscqi* (*Diptera: Psychodidae*). Am J Trop Med Hyg 1990; 42 (2): 185-188.
258. UNEP- United Nations Environment Programme (2001). *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)*. UNEP/Chemicals/2001/3. 50p. Disponível em: www.pop.int
259. Valassina M, Cuppone AM, Bianchi S, Santini L, Cusi MG. Evidence of Toscana virus variants circulating in Tuscany, Italy, during the summers of 1995 to 1997. J Clin Microbiol 1998; 36(7): 2103-2104.
260. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. A mediterranean arbovirus: the Toscana virus. Journal of Neurovirology 2003; 9 (6): 577-583.
261. Valassina M, Cusi MG, Valensin PE. Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. J Clin Microbiol 1996; 34 (10): 2500-2502. *Erratum* in: J Clin Microbiol 1997; 35(5): 1293.
262. Valassina M, Meacci F, Valensin PE, Cusi MG. Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: the incisive role of Toscana virus. J Med Virol 2000; 60 (1): 86-90.
263. Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Valensin PE, Cusi MG. Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10 (3): 483-484.
264. Valassina M, Valentini M, Valensin PE, Cusi MG. Fast duplex one-step RT-PCR for rapid differential diagnosis of entero- or toscana virus meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43 (3): 201-205.

265. Valentini M, Valassina M, Gori Savellini G, Cusi MG. Nucleotide variability of Toscana virus M segment in strains isolated from clinical cases. *Virus Res* 2008; 135: 187-190.
266. Valerio, L, Maroli M. Studies on repellent and anti-feeding activity of garlic oil (*Allium sativum*) against the bite of phlebotomine vectors. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005; 82: 158 ISOPS
267. Venturi G, El-Sawaf G, Arpino C, Madeddu G, Fiorentini C, Benedetti E, Marchi A, Helaly G, El Ghazouly K, Ghazal A, Farchi F, Soddu A, Cacciatore D, El Zalabani M, Mura MS, Rezza G, Ciufolini MG. Arboviral infections in Egyptian and Sardinian children and adults with aseptic meningitis and meningo-encephalitis. *Scand J Infect Dis* 2009; 41 (11-12): 898-899.
268. Venturi G, Madeddu G, Rezza G, Ciccozzi M, Pettinato ML, Cilliano M, Fiorentini C, Mura MS, Ciufolini MG. Detection of Toscana virus central nervous system infections in Sardinia Island, Italy. *J Clin Virol* 2007; 40 (1): 90-91.
269. Verani P, Ciufolini MG, Caciolli S, Renzi A, Nicoletti L, Sabatinelli G, Bartolozzi D, Volpi G, Amaducci L, Coluzzi M, et al. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterization of a new Phlebovirus (Arbia virus). *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38 (2): 433-439.
270. Verani P, Lopes MC, Nicoletti L, Balducci M. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. *Arboviruses in the Mediterranean countries*, Zlb Bakt 1980. Suppl.9, Gustav Fisher Verlag. Stuttgart-New York; 195-201.
271. Verani P, Nicoletti L, Ciufolini MG, Balducci M. Viruses transmitted by sandflies in Italy. *Parassitologia* 1991; 33 Suppl: 513-518.
272. Weaver SC. Evolutionary influences in arboviral diseases. *Curr Top Microbio Immunol* 2006; 299: 285-314.
273. Weaver SC. Vector biology in arboviral pathogenesis. *In Viral Pathogenesis*. Nathansan N. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia New York 1997: 329-352.
274. WHO. Fact sheet n.º 207. Rift Valley fever 2007a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/print.html>
275. WHO. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to Dengue Virus. Immunization, Vaccines and Biologicals 2007b. 26 p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_07.07_eng.pdf
276. WHO. The vector borne human infections of Europe, their distribution and burden on public health. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen 2004. Disponível em: <http://www.euro.who.int/document/E82481.pdf>.
277. WHO. Water related-diseases 2001. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/encephalitis/en/print.html
278. WHO/AFRO. Yellow fever WHO/AFRO overview 2007. Disponível em: <http://www.afro.who.int/yellowfever/>

279. Yaghoobi-Esrshadi MR, Shirani-Bidabadi L, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zeraati H. Colonization and biology of *Phlebotomus papatasi* the main vector of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. Iranian J Publ Health 2007; 36 (3) 21-26.
280. Young DG & Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (*Diptera: Psychodidae*). Mem. Am Entomol 1994; 54: 1-881.
281. Yuval B, Warburg A. Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae*) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Ann Trop Med Parasitol 1989; 83: 195-196.
282. Zhioua E & Chelbi I. 2005. Efficacy of active underground rabbit holes around houses for reducing the indoor density of sandflies. Arch Inst Pasteur Tunis 2005; 82: 76 ISOPS
283. Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, Ninove L, Bichaud L, Derbali M, Champs M, Cherni S, Salez N, Cook S, de Lamballerie X, Charrel RN. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. J Gen Virol. 2010 May; 91(Pt 5):1275-1283.