



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Caracterização de novos flebovírus de ixodídeos:  
diversidade genética e distribuição geográfica em  
Portugal e na Estremadura Espanhola

**Rita Afonso**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL E INTERNACIONAL**

**OUTUBRO, 2018**



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Caracterização de novos flebovírus de ixodídeos:  
diversidade genética e distribuição geográfica em  
Portugal e na Estremadura Espanhola

**Autor:** Rita Afonso

**Orientador:** Professor Doutor Ricardo Parreira

**Coorientador:** Doutora Mónica Nunes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biomédicas



*Para o meu Pai!*



## Agradecimentos

Penso que com outro orientador este trabalho não poderia ter sido concretizado e, por isso mesmo, quero agradecer ao Professor Doutor Ricardo Parreira a generosa paciência, a excelente orientação e os sempre sábios ensinamentos! Obrigada, também, por me ter transmitido o fascínio da virologia e, sobretudo, a decisiva paixão pelo trabalho de investigação.

À Doutora Mónica Nunes o meu muito obrigada pela preciosa ajuda, partilha de conhecimentos, disponibilidade e pela presença sempre motivadora!

O meu muito obrigada à Ângela Mendes por estar sempre presente no esclarecimento de qualquer dúvida técnica e pela sua tranquilidade e espírito de ajuda.

O meu agradecimento ao Instituto da Conservação da Natureza e Florestas e à Tapada de Mafra por terem autorizado as colheitas de ixodídeos e pela disponibilidade para colaborarem com esta investigação.

O meu agradecimento à Prof<sup>a</sup> Eva Frontera do Departamento de Saúde Animal da Escola de Medicina veterinária da Universidade da Estremadura (Cáceres) pelo envio de ixodídeos de Espanha.

O meu agradecimento aos Mestres André Pereira e Lúcia Figueira pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas sobre o estudo anteriormente efetuado e que foi o ponto de partida para este trabalho.

Ao Tio João, e ao Dr. Ricardo Dias, médico Veterinário, o meu bem-haja pelo enorme empenho na colheita de ixodídeos para este estudo e, de uma forma geral, a todos os colegas que, pontualmente, nos foram enviando ixodídeos de diferentes regiões do País.

Finalmente, o meu reconhecido Obrigada à minha querida família pela presença de sempre e pelo estimulante incentivo neste longo e surpreendente caminho.







## Resumo

A descoberta dos vírus Heartland e *Severe fever with thrombocytopenia syndrome*, ambos patogénicos para o Homem, estimulou na última década a identificação e caracterização de novos flebovírus (*Bunyavirales*, *Phenuiviridae*, *Phlebovirus*), transmitidos por, ou associados a ixodídeos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a distribuição natural destes agentes, e caracterizar a sua diversidade em ixodídeos colhidos em Portugal e Espanha. Utilizámos para o rastreio das amostras analisadas uma estratégia de deteção baseada na utilização de RT-PCR, gerando, concomitantemente, sequências parciais de *Phlebovirus* correspondentes a parte da sequência que codifica a polimerase de RNA viral.

As colheitas dos exemplares de ixodídeos analisados foram efetuadas no centro e norte de Portugal, na Ilha de São Miguel (arquipélago dos Açores), na Ilha da Madeira (arquipélago da Madeira) e na região ocidental de Espanha (províncias da Estremadura e Castela/Leão). Da amostra estudada, com um total de 746 ixodídeos, 221 (29,6%) foram recolhidos da vegetação e 525 (70,6%) de hospedeiros vertebrados. Foi ainda possível estudar 3 posturas de ovos ocorridas no período decorrido entre a recolha e o trabalho experimental. Os ixodídeos foram organizados em *pools*, tendo sido obtidos resultados positivos de amplificação de sequências virais em 45/92 (48,9%) das *pools* estudadas. Este resultado revelou-se independentemente dos diferentes métodos de recolha dos exemplares, dos seus estádios de desenvolvimento, bem como do género dos exemplares neles incluídos.

A análise filogenética de um fragmento de cerca de 500 pb (segmento L), permitiu aferir a existência de relações de filogenia entre as sequências obtidas, onde as linhagens genéticas encontradas foram consistentes nas várias árvores filogenéticas efetuadas. Foi ainda evidente a associação de linhagens com as sequências da proteína putativa da proteína L, caracterizada pelos grupos (padrões) de resíduos de aminoácidos identificados em alinhamentos múltiplos de sequências proteicas. Na maior parte dos casos, quando analisadas múltiplas sequências obtidas a partir de um mesmo produto de amplificação, foi revelada uma baixa diversidade genética.

Como perspetiva consideramos ser de extrema importância que estes estudos continuem a ser feitos e alargados, pelo menos, a toda a Europa de forma a rastrear a diversidade genética, a evolução, a taxonomia, a epidemiologia e avaliar a eventual patogenicidade (ou não) destes vírus.

**Palavras-Chave:** *Phlebovirus*, Sequências do segmento-L, ixodídeos, caracterização filogenética

## ***Abstract***

The discovery of the Heartland and *Severe fever with thrombocytopenia syndrome* viruses, both pathogenic to Humans, has stimulated over the last decade the discovery and characterization of new phleboviruses (*Bunyavirales*, *Phenuiviridae*, *Phlebovirus*) transmitted by, or associated with, ticks. This study was carried out with the purpose of investigating the natural distribution of these agents and document their diversity in ticks collected in Portugal and Spain.

The collected samples were screen for viral sequences using a strategy of detection based on the use of RT-PCR, generating, at the same time, partial *Phlebovirus* sequences, corresponding to part of the coding sequence of the viral RNA polymerase.

The samples were collected in the center and north of Portugal, in São Miguel Island (archipelago of the Azores), in Madeira island (archipelago of Madeira), and in the western region of Spain (in the provinces of Estremadura and Castilla/Leon). From the total 746 ticks analyzed, 221 (29.6%) were collected from the vegetation and 525 (70.5%) from vertebrate hosts. It was also possible to screen 3 eggs laid in the time frame in between the harvest and the experimental work. The ticks that were organized in *pools*, and positive test results (revealing the presence of viral sequences) were associated with 45/92 (48.9%) of the studied *pools*, with the results being independent of the specimens harvest methods, their development stage and the specimens genera analyzed.

The phylogenetic analysis of a fragment with about 500 pb (L segment), has allowed us to deduce the existence of phylogenetic relations between the obtained sequences. The genetic lineages identified were consistent in the various phylogenetic trees made, with an evident association of lineages with the sequences of the putative protein L, which were characterized by the groups (patterns) of residues of amino acids identified in multiple protein sequences alignments. In most cases, when analyzing multiple sequences obtained from the same amplification product, a low genetic diversity was revealed.

As a perspective, we believe it is extremely important that studies such as these keep being conducted in the future, possibly extending them to, at least, other parts of Europe, in order to track the genetic diversity, the evolution, the taxonomy, the epidemiology, and investigate the pathogenicity (or not) of these viruses.

**Keywords:** Phleboviruses, L- segment sequences, ticks, phylogenetic characterization

## Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
<i>Abstract</i> .....	viii
Índice Geral.....	ix
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ixodídeos.....	3
1.1.1. Ciclo de vida dos ixodídeos.....	4
1.1.2. Distribuição de ixodídeos em Portugal.....	7
1.2. Tibovírus .....	9
1.3. Ordem <i>Bunyavirales</i> .....	12
1.4. <i>Phlebovirus</i> .....	13
1.5. Objetivos.....	20
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
2.1. Distribuição da população de ixodídeos recolhida .....	23
2.2. Técnicas de colheita de ixodídeos na vegetação e nos hospedeiros.....	23
2.3. Identificação e armazenamento dos ixodídeos.....	24
2.4. Colheita e caracterização de ixodídeos da vegetação.....	24
2.5. Colheita e caraterização de ixodídeos dos hospedeiros.....	25
2.6. Maceração dos ixodídeos e preparação das amostras para extração de ácidos nucleicos.....	27
2.6.1. Extração de DNA.....	28
2.6.2. Extração de RNA.....	28
2.7. Síntese, por Transcrição Reversa (RT), de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total.....	29
2.8. Amplificação de sequências genómicas de <i>Phlebovirus</i> .....	30

2.8.1. Amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> (Segmento L) por <i>multiplex</i> -PCR.....	30
2.8.2. Amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> (Segmento S) por <i>multiplex</i> -PCR.....	31
2.9. Amplificação de fragmentos de DNA de CCHFV por <i>nested</i> -PCR.....	32
2.10. Eletroforese em gel de agarose .....	33
2.11. Clonagem de Produtos de PCR com o vetor plasmídico <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i> (Promega, E.U.A.).....	34
2.11.1. Ligação do vetor plasmídico às moléculas de DNA.....	35
2.11.2. Preparação e transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	35
2.11.3. Extração do plasmídeo por lise alcalina .....	36
2.11.4. Hidrólise de DNA plasmídico com a endonuclease de restrição <i>EcoRI</i> .....	37
2.12. Purificação de DNA para Sequenciação.....	37
2.12.1. Purificação de DNA, produto de PCR.....	37
2.12.2. Purificação do DNA plasmídico .....	38
2.13. Sequenciação de DNA.....	39
2.14. Análise Bioinformática das sequências obtidas das reações de sequenciação.....	39
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>41</b>
3.1. Caracterização da população de ixodídeos recolhida.....	43
3.2. Caracterização da população de ixodídeos estudada.....	45
3.3. Amplificação de sequências genômicas virais.....	46
3.3.1. Amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> (Segmento L) por <i>multiplex</i> -PCR.....	46
3.3.2. Amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> (Segmento S) por <i>multiplex</i> -PCR.....	53
3.3.3. Amplificação de fragmentos de DNA de CCHFV por <i>nested</i> -PCR	55

3.4. Clonagem e análise de produtos de amplificação PCR no vetor plasmídico <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i> .....	56
3.5. Análise bioinformática das sequências obtidas das reações de sequenciação.....	58
<b>4. Conclusões e perspectivas</b> .....	69
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	73
<b>6. Anexos</b> .....	83
Anexo I.....	84
Anexo II.....	87
Anexo III.....	89
Anexo IV.....	94

## Lista de Figuras

### 1. Introdução

- Figura 1.1. Os vários estádios de desenvolvimento de ixodídeos da espécie *Haemaphysalis punctata*. Da esquerda para a direita: adulto macho, adulto fêmea, ninfa, larva e ovos (Fotografia da Doutora Mónica Nunes)..... 5
- Figura 1.2. Ciclo de vida dos ixodídeos (Imagem retirada de INSA, 2017)..... 6
- Figura 1.3. Distribuição geográfica da CCHF de acordo com informação da Organização Mundial de Saúde, 2017. (Adaptado de <http://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congo-haemorrhagic-fever/en/>)..... 10
- Figura 1.4. Representação esquemática do virião característico dos vírus do género *Phlebovirus*. (adaptado de Viralzone: <https://viralzone.expasy.org/252>)..... 14
- Figura 1.5. Ciclo replicativo dos vírus do género *Phlebovirus* (Adaptado de <http://viralzone.expasy.org>)..... 15
- Figura 1.6. Árvore filogenética de TBV, baseada na sequência de fragmentos de 500 pb amplificados por RT-PCR do segmento L (adaptado de Matsuno *et al.*, 2015)..... 17

### 2. Material e Métodos

- Figura 2.1. Distribuição geográfica da população de ixodídeos recolhida. As regiões assinaladas a verde indicam aquelas onde foram colhidos ixodídeos dos quais vieram a ser amplificadas e analisadas, no decurso deste estudo, sequências de flebovírus..... 23
- Figura 2.2. Mapa do vetor plasmídico *pGEM®-T Easy*, à direita, parte da sequência dos locais de reconhecimento das enzimas de restrição (adaptado de [www.promega.com](http://www.promega.com))..... 34

### 3. Resultados e Discussão

- Figura 3.1. Distribuição da população de ixodídeos recolhida da vegetação de acordo com as suas espécies..... 43
- Figura 3.2. Distribuição da população de ixodídeos recolhida de animais de acordo com as suas espécies..... 44
- Figura 3.3. Caracterização das colheitas de ixodídeos da vegetação e animais em termos de fase de desenvolvimento..... 45

Figura 3.4	Distribuição da população de ixodídeos estudada de acordo com as suas espécies.....	45
Figura 3.5	Deteção de sequências de flebovírus por RT-PCR em extratos de RNA preparados a partir de ixodídeos. No gel estão representadas as reações de amplificação parcial de sequências do segmento L de flebovírus referentes à análise de 11 das amostras incluídas neste estudo (pistas 1 a 11). M- Marcador de massa molecular <i>NZYDNA Ladder VI</i> ( <i>NZYTech</i> , Portugal); pista 12- controlo negativo da reação de PCR. As amostras indicadas (R44, pista 4; R46, pista 6; R55, pista 9 e R56, pista 10) revelaram a presença de genomas virais pela observação do fragmento esperado (indicado pelas setas verticais).....	47
Figura 3.6	Análise comparativa da distribuição de <i>pools</i> positivas para a presença de sequências de flebovírus em função do nº total de <i>pools</i> testados por espécies de ixodídeos estudada. A azul estão apresentadas o número de <i>pools</i> estudadas/espécie de ixodídeo e a laranja o numero de <i>pools</i> positivas para <i>Phlebovirus</i> /espécie de ixodídeo.....	48
Figura 3.7	Distribuição da população estudada por estádios de crescimento. A azul estão apresentadas o número de <i>pools</i> estudadas/fase crescimento, em que foram estudadas no estado adulto pools de fêmeas engorgitadas separadas das fêmeas não engorgitadas, e a laranja o numero de <i>pools</i> positivas para <i>Phlebovirus</i> /fase crescimento.....	50
Figura 3.8	Amplificação de sequências virais por RT-PCR usando extratos de cDNA (pistas 1), DNA (pistas 2) ou RNA obtidos a partir das amostras R67, R68, R72, R75 e R76; PCR; M – Marcador de massa molecular <i>NZYDNA Ladder VI</i> ( <i>NZYTech</i> , Portugal); C- Controlo negativo em que água foi utilizada como amostra para o PCR.....	53
Figura 3.9	Análise em gel de agarose de reações de PCR destinadas à amplificação de sequências parciais do segmento L (esquerda) e do segmento S (direita) de flebovírus. M-Marcador de massa molecular <i>NZYDNA Ladder VI</i> ( <i>NZYTech</i> , Portugal); 1-13 Amostras estudadas; 13-controlo negativo da reação de PCR. Todas as amostras apresentam o fragmento de cerca de 500 pb na reação de amplificação do segmento L e nenhuma apresenta o fragmento esperado de 370 pb na reação de amplificação do segmento S.....	55

Figura 3.10	Padrão de migração do DNA plasmídico, em gel de agarose, de 8 clones bacterianos das clonagens dos fragmentos de DNA das amostras R11.2, R44 e RBR. As setas verdes indicam as amostras que apresentam uma banda do mesmo tamanho do plasmídeo de referência (M) e que em princípio, não apresentam o fragmento clonado. M - marcador - plasmídeo de referência com 3kpb.....	57
Figura 3.11	Exemplo de um padrão de migração dos plasmídeos recombinantes após hidrólise com a enzima <i>EcoRI</i> . A banda correspondente a um fragmento de DNA de 3 kpb representa o vetor plasmídico <i>pGEM-T Easy</i> linearizado, e as bandas com cerca de 500 pb indicam a presença do fragmento de DNA clonado. M – marcador de massa molecular <i>Lambda HindIII</i> .....	57
Figura 3.12	Relações filogenéticas entre as amostras em estudo, baseadas na análise das sequências nucleotídicas parciais do segmento L de <i>Phlebovirus</i> . A árvore filogenética foi obtida com 51 sequências de referência e 69 amostras (amostras com prefixo R) pelo método da máxima verossimilhança ML, utilizando o modelo GTR+I+Γ. Estão também indicados os valores de <i>bootstrap</i> (percentagem de 1000 réplicas) considerados significativos (Valores superiores a 75%).....	60
Figura 3.13	Relações filogenéticas entre as amostras em estudo, baseadas na análise das sequências nucleotídicas parciais do segmento L de <i>Phlebovirus</i> . A árvore filogenética foi obtida com 51 sequências de referência e 69 amostras (amostras com prefixo R) pelo método ML, utilizando o modelo GTR+I+Γ. Estão apresentados * que indicam apenas <i>bootstrap</i> ou valores de probabilidade significativa e que aparecem nos ramos que tiveram suporte estatístico nas abordagens NJ, ML ou análise <i>bayesiana</i> .....	61
Figura 3.14	Caracterização de cada linhagem genética através da análise das sequências putativas dos produtos que cada uma delas codifica. Sequências encontram-se agrupadas com base nos padrões de combinações dos resíduos de aminoácidos da proteína L.....	63
Figura 3.15	Relações filogenéticas entre as amostras em estudo e sequências de referência, baseadas na análise das sequências nucleotídicas do segmento L de <i>phlebovirus</i> . A estrela vermelha representa o grupo onde todas as nossas sequências estão contidas. Estão assinalados os quatro grupos genéticos SFTS/ <i>Heartland</i> , <i>Bhanja</i> , <i>Uukuniemi</i> e <i>Kaisodi</i> (Adaptado de Prinz <i>et al.</i> , 2017).....	67



## Lista de Tabelas

### 1. Introdução

Tabela 1.1	Classificação dos vírus da ordem <i>Bunyvirales</i> , com genoma RNA, transmitidos por ixodídeos, causadores de doenças em humanos e animais (Adaptado de Kazimírová <i>et al.</i> , 2017).....	13
------------	---	----

### 2. Material e Métodos

Tabela 2.1	Caracterização das colheitas de ixodídeos na vegetação.....	25
Tabela 2.2	Caracterização das colheitas de ixodídeos em hospedeiros.....	26
Tabela 2.3	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> , tal como descrito por Matsuno <i>et al.</i> , 2015.....	30
Tabela 2.4	Condições de PCR para detecção do segmento L de <i>Phlebovirus</i> .....	31
Tabela 2.5	<i>Primers</i> utilizados para amplificação parcial do segmento S de <i>Phlebovirus</i> , tal como descrito por Lambert <i>et al.</i> , 2009.....	31
Tabela 2.6	Condições de PCR para amplificação do segmento S de <i>Phlebovirus</i> , tal como descrito por Lambert <i>et al.</i> , 2009.....	32
Tabela 2.7	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de sequências genômicas de CCHFV (Figueira, 2016).....	32
Tabela 2.8	Condições de PCR para detecção do segmento S de CCHFV.....	33

## Lista de Abreviaturas

ADB	Tampão de dissolução de Agarose (do inglês <i>Agarose Dissolving Buffer</i> )
AMP	Ampicilina
BSA	Albumina de Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> )
°C	Graus Centígrados
CCHF	Febre Hemorrágica Crimeia-Congo (do inglês <i>Crimea-Congo hemorrhagic fever</i> )
CCHFV	Vírus da Febre Hemorrágica Crimeia Congo (do inglês <i>Crimea-Congo hemorrhagic fever virus</i> )
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetros
LiCl	Cloreto de Lítio
DEPC	Dietil-piromcarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ddNTPs	Didesoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
E.U.A.	Estados Unidos da América
g	Aceleração da gravidade
HCl	Ácido clorídrico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
LACV	Vírus da Cross (do inglês <i>La Crosse virus</i> )
kpb	Kilopares de bases
m	Metros
M	Molaridade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ML	Máxima Verosimilhança (do inglês <i>Maximum Likelihood</i> )
Meio LB	Meio Luria-Bertani
NGS	Sequenciação de Nova Geração (do inglês <i>Next-generation sequencing</i> )
NJ	Junção dos Vizinhos (do inglês <i>Neighbor-Joining</i> )
Nm	Nanómetros
NSs	Proteína não estrutural

Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pmol	Picomole = 10 <sup>-12</sup> moles
RdRp	Polimerase RNA dependente RNA (do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i> )
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa (do inglês <i>Reverse transcription</i> )
RT-PCR	Polimerização em cadeia da polimerase antecedida de transcrição reversa
RVFV	Vírus da Febre do Vale do Rift (do inglês <i>Rift Valley fever virus</i> )
s.l.	sensu lato
SFNV	Vírus da febre dos flebótomos de Nápoles (do inglês <i>sandfly fever Naples virus</i> ,
SFSV	Vírus da febre dos flebótomos da Sicília (do inglês <i>sandfly fever Sicilian virus</i> )
SFTSV	Vírus do Síndrome de Febre Severa com Trombocitopenia (do inglês <i>Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus</i> )
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBPVs	<i>Phlebovirus</i> das Carraças (do inglês <i>Tick-borne phleboviruses</i> )
TBEV	Vírus da encefalite das carraças (do inglês <i>tick-borne encephalitis virus</i> )
TBV	Vírus das carraças (do inglês <i>Tick-borne virus</i> )
TE	Tris-EDTA
TOSV	Vírus da Toscana (do inglês <i>Toscana virus</i> )
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	Transformation and Storage Solution
UV	Ultravioleta
V	Volts
XGAL	5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
μ	Micro, prefixo que designa 10 <sup>-6</sup>
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μM	Micromolar



# Introdução



## 1. Introdução

Os ixodídeos, comumente denominados por carraças, são conhecidos mundialmente, fazem parte da história da Terra e do Homem e podem ser facilmente encontrados na maioria dos sistemas ecológicos. Desde 1893, com o trabalho pioneiro de Smith e Kilbourne sobre *Febre do Texas* em gado bovino (Assadian *et al.*, 2002), os ixodídeos tornaram-se num importante foco de investigação médica e veterinária.

É nos dias de hoje reconhecida a sua especial importância, entre todos os restantes artrópodes, enquanto vetores responsáveis pela transmissão de uma enorme variedade de agentes infecciosos, incluindo fungos, vírus, bactérias e protozoários (Kazimírová *et al.*, 2017).

Na última década vários grupos de investigadores identificaram e descreveram uma grande diversidade de vírus transmitidos ou associados a ixodídeos. Muitos destes vírus podem não ser efetivamente transmitidos por ixodídeos, mas coexistir como parte do seu viroma *simbionte*.

Genericamente, estes vírus são designados tiovírus ou simplesmente TBV, do inglês *tick-borne viruses*. As doenças provocadas por TBV apresentam significativo impacto médico e veterinário, e o interesse aumentado que neles tem recaído tem sido motivado pela vasta distribuição geográfica dos seus potenciais vetores. Estes têm, inclusive, aparecido em novas regiões como resultado de alterações socioeconómicas e climáticas, expansão esta que não tem sido possível contrariar como consequência da falta de medidas de controlo eficientes (Estrada Peña *et al.*, 2013). Muitos TBV patogénicos para os humanos e outros animais têm emergido e reemergido recentemente (Kazimírová *et al.*, 2017, Prinz *et al.*, 2017). Face a este novo cenário, revela-se de especial importância perceber a distribuição global destes vírus, bem assim como os mecanismos inerentes à sua evolução, nomeadamente no sul da Europa (Pereira *et al.*, 2016, Papa *et al.*, 2016), e é nesse âmbito que este trabalho se enquadra.

### 1.1. Ixodídeos

Os ixodídeos são artrópodes ectoparasitas não permanentes, hematófagos estritos em mamíferos, aves, répteis e anfíbios, e estão presentes em quase todas as regiões zoogeográficas. Apresentam períodos de permanência nos hospedeiros e períodos em que existem livremente em habitats naturais caracterizados pela existência de vegetação e

humidade. São responsáveis, como vetor, pela transmissão de fungos, protozoários, vírus e bactérias durante o seu processo de alimentação no hospedeiro (Núncio *et al.*, 2011). Embora os ixodídeos sejam zoofílicos, com alguma frequência têm sido observadas algumas espécies a parasitar o Homem dada a oportunidade de contacto que o torna num hospedeiro acidental destes invertebrados.

Os ixodídeos constituem o segundo maior grupo de vetores a transmitir agentes patogénicos humanos (imediatamente a seguir aos mosquitos) e é o primeiro grupo no processo de transmissão de agentes infecciosos aos outros animais (Silva *et al.*, 2006, Brites-Neto *et al.*, 2015).

Os ixodídeos pertencem à Ordem *Ixodida* e dividem-se em três famílias. A família *Ixodidae*, também conhecida como a família das carraças de corpo duro (por terem o dorso total ou parcialmente coberto por quitina), inclui 702 espécies com importância médica e veterinária entre as quais, espécimes do género *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Hyalomma*. A família *Argasidae* inclui as carraças também conhecidas de corpo mole por não terem escudo dorsal, enquanto que a família *Nuttalliellidae* inclui uma única espécie, *Nuttalliella namaqua*, apenas conhecida na África do Sul e Tanzânia (Brites-Neto *et al.*, 2015).

A família *Ixodidae* é a que apresenta maior importância médica devido ao número de espécies que transmitem agentes patogénicos, e em Portugal conhecem-se 22 espécies de carraças desta família (INSA, 2017).

### **1.1.1. Ciclo de vida dos ixodídeos**

A maioria dos ixodídeos tem um ciclo de vida com quatro fases evolutivas: uma fase inativa (o ovo), e três fases ativas (larva, com três pares de patas), ninfa e adultos (com quatro pares de patas) (Fig. 1.1). Só no estado adulto é possível diferenciar morfologicamente o macho da fêmea.



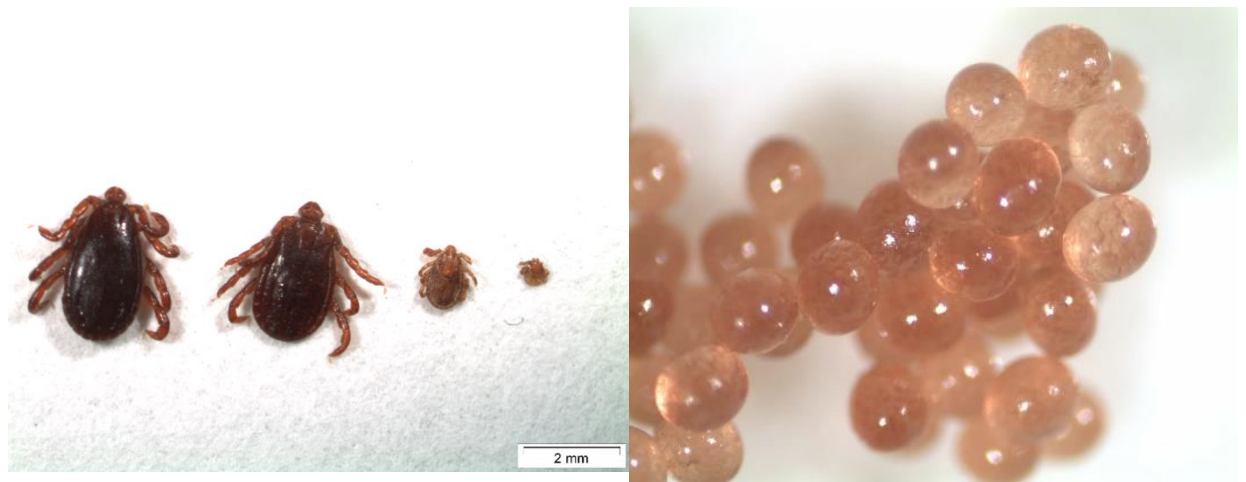


Figura 1.1. Vários estádios de desenvolvimento de ixodídeos da espécie *Haemaphysalis punctata*. Da esquerda para a direita: adulto macho, adulto fêmea, ninfa, larva e ovos (Fotografia da Doutora Mónica Nunes).

Nas fases ativas os ixodídeos têm períodos ativos em que procuram hospedeiros e fazem refeições sanguíneas para sobreviverem e passarem à fase de desenvolvimento seguinte. A refeição sanguínea é geralmente um processo lento em que os ixodídeos têm um grande período de interação com o hospedeiro, e é indispensável para as mudas e maturação dos ovos. Os ixodídeos apresentam ainda períodos não ativos de metamorfose e diapausa que lhes permitem sobreviver em condições não favoráveis (Silva *et al.*, 2006; Nuncio *et al.*, 2014).

O ciclo de vida pode envolver um, dois ou três hospedeiros vertebrados, tal como esquematicamente representado na Figura 1.2. No primeiro caso, todas as fases de desenvolvimento ocorrem no mesmo hospedeiro, ao contrário, quando são envolvidos dois hospedeiros, em que a ninfa permanece no hospedeiro, anteriormente já parasitado pela forma de larva, e nele se alimenta antes de o abandonar e passar à fase seguinte. Os ciclos que envolvem três hospedeiros ocorrem em cerca de 90% das espécies, e cada fase de desenvolvimento ocorre num hospedeiro diferente, o que aumenta a probabilidade de serem infetados e transmitirem uma infeção. Os ixodídeos que necessitam de mais hospedeiros podem levar até 3 anos para completar o seu ciclo de vida e a maioria morre por não encontrar um hospedeiro para a sua refeição sanguínea.

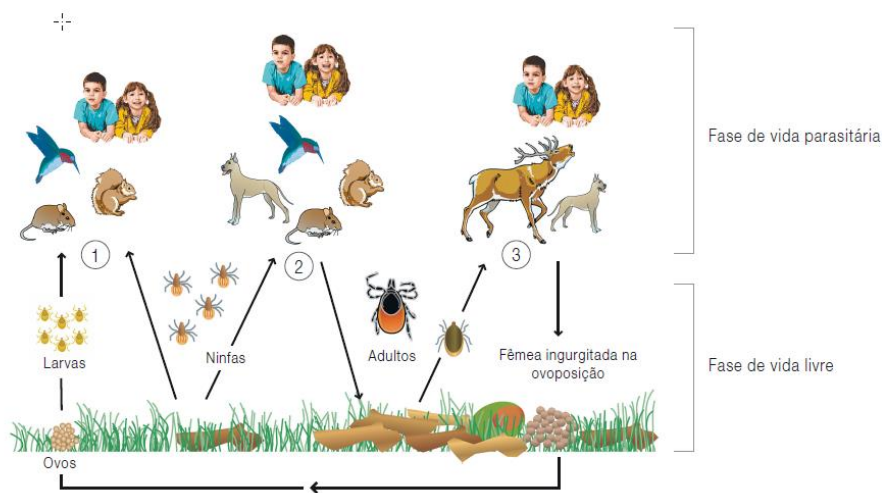


Figura 1.2. Ciclo de vida dos ixodídeos (Imagem retirada de INSA, 2017).

No que à transmissão de agentes infecciosos diz respeito, os ixodídeos, podem atuar como vetores para a transmissão mecânica, em que a sobrevivência do agente depende da sua capacidade para suportar as condições do trato digestivo do ixodídeo até ser transmitido ao hospedeiro vertebrado. Em alternativa, podem atuar como agentes de transmissão biológica, sendo esta a situação mais frequente, e correspondendo ao caso em que após a entrada do agente infeccioso no ixodídeo ocorre a sua multiplicação neste invertebrado, antes de puderem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado (Silva *et al.*, 2006).

Quando um ixodídeo adquire um vírus no decurso de uma refeição sanguínea, caso seja competente para a sua replicação, geralmente fica infetado para o resto da sua vida. Dada a sua longevidade, os ixodídeos atuam como excelentes reservatórios de TBV, mantendo os vírus durante meses ou até anos. A transmissão destes vírus nos ixodídeos pode ocorrer por transmissão vertical, diretamente de uma fêmea infetada, via ovo, à sua descendência (transmissão transovárica), embora a sua frequência seja normalmente baixa (Kuno *et al.*, 2005, Kazimírová *et al.*, 2017). A transmissão ocorre também durante as transições de estado de desenvolvimento do ixodídeo, sendo neste caso designada transmissão transtadial (Nuttall *et al.*, 2003, Kazimirova *et al.*, 2017). A manutenção natural destes vírus, é, pois, dependente da sua transmissão horizontal, tanto do ixodídeo infetado para o hospedeiro vertebrado suscetível, como do vertebrado infetado para o ixodídeo não infetado durante a sua alimentação no vertebrado ou de um ixodídeo macho para uma fêmea durante a cópula (transmissão venérea) (Hubálek *et al.*, 2012). A infeção, ou transmissão do agente infeccioso, pode ocorrer por *cofeeding* quando ixodídeos infetados e não infetados

se alimentam num hospedeiro a uma pequena distância, partilhando a mesma área alimentar (Labuda *et al.*, 1997, Silva *et al.*, 2006).

A transmissão do agente infeccioso ao hospedeiro vertebrado ocorre, principalmente, por mordedura do ixodídeo infetado e conseqüente inoculação de secreções salivares que contêm o agente. A transmissão pode também ocorrer quando as peças bucais do ixodídeo se encontram contaminadas com sangue colhido num hospedeiro no qual se alimentou anteriormente, quando o ixodídeo infetado liberta fezes, quando é esmagado sobre uma região de descontinuidade cutânea ou quando é acidentalmente deglutido. Para alguns agentes, a infeção humana não resulta exclusivamente do contacto com o ixodídeo e pode ser adquirida, como no caso da infeção pelo vírus da encefalite das carraças (TBEV), por ingestão de produtos derivados de animais infetados, como por exemplo o leite (Silva *et al.*, 2006).

De uma forma global, os ixodídeos são vetores eficientes de arbovírus (do inglês *arthropod-borne virus*), embora menos de 10% das espécies de ixodídeos seja conhecida como vetor de vírus (Kazimírová *et al.*, 2017).

### **1.1.2. Distribuição de ixodídeos em Portugal**

Em Portugal foram já identificadas 22 espécies de ixodídeos (INSA, 2017): são elas *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis hispanica*, *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *Hyalomma marginatum*, *Ixodes acuminatus*, *Ixodes arborícola*, *Ixodes bivari*, *Ixodes canisuga*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes inopinatus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes simplex*, *Ixodes ventalloi*, *Ixodes vespertilionis*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), (Dantas-Torres *et al.*, 2013).

Em Portugal continental, as duas espécies de ixodídeos mais importantes em termos de saúde pública são *Rhipicephalus sanguineus* s.l. e *Ixodes ricinus*. *Rhipicephalus sanguineus* é o vetor de *Rickettsia conorii*, o agente etiológico da febre escaro nodular, assim como de outras bactérias, protozoários e vírus. *Ixodes ricinus* é o vetor de *Borrelia burgdorferi* s.l., agente etiológico da Borreliose de Lyme, bem como de outros agentes etiológicos, como rickettsias e outras bactérias, protozoários e vírus.

*Rhipicephalus sanguineus* s.l. representa um complexo das espécies de ixodídeos mais abundante em Portugal e tem uma distribuição mundial. Este complexo encontra-se adaptado a todos os ambientes, com grandes variações de temperatura e humidade relativa. Parasita vários hospedeiros vertebrados (desde animais silváticos a todas as espécies de animais domésticos), estando particularmente associada ao cão e, ocasionalmente, parasita o Homem. Os adultos estão ativos todo o ano, com um aumento de atividade nos meses mais quentes do ano (primavera/verão). As formas imaturas de larvas e ninfas aparecem essencialmente nos meses de verão.

*Ixodes ricinus* apresenta uma distribuição geográfica que inclui a Europa, o Norte de África e a Ásia. Em Portugal já foi identificada em todo o território, e é a segunda espécie mais importante em termos de saúde pública. É uma espécie que se encontra adaptada a ambientes com vegetação e níveis elevados de humidade relativa. Esta espécie parasita tanto mamíferos domésticos como silváticos, aves e lacertídeos, e aparece com maior frequência a parasitar o Homem durante os meses mais frios. As formas adultas estão ativas todo o ano, mas em especial nos meses mais frios (outono/inverno) enquanto que as formas imaturas de larvas e ninfas se encontram mais ativas nos meses de primavera/verão.

*Dermacentor marginatus* apresenta uma distribuição geográfica que inclui a Europa, o Norte de África e a Ásia. É uma espécie que se encontra adaptada a climas temperados e secos, mas que suporta com facilidade variações consideráveis de temperatura não sendo muito exigente em termos de humidade relativa. Parasita praticamente todos os mamíferos domésticos e silváticos bem como o Homem. Os adultos apresentam maior atividade no período de outono/inverno enquanto que as formas imaturas se encontram mais ativas nos meses da primavera/verão. *Dermacentor marginatus* é uma espécie importante em termos de saúde pública sendo, entre outros, o vetor de *Rickettsia slovaca*, agente etiológico de tibia (linfadenopatia causada por carraças).

*Hyalomma lusitanicum* é uma espécie que apresenta uma distribuição geográfica restrita ao sul da Europa e norte de África. É uma espécie que suporta temperaturas altas e humidade relativa reduzida. Parasita animais domésticos e vários animais silváticos, parasitando ocasionalmente o Homem. Tanto as formas adultas como as imaturas estão ativas nos meses da primavera/verão, podendo manter-se ativas até ao outono. Em termos de saúde

pública apresenta a capacidade de transmitir o vírus da febre hemorrágica de Crimeia-Congo (CCHFV).

*Hyalomma marginatum* tem uma distribuição geográfica que inclui a Europa, África e Ásia. Em Portugal, embora já tenha sido identificada em todo o território, a sua distribuição é maior na região sul do país. É uma espécie que suporta temperaturas e humidade relativa variadas. Parasita essencialmente animais domésticos de produção, aves e, ocasionalmente, o Homem. As formas adultas apresentam maior atividade nos meses da primavera/verão enquanto que as formas imaturas apresentam um período de atividade sobretudo nos meses de outono. Em termos de saúde pública, além de ser vetor de bactérias do género *Rickettsia* também é vetor do CCHFV.

## **1.2. Tibovírus**

Os TBV compreendem um grupo diverso de vírus, alguns dos quais usam ixodídeos como vetores, circulando entre estes e um vertebrado que lhes serve de hospedeiro de manutenção. Os TBV e os ixodídeos evoluíram conjuntamente sendo a sua diversidade e características genómicas parcialmente determinada pela necessidade de infetar e replicar nas células destes dois ambientes fisiologicamente tão diferentes. Este facto, resulta numa relação complexa em que o ciclo replicativo do vírus está perfeitamente coordenado com os ciclos de alimentação dos ixodídeos, e o ixodídeo pode conter o vírus por longos períodos sem comprometer a sua biologia, pelo menos de forma aparente (Kuno *et al.*, 2005, Kazimírová *et al.*, 2017).

O papel dos ixodídeos na transmissão de vírus é conhecido há mais de 100 anos e, atualmente, continuamos a detetar novos vírus associados a ixodídeos, alguns dos quais potencial, ou confirmadamente, patogénicos para o Homem e/ou para os animais de que o homem depende para a sua sobrevivência. Continuamos ainda a verificar um aumento da dispersão de alguns destes vírus para novas localizações geográficas (Mansfield *et al.*, 2017).

Cerca de 25% dos TBV conhecidos estão associados a doenças e todos os TBV patogénicos para humanos são zoonóticos. Atualmente, são conhecidas mais de 16 doenças causadas por vírus transmitidos por ixodídeos a humanos e 19 doenças transmitidas a vários tipos de gado (ovino e bovino, entre outros) e animais domésticos foram já igualmente descritas. Frequentemente, estas doenças manifestam-se através do compromisso do sistema nervoso

central ou circulatório, neste último caso associadas a manifestações hemorrágicas (Kazimírová *et al.*, 2017).

Na Europa, as duas principais doenças virais transmitidas por ixodídeos a humanos são a encefalite das carraças (*tick-borne encephalitis*, causada pelo vírus TBEV) e a Febre hemorrágica da Crimeia-Congo (*Crimean-Congo hemorrhagic fever*, causada pelo vírus CCHFV). Este último, anteriormente incluído na família *Bunyaviridae*, género *Nairovirus*, (Bente *et al.*, 2013) foi recentemente reclassificado na família *Nairoviridae*, género *Orthonairovirus*, (Adams *et al.*, 2017), tal como descrito nas secções seguintes.

O CCHFV é mantido naturalmente por transmissão vertical e horizontal usando vários géneros de ixodídeos como vetores e uma variedade de animais domésticos e selvagens como hospedeiros. As infeções ao homem ocorrem por mordedura de ixodídeo ou exposição a sangue ou outro fluido de um animal ou humano infetado. Há vários géneros de ixodídeos que se comportam como reservatório (para manutenção natural do vírus) e vetor do vírus (para a sua transmissão) (www.cdc.org), mas os ixodídeos do género *Hyalomma* são normalmente apontadas como as principais fontes de infeção humana (Bente *et al.*, 2013).

Foi identificado em 1944 na Península da Crimeia (Lani *et al.*, 2014) e isolado de um paciente em 1956 em Kisangani, Congo (Simpson *et al.*, 1967; Lani *et al.*, 2014), mas hoje em dia apresenta uma distribuição geográfica desde a China ao sul da Ásia, do Médio Oriente ao sudeste da Europa e em quase todo o continente Africano (Bente *et al.*, 2013) (Figura 1.3).

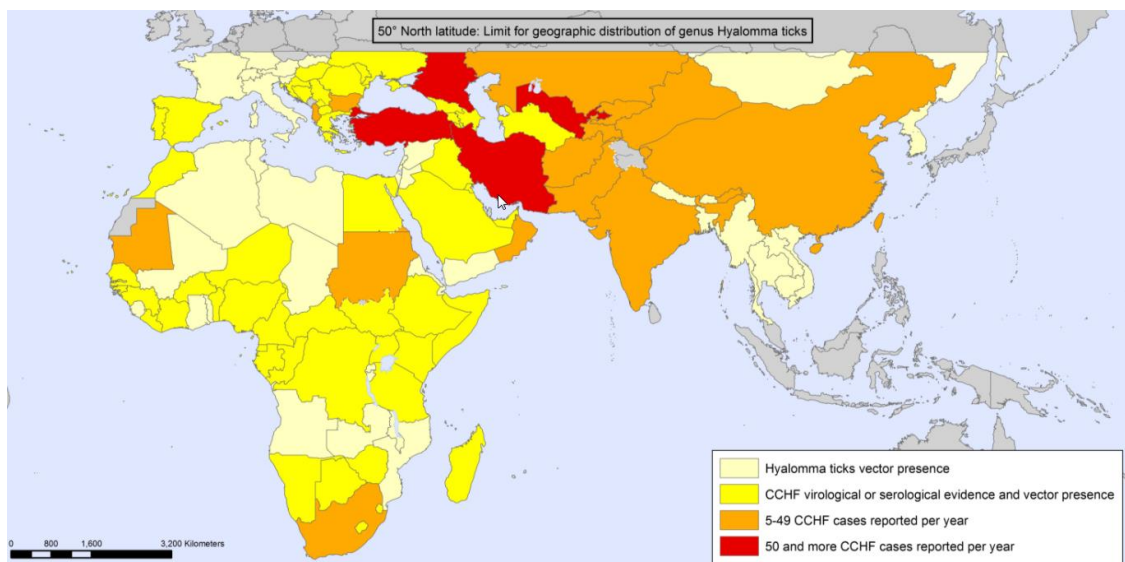


Figura 1.3: Distribuição geográfica da CCHF de acordo com informação da Organização Mundial de Saúde, 2017. (Adaptado de <http://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congo-haemorrhagic-fever/en/>).

A detecção deste vírus na península ibérica remonta a 1985 (Filipe *et al.*, 1985), e na última década vários casos foram reportados em Espanha. A detecção de RNA de CCHFV de ixodídeos da espécie *Hyalomma lusitanicum* em Cáceres em 2010 (Estrada-Penã *et al.*, 2012), a notificação de dois casos autóctones humanos em Ávila em 2016 (Negredo *et al.*, 2017), e o estudo recente onde foi estudado o genoma do CCHFV detetado em *Hyalomma lusitanicum* em Cáceres em 2014 (Cajimat *et al.*, 2017), permitiram concluir que este vírus circula em Espanha, tendo já sido identificado em quatro províncias. Estes vírus partilham ancestralidade direta com vírus circulantes na África Ocidental, dos quais divergiram há cinco décadas e que estão presentes em Espanha há muito tempo (Cajimat *et al.*, 2017). Face a isto, e dada a proximidade do nosso país, é de extrema importância a vigilância em rotina dos vetores capazes de transmitir CCHFV.

Apesar da relevância clínica de algumas das doenças causadas por vírus transmitidos por ixodídeos, ainda assim deverá existir um número de infeções por TBV que são negligenciadas ou mal diagnosticadas em vertebrados. Por outro lado, um número considerável de tiovírus ou não são patogénicos, ou apresentam baixa virulência para os vertebrados (Hubálek *et al.*, 2012). Finalmente, há a considerar os resultados dos estudos mais recentes em que as abordagens do domínio da metagenómica se têm combinado com as potencialidades de geração de grandes quantidades de dados genómicos que decorrem do uso das tecnologias de sequenciação da nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*). Nestes casos, tem sido possível descrever inúmeros genomas virais, e se é certo que alguns destes estão claramente associados a vírus causadores de doença, como são os casos dos vírus *Bourbon* (Kosoy *et al.*, 2015), *Heartland* (McMullan *et al.*, 2012, Savage *et al.*, 2013) ou o vírus do Síndrome de Febre Severa com Trombocitopenia (*Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus/SFTSV*; Xu *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2011), noutras casos, o potencial patogénico dos vírus cujos genomas são descritos permanece por esclarecer.

Taxonomicamente, os TBV compõem um grupo heterogéneo de vírus. O único TBV de genoma de DNA é classificado na família *Asfarviridae*. Por seu turno, os vírus com genoma de RNA são incluídos em oito famílias virais: *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Nyamiviridae* (ordem *Mononegavirales*), *Nairoviridae*, *Phenuiviridae* e *Peribunyaviridae*, as três últimas incluídas na recentemente criada ordem *Bunyavirales* (Kazimírová *et al.*, 2017).

### 1.3. Ordem *Bunyvirales*

Até à última revisão de classificação por parte do grupo de estudo do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), datada de 2016, aquilo que hoje é reconhecido como Ordem *Bunyvirales* correspondia, em grande parte, à até então designada família *Bunyviridae*, a qual incluía cinco géneros (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) de vírus com invólucro e genoma trissegmentado de RNA de polaridade negativa (Plyusnin *et al.*, 2011). A revisão taxonómica em questão (ICTV, 2017) foi desencadeada pelo facto de, até recentemente, cerca de 530 buniavírus (i.e., presumíveis membros desta família) não poderem ser incluídos em qualquer destes cinco géneros por falharem alguns dos critérios exigidos. Por exemplo, a análise filogenética das sequências proteicas e nucleotídicas dos vírus *South Bay*, ou *Wùhàn millipede virus 2* (Li *et al.*, 2015; Tokarz *et al.*, 2014) claramente os associava aos demais buniavírus, apesar de ambos estes vírus apresentarem genomas de RNA bissegmentados. Numa situação análoga, também se verificou que vários vírus de plantas com genoma com mais de três segmentos se associavam filogeneticamente a este grupo de vírus (Elbeaino *et al.*, 2009; van Poelwijk *et al.*, 1997; Briese *et al.*, 2016). Por outro lado, este mesmo tipo de abordagem (reconstrução de filogenias) permitiu constatar que novos vírus que foram sendo descobertos nos últimos anos formavam, nas árvores filogenéticas de buniavírus, agrupamentos genéticos divergentes dos demais, ou correspondiam a linhagens genéticas solitárias.

Face a isto, em 2016 o grupo de estudo da família *Bunyviridae* do ICTV iniciou uma reorganização da classificação da mesma, passando a família ao estatuto de Ordem, nascendo assim o *taxon Buyvirales*. Esta criação deverá melhor refletir as relações evolutivas dos vários buniavírus, classificando os vírus não designados nos géneros existentes, estabelecendo novos géneros para englobar vírus que não podiam ser incluídos nos cinco géneros já estabelecidos, aceitando os emaravírus e tenuivírus como membros desta Ordem, e promovendo uma reorganização taxonómica da família para incluir os novos membros.

A atual ordem *Bunyvirales* é, então, composta por 9 famílias e 13 géneros (Briese *et al.*, 2016), e os TBVs estão incluídos em três famílias (*Nairoviridae*, *Phenuiviridae* e *Peribunyaviridae*). O género *Orthonairovirus* da família *Nairoviridae*, é composto por 12 espécies, 10 das quais são TBVs, incluindo o vírus CCHFV (tabela 1.1).



Tabela 1.1 Classificação dos vírus da ordem *Bunyvirales*, com genoma RNA, transmitidos por ixodídeos, causadores de doenças em humanos e animais (Adaptado de Kazimírová *et al.*, 2017).

Ordem	<i>Bunyvirales</i>			
Família	<i>Nairoviridae</i>		<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Phenuiviridae</i>
Gênero	<i>Orthonairovirus</i>	<i>Nairovirus</i> <b>putativos</b>	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Phlebovirus</i>
Espécies	*Burana orthonairovirus *Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus (CCHFV) *Dera Ghazi Khan Orthonairovirus *Dugbe orthonairovirus *Hazara orthonairovirus *Hughes orthonairovirus *Keterah orthonairovirus *Nairobi sheep disease virus orthonairovirus (NSDV) *Qalyub nairovirus *Sakhalin nairovirus	*Artashat virus *Burana virus *Chim virus *Geran virus *Nàyun tick virus *South Bay virus *Tamdy virus	*Bakau orthobunyavirus *Estero Real orthobunyavirus *Tete orthobunyavirus	*Severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus (SFTSV) *Uukuniemi phlebovirus

#### 1.4. *Phlebovirus*

O gênero *Phlebovirus*, recentemente recolocado pelo ICTV na família *Phenuiviridae* da Ordem *Bunyvirales*, é composto por 10 espécies virais: *Bujaru*, *Candiru*, *Chilibre*, *Frijoles*, *Punta Toro*, *Rift Valley fever*, *Salehabad*, *Sandfly fever Naples*, *SFTS*, e *Uukuniemi flebovírus*. O vírus tipo deste gênero é o *Rift Valley fever*.

Todos estes vírus formam viriões (partículas virais infecciosas) de forma esférica e tamanho a variar entre os 80-120 nm de diâmetro, e possuem um invólucro lipídico com projeções heterodiméricas das glicoproteínas codificadas pelo genoma viral (Gn e Gc), o qual envolve os complexos de ribonucleoproteínas constituídos por RNA genômico viral, pela proteína da nucleocápside (N) e pela polimerase viral (proteína L) (Guu *et al.*, 2012). A morfologia da superfície dos flebovírus é distinta na medida em que os arranjos glicoproteicos formam pequenas subunidades redondas com uma cavidade central (Labuda *et al.*, 2004). O genoma viral é composto por três segmentos de RNA, de cadeia simples e polaridade negativa, sendo designados de S (*small*), M (*medium*) e L (*large*) (Figura 1.4).

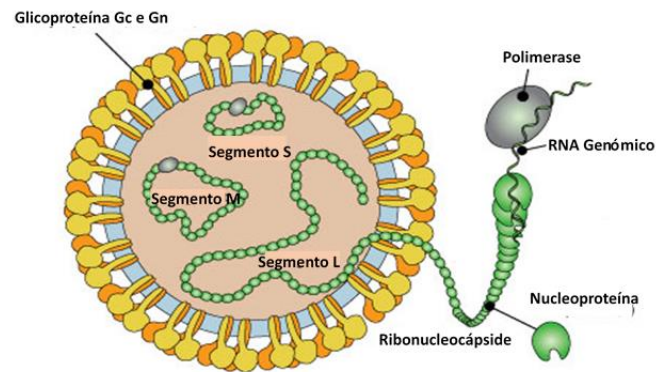


Figura 1.4 Representação esquemática do virião característico dos vírus do gênero *Phlebovirus*. (adaptado de Viralzone)

Todos os segmentos genômicos que compõem o genoma dos flebovírus apresentam nos extremos 5' e 3' sequências nucleotídicas complementares, que dão origem a estruturas circulares após o emparelhamento destas mesmas.

O segmento S codifica a proteína N e uma proteína não estrutural (NSs). Este segmento apresenta uma organização genética *ambisense* (codificação em ambos-os-sentidos), na medida em que a sequência nucleotídica que codifica a NSs se encontra num gene (gene NS) com polaridade oposta à do gene N, que codifica a proteína N.

Por sua vez, o segmento M codifica uma poliproteína precursora que é processada nas glicoproteínas Gn e Gc do envoltório. Nalguns vírus deste gênero, este segmento codifica ainda numa proteína não estrutural (NSm) ainda com função desconhecida (Labuda *et al.*, 2004).

O segmento L codifica a proteína L (Polimerase de RNA dependente de RNA) que é responsável pela transcrição e replicação do genoma viral (Barroso, 2014).

A entrada na célula do hospedeiro ocorre através da ligação dos viriões a receptores específicos localizados na superfície celular (embora estes permaneçam por identificar na grande maioria dos casos), entrando nas células por endocitose (Figura 1.5). No compartimento endossômico, o pH ácido leva à fusão do envoltório viral com a membrana do endossoma, processo este mediado pela proteína Gc, e do qual resulta a libertação das

ribonucleoproteínas virais para o citoplasma. No citoplasma, a transcrição dos genes virais é mediada pela polimerase viral (proteína L) dando origem a moléculas de RNA mensageiro não poliadeniladas, mas com *cap* que servem de matriz para a síntese das proteínas virais. A proteína L, no citoplasma, remove nucleótidos à extremidade 5' dos RNA mensageiros celulares e usa estas sequências para iniciar a transcrição viral, processo este conhecido por *cap-snatching*.

As proteínas N e L, após serem traduzidas, são responsáveis pela síntese de RNA antígenômico que vão servir de matriz ao RNA genômico e do RNA mensageiro que codifica as NSs. A replicação do genoma viral ocorre no citoplasma em associação com vesículas membranares. A tradução dos transcritos virais ocorre quer nos ribossomos livres do citoplasma, quer nos que estão associados ao retículo endoplasmático (glicoproteínas do invólucro) (Figura 1.5). Gn e Gc são processadas por uma protease celular e são conduzidas para o aparelho de Golgi onde ocorre a montagem das partículas virais, a qual inclui a aquisição de um invólucro por gemulação para o interior das cisternas do Golgi.

Os viriões são libertados no exterior da célula por exocitose. A montagem dos viriões pode, ainda, ocorrer em associação com a membrana citoplasmática, e deste modo, a gemulação das partículas virais é coincidente com a sua libertação para o meio extracelular (Barroso, 2014).

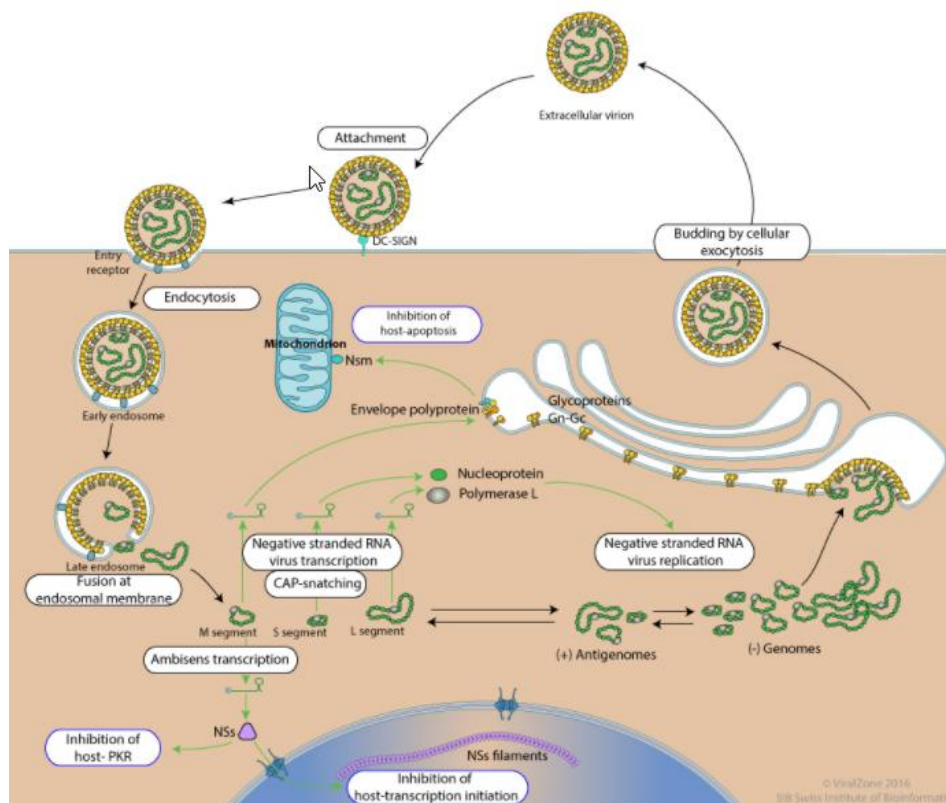


Figura 1.5: Ciclo replicativo dos vírus do género *Phlebovirus* (Adaptado de <http://viralzone.expasy.org>).

Os Flebovírus foram tradicionalmente classificados em dois grupos distintos. Num deles estão incluídos os vírus transmitidos por flebótomos e mosquitos, e no outro os vírus transmitidos por ixodídeos (Liu *et al.*, 2003).

Muitos dos flebovírus com impacto na saúde humana são transmitidos ao Homem por mosquitos ou flebótomos. Os surtos causados por vírus como o das febres dos flebótomos da Sicília (*sandfly fever Sicilian virus*, SFSV), ou de Nápoles (*sandfly fever Naples virus*, SFNV), foram primeiramente documentados durante a segunda guerra mundial em Itália, mas atualmente apresentam uma distribuição por toda a bacia do Mediterrâneo. As infeções provocadas por estes vírus apresentam como sintomatologia febre, vómitos, diarreia e dores de cabeça.

O vírus Toscana (TOSV), também transmitido por flebótomos, foi isolado em Itália em 1971 e apresenta atualmente uma distribuição por países mediterrânicos tais como Espanha, França, Grécia, Portugal (Santos *et al.*, 2007) e Turquia. Este vírus apresenta tropismo para o sistema Nervoso Central, e pode causar meningite e encefalite (Ehrnest *et al.*, 1985, Dionisio *et al.*, 2003, Charrel *et al.*, 2005). A espécie tipo que representa este género é o vírus da febre do vale do *Rift* (RVFV), o qual, tendo sido isolado no Quénia em 1930, atualmente apresenta uma distribuição por todo o continente Africano e Península da Arábia. O vírus pode ser transmitido por mais de 30 espécies de mosquitos incluindo mosquitos *Aedes aegypti* que também podem transmitir outros patogénicos humanos tais como os vírus Zika, da Febre Amarela e da dengue. As manifestações clínicas em humanos vão desde uma simples síndrome gripal até cegueira, meningoencefalite, febre hemorrágica e morte (Bird *et al.*, 2009).

Os vírus Arrábida e Alcubé foram recentemente isolados no Sul de Portugal (Amaro *et al.*, 2015 e 2016), o que indica a circulação de diferentes linhagens genéticas de flebovírus transmitidos por flebótomos no nosso país.

Por seu lado, as infeções provocadas por flebovírus transmitidos por ixodídeos não foram, em termos históricos, consideradas como ameaças à saúde pública, mas esta perceção rapidamente foi alterada com a identificação dos vírus *Heartland*, *SFTSV* e *Bhanja*, que se espalharam amplamente e causaram surtos em humanos com sintomatologia severa (Matsuno *et al.*, 2013, Hornak *et al.*, 2016).

Os flebovírus transmitidos por ixodídeos encontram-se distribuídos, de acordo com as análises filogenéticas das sequências virais, em quatro grupos genéticos distintos: SFTS/Heartland, Bhanja, Uukuniemi e Kaisodi (Figura 1.6; Matsuno *et al.*, 2015).

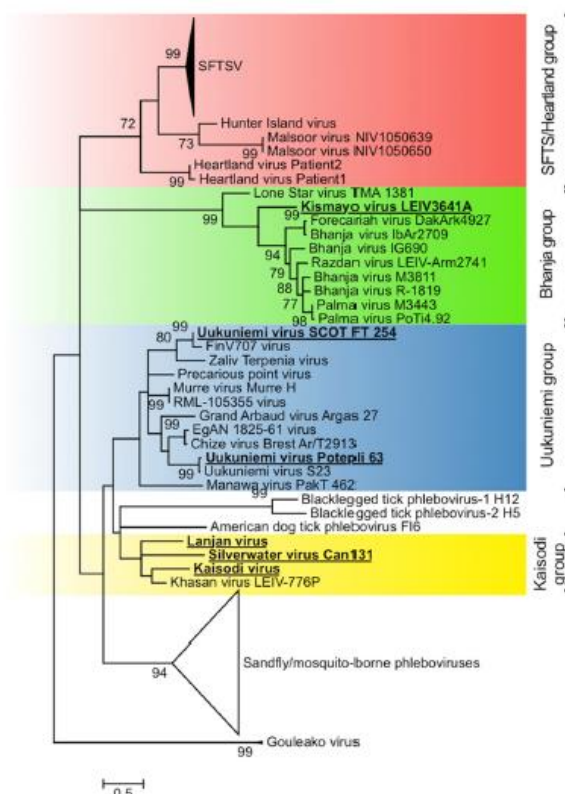


Figura 1.6: Árvore filogenética de TBV, baseada na sequência de fragmentos de 500 pb amplificados por RT-PCR do segmento L (adaptado de Matsuno *et al.*, 2015).

O SFTSV, representativo do grupo com o mesmo nome, foi inicialmente reportado em 2007 em 79 pacientes, na província de Hanan, na China. É considerado um vírus emergente e dá origem a doença em humanos, causando mortalidade em mais de 30% dos casos de infecção (Xu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

O vírus *Heartland*, identificado em dois agricultores no Missouri, Estados Unidos da América, e posteriormente isolado de ixodídeos (McMullan *et al.*, 2012, Savage *et al.*, 2013) é filogeneticamente relacionado com o vírus SFTSV.

Por seu turno, o vírus Bhanja, representativo do grupo Bhanja, foi já isolado de ixodídeos do género *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (Hubálek, 2009), no sul e centro da Ásia, em África e no sul da Europa (Matsuno *et al.*, 2013). Este vírus foi já associado quer a doenças em animais (ovelhas, cabras e bovinos), quer a doença febril com compromisso do sistema nervoso central em

humanos (Palacios *et al.*, 2013). Em 1992, o vírus Palma foi isolado de ixodídeos da espécie *Haemaphysalis punctata* recolhidos de bovinos numa quinta no sul de Portugal e é geneticamente relacionado com o vírus Bhanja (Filipe *et al.*, 1994, Labuda *et al.*, 2004). Este vírus ainda não foi associado a doenças em animais e humanos.

O vírus Uukuniemi é o vírus representativo do grupo Uukuniemi e foi originalmente isolado em 1960 de um lote (*pool*) de ixodídeos da espécie *Ixodes ricinus* do sul da Finlândia, sendo posteriormente reportado o seu isolamento noutras locais distribuídos pela Escandinávia, pelo leste e centro da Europa, Azerbaijão e Ásia central (Palacios *et al.*, 2013). Em geral, o grupo Uukuniemi não é considerado como um problema de saúde pública, embora anticorpos contra alguns destes vírus tenham já sido detetados em estudos serológicos realizados com base em amostras humanas. Foram já reportados no sul da Rússia três casos de infeção, envolvendo sintomatologia caracterizada por febre, cefaleias, dores musculares e articulares.

Estudos serológicos dirigidos à pesquisa de anticorpos anti-flebovírus dos grupos Bhanja e Uukuniemi indicam que os humanos e outros animais podem ser infetados com estes vírus, mas dada a sua distribuição geográfica e os sintomas atípicos que as suas infeções provocam, é provável que a sua circulação seja difícil de detetar (Matsuno *et al.*, 2015). A diversidade genética entre estes grupos de flebovírus é uma razão pela qual estes vírus têm sido negligenciados. Existe uma identidade partilhada entre as sequências de nucleótidos dos genomas dos vírus dos grupos SFTS e Bhanja variando entre os 40 a 50%, enquanto esta identidade baixa para cerca de 35% entre estes dois grupos e o grupo Uukuniemi (Matsuno *et al.*, 2013).

O grupo Kaisodi foi proposto por Matsuno *et al.* (2015) após análise filogenética das sequências parciais do segmento L (obtidas após a sua amplificação por RT-PCR usando oligonucleótidos de sequência degenerada) para incluir os vírus Kaisodi, Silverwater, Lanjan e Khasan que formam um novo grupo com o ancestral comum com o grupo Uukuniemi (Figura 1.6).

Nos últimos anos, temos assistido a descobertas de novos genomas virais nos mais diversos hospedeiros colhidos de todo o tipo de biótopos, alguns deles produtos diretos dos estudos de metagenómica, que nos têm trazido uma nova perspetiva da biodiversidade viral. No trabalho de Tokarz *et al.* (2014) foram identificados três novos flebovírus; dois deles foram designados *blacklegged tick Phlebovirus* (BTPV-1 e BTPV-2) e foram detetados em *Ixodes*

*scapularis*, outro foi designado *American dog tick Phlebovirus* e foi identificado em carraças da espécie *Dermacentor variabilis* (Figura 1.6). Na análise genómica do *blacklegged tick Phlebovirus* foram identificados dois segmentos (S e L) distintos, o que sugeria a presença de múltiplos genótipos deste vírus. Através da sequenciação dos produtos de RT-PCR foi possível confirmar dois genótipos daquilo que parece ser o mesmo vírus (as variantes BTPV-1 e BTPV-2), os quais apresentam 12% e 15% de divergência nas sequências de nucleótidos dos seus segmentos S e L, respetivamente. Não foi possível, neste trabalho, identificar o segmento genómico M destes vírus.

O trabalho de Xia *et al.* (2015) é o primeiro a utilizar as abordagens de tipo NGS para estudar a diversidade viral ou descobrir novos vírus em ixodídeos *Rhipicephalus spp.* colhidos na China, permitindo um melhor conhecimento do viroma destes ixodídeos. No trabalho de Li *et al.* (2015) foram sequenciados por NGS vírus de genoma RNA de polaridade negativa a partir de mais de 70 espécies de artrópodes, tendo sido identificados 112 novos vírus e analisadas as relações filogenéticas entre eles. Neste trabalho foi ainda reportado diferentes estruturas genómicas, apresentando-se alguns genomas virais como segmentados, e sugerindo que estes possam ser facilmente trocados entre vírus diferentes e criar novas combinações genéticas viáveis. Foram também encontrados genomas não segmentados e circulares. Esta diversidade genética sugere que os artrópodes têm um papel importante na evolução destes vírus (genoma de RNA) permitindo inclusivé que vírus diferentes possam trocar informação genética entre si no decurso de co-infecções.

No trabalho de Bouquet *et al.* (2017) a combinação abordagem metagenómica/NGS permitiu a análise do viroma de ixodídeos da espécie *Dermacentor occidentalis*, recolhidos entre 2011 e 2014 na Califórnia (E.U.A.), tendo sido identificados 2 novos bunivírus classificados nos géneros *Nairovirus* e *Phlebovirus*, os quais se encontravam presentes em 20-91% dos ixodídeos, dependendo do ano da colheita. Esta elevada prevalência sugere que estes vírus podem ser *endossimbiontes*, mas mais estudos são necessários para perceber se serão ou não, patogénicos para os hospedeiros vertebrados, em especial para o Homem, ou qual o seu papel na ecologia dos ixodídeos.

No sul da Europa vários trabalhos foram já publicados com identificação de novos flebovírus em ixodídeos colhidos na Grécia (Papa *et al.*, 2016, 2017), e em Portugal (Pereira *et al.*, 2016). Este último trabalho refere a identificação de sequências genómicas correspondentes a parte do segmento L destes vírus, identificados em ixodídeos dos géneros

*Rhipicephalus*, *Hyalomma* e *Dermacentor*, colhidos no sul do país, tendo este sido o ponto de partida para esta tese. A nossa pesquisa foi feita no centro e norte de Portugal, Ilha de São Miguel (Açores), Ilha da Madeira e na região oeste de Espanha. A pesquisa destes vírus por RT-PCR apresenta-se como um método simples, rápido, barato e eficaz uma vez que utiliza *primers* desenhados para a RdRp, região mais conservada destes vírus.

### **1.5. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo principal a deteção e caraterização de vírus do género *Phlebovirus* associados a ixodídeos colhidos em Portugal e Espanha. Após a caraterização das suas sequências genómicas foi feita uma análise bioinformática para reconstrução de filogenias, uma caracterização das sequências proteicas deduzidas e uma avaliação da diversidade genética das sequências virais encontradas.



# **Material e Métodos**



## 2. Material e Métodos

### 2.1. Distribuição da população de ixodídeos recolhida

Entre fevereiro de 2016 e junho de 2017 foram recolhidos 1993 ixodídeos, sendo que 773 foram colhidos diretamente da vegetação e 1220 de animais. A distribuição geográfica dos ixodídeos recolhidos abrangeu 13 distritos de Portugal continental, os Açores e a Madeira, assim como quatro províncias de Espanha, tal como esquematicamente representado na Figura 2.1.

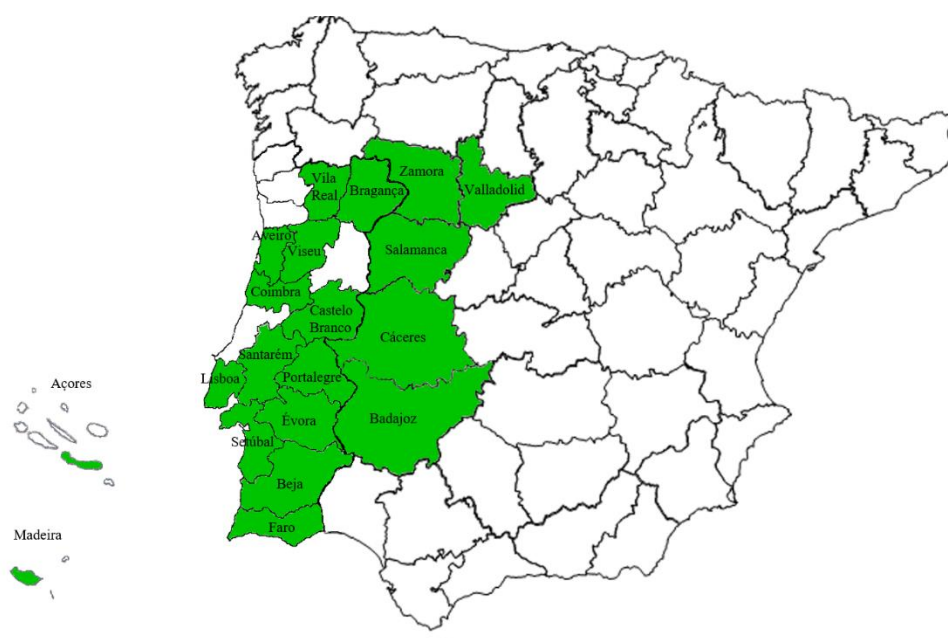


Figura 2.1: Distribuição geográfica da população de ixodídeos recolhida. As regiões assinaladas a verde indicam aquelas onde foram colhidos ixodídeos dos quais vieram a ser amplificadas e analisadas, no decurso deste estudo, sequências de flebovírus.

### 2.2. Técnicas de colheita de ixodídeos na vegetação e nos hospedeiros

A colheita de ixodídeos da vegetação foi efetuada pela técnica de arrastamento da bandeira (*flagging*), que consiste na passagem de uma flanela branca com 1 m por 1 m sobre a vegetação. De 20 em 20 m, aproximadamente, verificou-se visualmente a bandeira, tendo os ixodídeos sido recolhidos com recurso a uma pinça, e temporariamente conservados num tubo de plástico.

A colheita de ixodídeos dos hospedeiros foi feita recorrendo a pinça ou manualmente com a utilização de luvas. Os ixodídeos foram divididos por tubos dependendo do animal de origem.

Em todas as colheitas foi preenchida uma Ficha de Campo (Anexo 1), com registo do número da colheita, hora, data, local, tipo de captura efetuada e de variáveis ambientais tais como a temperatura, humidade, precipitação, visibilidade e vento.

De forma a manter os ixodídeos vivos, durante o transporte até ao laboratório (IHMT), procurou-se criar condições de humidade favoráveis, pelo que os espécimes capturados foram acondicionados com vegetação em tubos secos com tampa perfurada para assegurar a entrada de ar, tendo sido transportados em mala térmica a 4 °C. Nos casos em que não foi possível o transporte imediato para o IHMT, os ixodídeos foram colocados em *RNAlater*® (Ambion, E.U.A.) e conservados a 4 °C.

### **2.3. Identificação e armazenamento dos ixodídeos**

Os ixodídeos foram identificados mediante observação de caracteres morfológicos ao microscópio (Mónica Nunes, comunicação pessoal), e recorrendo a chaves taxonómicas (Estrada-Peña *et al*, 2004; Pérez-Eid, 2006). Depois de identificados ao nível da espécie, foi preenchida uma ficha de identificação de ixodídeos (Anexo 2) com a descrição da respetiva espécie e estágio de desenvolvimento (larva, ninfa, adulto), género (macho, fêmea) tendo ainda as fêmeas engorgitadas sido separadas das demais. De seguida foram colocados em tubos *Eppendorf*® de acordo com a colheita, espécie, género, estágio de crescimento e preservadas a -80 °C.

### **2.4. Colheita e caracterização de ixodídeos da vegetação**

A colheita e caracterização de ixodídeos a partir da vegetação foi feita de maio a outubro de 2016 e de março a maio de 2017, nos distritos de Aveiro, Coimbra, Faro, Lisboa, Santarém, Setúbal e Vila Real e, também, na província Espanhola de Salamanca, correspondendo a diversas espécies, géneros e estádios de desenvolvimento (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Caracterização, por distrito, das colheitas de ixodídeos efetuadas na vegetação.

Distrito	Espécie de Ixodídeo	Estádios de Desenvolvimento				Total
		Larva	Ninfa	Adultos		
				Macho	Fêmea	
Aveiro	<i>Ixodes ricinus</i>			1	1	2
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			22	45	67
	Total			23	46	<b>69</b>
Coimbra	<i>Dermacentor marginatus</i>			1		1
	Total			1		<b>1</b>
Faro	<i>Hyalomma lusitanicum</i>			1		1
	Total			1		<b>1</b>
Lisboa	<i>Dermacentor marginatus</i>			1		1
	<i>Haemaphysalis Punctata</i>	18		7	7	32
	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	1	1	28	26	67
	<i>Ixodes ricinus</i>	376	115	14	1	506
	<i>Ixodes frontalis</i>		4			4
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1		1		2
	Total	396	131	51	34	<b>612</b>
Santarém	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			1	7	8
	Total			1	7	<b>8</b>
Setúbal	<i>Dermacentor marginatus</i>			2	3	5
	<i>Ixodes ricinus</i>			1		1
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			12	15	27
	Total			15	18	<b>33</b>
Vila Real	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			26	22	48
	Total			26	22	<b>48</b>
Salamanca (Espanha)	<i>Dermacentor marginatus</i>			1		1
	Total			1		<b>1</b>
	Total	<b>396</b>	<b>131</b>	<b>119</b>	<b>127</b>	<b>773</b>

## 2.5. Colheita e caracterização de ixodídeos dos hospedeiros

A colheita e caracterização de ixodídeos em hospedeiros foi feita de fevereiro de 2016 a junho de 2017 em Portugal, nos distritos de Aveiro, Beja, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Faro, Lisboa, Portalegre, Setúbal e Viseu, na ilha de São Miguel (nos Açores), na ilha da Madeira e, ainda, nas províncias Espanholas de Badajoz, Cáceres, Salamanca, Valladolid e Zamora (Tabela 2.2).

Foram recolhidos ixodídeos de animais domésticos (bovinos, cães, cavalos, gatos, ovelhas), animais silváticos (javalis, lebres, ouriços, raposas e texugos), aves residentes e migratórias e foram, ainda, recolhidos ixodídeos em humanos. As três posturas de ovos foram recolhidas de fêmeas recolhidas em Proença-a-Nova (Castelo Branco), Arouca (Aveiro) e Cadaval (Lisboa).

Tabela 2.2: Caracterização, por distrito, das colheitas de ixodídeos efetuadas em hospedeiros.

Distrito	Espécie de Ixodídeo	Estádio de Desenvolvimento					Total
		Larva	Ninfa	Adulto			
				Macho	Fêmea	Fêmea Engorgitada	
Aveiro	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>					4	4
	Total					4	<b>4</b>
Beja	<i>Dermacentor marginatus</i>		1	1			2
	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	1	14				15
	<i>Hyalomma marginatum</i>		1				1
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			6	3	1	10
	Total	1	16	7	3	1	<b>28</b>
Castelo Branco	<i>Dermacentor marginatus</i>			3			3
	<i>Ixodes ricinus</i>					4	4
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		32	45	18	15	110
	Total		32	48	18	19	<b>117</b>
Coimbra	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			1	1	1	3
	Total			1	1	1	<b>3</b>
Évora	<i>Dermacentor marginatus</i>				1		1
	<i>Hyalomma marginatum</i>			7		1	8
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			4	5	1	10
	Total			11	6	2	<b>19</b>
Faro	<i>Hyalomma lusitanicum</i>		17	1			18
	<i>Hyalomma marginatum</i>			1		2	3
	<i>Ixodes ricinus</i>				2	1	3
	<i>Ixodes frontalis</i>				1		1
	<i>Rhipicephalus boophilus</i>					3	3
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		1	31	9	31	72
	Total		18	33	12	37	<b>100</b>
Lisboa	<i>Ixodes ricinus</i>				2		2
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		34	27	2	16	79
	Total		34	27	4	16	<b>81</b>
Portalegre	<i>Hyalomma marginatum</i>				1		1
	<i>Rhipicephalus bursa</i>			12	2	5	19
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			7	9	4	20
	Total			19	12	9	<b>40</b>
Setúbal	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>					10	10
	Total					10	<b>10</b>
Viseu	<i>Rhipicephalus bursa</i>				1		1
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			2	9	8	19
	Total			2	10	8	<b>20</b>
Ilha de São Miguel (Açores)	<i>Ixodes hexagonus</i>					1	1
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		4	37	8	11	60
	Total		4	37	8	12	<b>61</b>
Ilha da Madeira (Madeira)	<i>Haemaphysalis Punctata</i>			5		8	13
	<i>Ixodes hexagonus</i>			1	1	11	13
	<i>Ixodes ricinus</i>		3	7	15	20	45
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		76		1		77
	Total		79	13	17	39	<b>148</b>
Badajoz (Espanha)	<i>Dermacentor marginatus</i>			4	2	4	10
	<i>Rhipicephalus boophilus</i>		1				1
	Total		1	4	2	4	<b>11</b>
Cáceres (Espanha)	<i>Dermacentor marginatus</i>			1			1
	<i>Hyalomma marginatum</i>			10	3	2	15
	<i>Rhipicephalus bursa</i>			3		1	4
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			5	5	1	11
	Total			19	8	4	<b>31</b>

<b>Salamanca (Espanha)</b>	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	5	4		9		
	<i>Hyalomma marginatum</i>	16	5		21		
	<i>Rhipicephalus bursa</i>		2		2		
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	57	28	23	108		
	Total	78	39	23	<b>140</b>		
<b>Valladolid (Espanha)</b>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1	1	1	3		
	Total	1	1	1	<b>3</b>		
<b>Zamora (Espanha)</b>	<i>Dermacentor marginatus</i>	4		23	27		
	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	52	9	6	67		
	<i>Hyalomma marginatum</i>	1	164	49	75	289	
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	1	2	2	3	8	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9	2	2	13		
	Total	2	231	62	109	<b>404</b>	
	<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>186</b>	<b>531</b>	<b>203</b>	<b>299</b>	<b>1220</b>

## 2.6. Maceração dos ixodídeos e preparação das amostras para extração de ácidos nucleicos

Os ixodídeos foram previamente divididos em 92 *pools* de acordo com a colheita, a espécie, o género e o estágio de desenvolvimento (Anexo 3). A cada tubo *Eppendorf*<sup>®</sup> contendo um *pool* independente de ixodídeos, foi adicionado 250 µl de Tampão fosfato-salino (PBS) suplementado com 4% de Albumina de Bovino (BSA), fração V, (*NZYTech*, Portugal), e a maceração dos espécimes nele contidos foi feita manualmente, forçando a desintegração mecânica dos ixodídeos com pontas de micropipetas. Após a maceração foi adicionado 200 µl adicionais de PBS a cada tubo seguida de homogeneização (inversão), tendo estes sido sujeitos a uma centrifugação durante 10 minutos a 4 °C e 12.000 g.

Recolheu-se a totalidade do volume do sobrenadante (aproximadamente 400 µl), o qual veio a ser dividido em dois tubos *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1,5 ml, um destinado à extração de ácidos nucleicos, o outro para eventual isolamento de vírus em linhas celulares mantidas em cultura. Os tubos, contendo a fração líquida do macerado, foram armazenados a -80°C até uso posterior.

Para a extração dos ácidos nucleicos foram retirados 200 µl de sobrenadante aos quais se adicionou *NZYol* (*NZYtech*, Portugal), que consiste numa solução monofásica de compostos de tiocianato e fenol, que atuam rompendo as células e as partículas virais sem que os ácidos nucleicos (celulares ou virais) sejam degradados. Assim, a cada tubo com 200 µl de sobrenadante de maceração foi adicionado 600 µl de *NZYol*, agitando-se durante 2 minutos até à emulsão completa da mistura, seguida de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, para ocorrer a desnaturação das proteínas e se promover a separação entre a fase aquosa e fenólica, foi adicionado 150 µl de clorofórmio

à mistura, os tubos foram agitados e incubados 3 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma centrifugação de 15 minutos a 4°C e 12.000 g. Após a centrifugação ocorre a separação da mistura em duas fases: fase orgânica, e fase aquosa (onde se encontra o RNA). Assim, a fase aquosa foi recolhida para extração de RNA e a interfase e fase orgânica para extração de DNA.

### **2.6.1. Extração de DNA**

À fase orgânica e interfase obtidas tal como acima se descreve foi adicionado 500 µl de etanol 100%, misturado por inversão, seguindo-se uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente (para ocorrer a precipitação do DNA), com posterior centrifugação a 4 °C, 10.000 g durante 10 minutos para recuperar o DNA como um sedimento sólido. O sobrenadante, que contém a fração proteica, foi descartado enquanto que o sedimento foi lavado duas vezes por adição de 500 µl de solução citrato de sódio 0,1 M em 10% etanol, incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos com agitação periódica e centrifugado a 4 °C, 10.000 g durante 10 minutos. Após as lavagens, foi descartado o sobrenadante e adicionado ao sedimento 500 µl de etanol a 75% para remover sais e outras impurezas hidrossolúveis, a qual ocorreu no decurso de uma incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos com agitação periódica. Por fim, o DNA foi recolhido por centrifugação a 4 °C, 10.000 g durante 10 minutos. O etanol foi retirado com uma micropipeta e o DNA seco sob vácuo a 45 °C (*Concentrator 5301, Eppendorf, Alemanha*). O sedimento foi ressuspenso em 100 µl de solução tamponada Tris-EDTA (TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) suplementada de RNaseA (50 µg/ml) e colocado a 55 °C durante 10 minutos de modo a remover a maior parte do RNA contaminante. Finalmente, o DNA extraído foi quantificado utilizando o *Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.)* e conservado a -20 °C.

### **2.6.2. Extração de RNA**

Após recolher a fase aquosa (obtida após adição de *NZYol* a alíquotas de macerado de ixodídeos/separação de fases por centrifugação; ver secção 2.6) para um novo tubo, e para ocorrer a precipitação do RNA, foi adicionado a esta 500 µl de isopropanol puro. Os tubos, após 15 minutos a temperatura ambiente, foram centrifugados a 4 °C, 11.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o sedimento lavado com 600 µl de etanol a 75%



para remover sais e outras impurezas hidrossolúveis. Após uma agitação em vortex, os tubos foram novamente centrifugados a 4 °C, 11.000 g durante 5 minutos. O etanol foi removido com uma micropipeta e o RNA seco sob vácuo a 45 °C (*Concentrator 5301*, Eppendorf, Alemanha). O RNA foi ressuspensão em 30 µl de água livre de nucleases, de seguida quantificado utilizando o *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.), e finalmente conservado a -80 °C.

## **2.7. Síntese, por Transcrição Reversa (RT), de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total**

Para a síntese de cDNA, por transcrição reversa de RNA total, foi utilizado o sistema comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante, e tal como se descreve abaixo.

Em gelo, foram adicionados a microtubos livres de nucleases 10 µl *NZYRT 2× Master Mix*, 2 µl *NZYRT Enzyme Mix*, e 1 µl de um inibidor não específico de RNases (igualmente disponibilizado). A quantidade de RNA utilizada foi calculada de maneira a que a respetiva concentração final, por reação, não viesse a ser superior a 5 µg/µl, e o volume de água tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato) foi calculado para perfazer o volume total de 20 µl. Após uma agitação suave, os tubos foram colocados no termociclador T100 (Bio-Rad, E.U.A.) e submetidos a uma incubação a 25 °C durante 10 minutos (para uma extensão inicial das moléculas de cDNA a partir dos oligómeros de sequência aleatória utilizados como iniciadores/*primers* da polimerização nucleotídica), seguida de 30 minutos a 50 °C (temperatura em que a transcriptase reversa utilizada tem o máximo da sua atividade, mantendo-se, no entanto, o RNA desnaturado). No final, foi feita uma inativação da enzima a 85 °C durante 5 minutos e, de seguida, os tubos foram colocados em gelo. A cada tubo foi adicionado 1 µl de *NZY RNase H* (produzida em *E. coli*) e os tubos foram incubados a 37 °C durante 20 minutos. As amostras de cDNA que foram utilizadas para a reação de polimerização em cadeia (PCR) permaneceram temporariamente a 4 °C (ainda no termociclador). As amostras de cDNA que não foram utilizadas no dia da síntese de cDNA foram conservadas a -20 °C para futura utilização.

## 2.8. Amplificação de sequências genómicas de *Phlebovirus*

### 2.8.1. Amplificação de sequências genómicas de *Phlebovirus* (Segmento L) por *multiplex-PCR*

A amplificação parcial do gene da polimerase viral (segmento L) de *Phlebovirus* foi feita adaptando numa abordagem de *multiplex-PCR*, a técnica e as condições originalmente descritas por Matsuno *et al.*, 2015, e anteriormente utilizadas e testadas por Pereira *et al.*, 2016. Os oligonucleótidos (*primers*) utilizados encontram-se descritos na tabela 2.3. Na técnica *multiplex-PCR* são adicionados mais do que um conjunto de *primers* na mesma mistura de PCR.

Tabela 2.3: *Primers* utilizados para amplificação de sequências genómicas de *Phlebovirus*, tal como descrito por Matsuno *et al.*, 2015.

Par de <i>primers</i>	<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')
ppL1	TBPVL2759F	CAGCATGGIGGICTIAGAGAGAT
	TBPVL3267R	TGIAGIATSCCYTGCATCAT
ppL2	HRT-GL2759F	CAGCATGGIGGIYTIAGRGAAATYTATGT
	HRT-GL3276R	GAWGTRWARTGCAGGATICCYTGCATCAT

I: Inosina, R: A ou G, S: C ou G; Y: C ou T; W: A ou T.

Para um volume final de reação de amplificação de 30 µl, utilizou-se 15 µl de *NZYTaq 2X Green Master Mix* (NZYTech, Portugal), 5 µl de cDNA (produto da transcrição reversa, (secção 2.7)), 2 µl de cada *primer* ppL1 e ppL2 (20 pmol de cada *primer*) e 2 µl de água livre de nucleases. A preparação das misturas de reação foi feita, em gelo, numa câmara de fluxo laminar, fazendo uma *mastermix* com todos os componentes da reação, com exceção do cDNA. Foi sempre realizado em cada sessão de PCR um controlo negativo, em que o volume de ácidos nucleicos foi substituído por H<sub>2</sub>O. A reação de amplificação decorreu num termociclador T100 (Bio-Rad, E.U.A.) com as condições descritas na tabela 2.4. Quando ocorre amplificação do segmento L é obtido um amplicão com cerca de 500 pares de bases (pb).

Tabela 2.4: Condições de PCR para detecção do segmento L de *Phlebovirus*.

Etapa	Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	95	2 minutos
Desnaturação	50	95	30 segundos
Hibridação		55	90 segundos
Extensão		72	45 segundos
Extensão final	1	72	5 minutos

### 2.8.2. Amplificação de sequências genômicas de *Phlebovirus* (Segmento S) por *multiplex-PCR*

A amplificação parcial do segmento S de *Phlebovirus* foi feita adaptando as condições descritas por Lambert *et al.*, 2009. Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: *Primers* utilizados para amplificação parcial do segmento S de *Phlebovirus*, tal como descrito por Lambert *et al.*, 2009.

Par de primers	Primer	Sequência (5' → 3')
Phlebo 1	Phlebo <i>forward</i> 1	TTTGCTTATCAAGGATTTGATGC
	Phlebo <i>reverse</i> 1	TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT
Phlebo 2	Phlebo <i>forward</i> 2	TTTGCTTATCAAGGATTTGACC

Para um volume final de reação de amplificação de 30 µl, utilizou-se 15 µl de *NZYTaq 2X Green Master Mix* (NZYTech, Portugal), 5 µl de cDNA (produto da transcrição reversa), 3 µl de cada *primer Phlebo 1* e *Phlebo 2* (30 pmol de cada *primer*) e 1 µl de água livre de nucleases. A preparação das misturas de reação foi feita, tal como descrito anteriormente (secção 2.8.1). A reação de amplificação decorreu num termociclador T100 (Bio-Rad, E.U.A.) com as condições descritas na tabela 2.6. Após a amplificação com sucesso das sequências desejadas, é esperado um amplicão de 370 pares de bases (pb).

Tabela 2.6: Condições de PCR para amplificação do segmento S de *Phlebovirus*, tal como descrito por Lambert *et al.*, 2009.

Etapa	Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	95	2 minutos
Desnaturação	55	94	30 segundos
Hibridação		55	1 minuto
Extensão		72	2 minutos
Extensão final	1	72	10 minutos

## 2.9. Amplificação de fragmentos de DNA de CCHFV por *nested*-PCR

Todas as amostras analisadas incluindo espécimes da espécie *Hyalomma marginatum* e *Hyalomma lusitanicum* foram testadas, por *nested*-PCR, para a presença de genoma de CCHFV. Todo o procedimento foi feito num laboratório BSL3.

Na técnica de *nested*-PCR são feitos dois PCR consecutivos. No primeiro PCR são utilizados *primers* para amplificar uma região mais abrangente do genoma, denominados de *primers* externos. No segundo PCR, é utilizado um novo conjunto de *primers* específicos da sequência-alvo, denominados de *primers* internos, e a amostra é o produto do primeiro PCR.

A amplificação do fragmento do genoma CCHFV foi feita adaptando as condições descritas por Figueira, 2016. Os *primers* utilizados para os dois PCR encontram-se descritos na Tabela 2.7 e são complementares a sequências do fragmento S de CCHFV.

Tabela 2.7: *Primers* utilizados para amplificação de sequências genómicas de CCHFV (Figueira, 2016).

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Ampliação (pb)
CCHFVsf1	TGGTGYAGGGARTTTGTCAAAGG	580
CCHFVsr1	CCAAAGCAAACWCCCATYTCCT	
CCHFVsf2	GCAACAGGYCTTGCCAARCTTGCAGA	439
CCHFVsr2	GCRGGRTGCATGTARATYCTGTT	

R: A ou G, Y: C ou T; W: A ou T.

Para um volume final de reação de amplificação de 30 µl, utilizou-se 15 µl de *NZYTaq 2X Green Master Mix* (NZYTech, Portugal), 5 µl de cDNA, produto da transcrição reversa, 5

$\mu\text{l}$  de cada *primer* CCHFVsf1 e CCHFVsr1 (50 pmol/ $\mu\text{l}$  de cada *primer*). Para o segundo PCR foi utilizado como amostra 5  $\mu\text{l}$  do produto do primeiro PCR e os *primers* CCHFVsf2 e CCHFVsr2 (50 pmol/ $\mu\text{l}$  de cada *primer*). A preparação das misturas de reação foi feita tal como descrito anteriormente (secção 2.8.1). A reação de amplificação das duas reações de PCR decorreu num termociclador T100 (Bio-Rad, E.U.A.) com as condições descritas na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Condições de PCR para deteção do segmento S de CCHFV.

Etapa	Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	95	2 minutos
Desnaturação	40	94	30 segundos
Hibridação		50	1 minuto
Extensão		72	45 segundos
Extensão final	1	72	5 minutos

## 2.10. Eletroforese em gel de agarose

Para analisar os resultados do PCR e verificar se ocorreu amplificação de qualquer um dos fragmentos de DNA pretendidos, foi promovida a separação dos produtos eventualmente amplificados por eletroforese em gel de agarose.

Numa eletroforese em gel de agarose os ácidos nucleicos que se encontram carregados negativamente (grupos fosfato) vão migrar por aplicação de um campo elétrico. A agarose forma uma matriz porosa através da qual as moléculas migram a uma velocidade dependente do tamanho (pares de bases), da conformação das moléculas, da concentração de agarose utilizada, do campo elétrico aplicado (V/cm) e do tampão utilizado para a eletroforese.

Para preparar o gel de agarose a 1% (p/v) adicionou-se 0,5 g de agarose a 50 ml de tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). De forma a visualizar os fragmentos de DNA foi adicionado brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) que se vai intercalar nas duplas cadeias de DNA apresentando fluorescência, na presença de radiação ultravioleta (UV), permitindo desta forma a sua visualização. Em cada gel foram analisados 3  $\mu\text{l}$  de cada um dos produtos PCR e 2  $\mu\text{l}$  do marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal). Para

verificar a presença de bandas foi utilizado o equipamento *Gel-Doc XR* (Bio-Rad, E.U.A.) onde o gel foi exposto a radiação UV que permitiu visualizar e fotografar o gel.

## 2.11. Clonagem de Produtos de PCR com o vetor plasmídico *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega, E.U.A.)

Alguns dos fragmentos de DNA resultantes de PCR, depois de purificados, foram clonados com o vetor plasmídico *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega, E.U.A.).

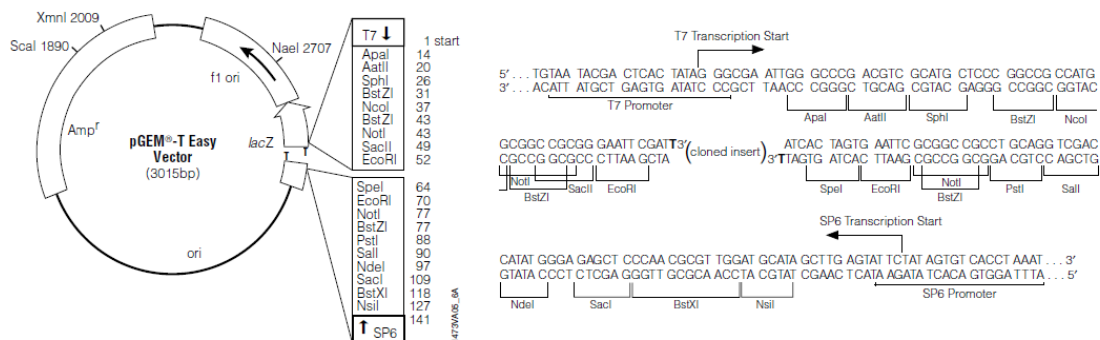


Figura 2.2: Mapa do vetor plasmídico *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*. À direita, parte da sequência dos locais de reconhecimento das enzimas de restrição (adaptado de [www.promega.com](http://www.promega.com)).

O vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*, que tem um tamanho de 3015 pb, é disponibilizado comercialmente sob a forma linear. Nas extremidades 3' de ambas as cadeias apresenta resíduos de timidina (Figura 2.2). A presença destes resíduos no local de inserção evita a recircularização do vetor e aumenta a eficiência de ligação dos produtos PCR obtidos com *Taq* polimerase que adicionem um resíduo adenosina à extremidade 3' do DNA sintetizado. A região de clonagem múltipla está flanqueada pelos promotores de transcrição T7 e SP6, e está localizada na porção do gene que codifica a porção  $\alpha$  da enzima da  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*). Quando ocorre a inserção de um fragmento de DNA nesta região, a sequência de *lacZ* é interrompida, e a  $\beta$ -galactosidase fica inativa, permitindo a seleção de recombinantes que surgem como colônias brancas em meio contendo IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) e X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido). A  $\beta$ -galactosidase ativa é capaz de hidrolisar o substrato X-gal e origina colônias azuis. A região

de clonagem múltipla do vetor é flanqueada por locais de reconhecimento de enzimas de restrição, entre as quais a *EcoRI*, que possibilita, por hidrólise enzimática, recuperar o fragmento de DNA inserido (Figura 2.2). A análise dos produtos de hidrólise enzimática destes clones foi efetuada por comparação da mobilidade dos fragmentos obtidos à do marcador de massa molecular Lambda *Hind* III.

### **2.11.1. Ligação do vetor plasmídico às moléculas de DNA**

A mistura de ligação usando *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems* (Promega, E.U.A.) foi preparada por adição de 5 µl de Tampão 2X, 1 µl de *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* linearizado (correspondendo aproximadamente a 25 ng de vetor linearizado), 1 µl de enzima T4 DNA ligase (3 U Weiss/µL), 3 µl do produto de PCR e água desionizada até perfazer um volume final de 10 µl. A mistura foi incubada durante a noite a 4°C.

### **2.11.2. Preparação e transformação de células competentes de *Escherichia coli***

A técnica de transformação foi feita com base no protocolo modificado de Chung *et al.*, 1989.

Uma colónia isolada de *Escherichia coli NovaBlue* (Novagen, Alemanha) foi inoculada, em condições de assepsia, em 3 ml de meio LB (meio Luria-Bertani (também apelidado de Lysogeny broth): 10 g/l peptona, 5 g/l extrato de levedura, 10 g NaCl/l). Depois de homogeneizar em vortex, seguiu-se uma incubação durante a noite, a 37°C, num agitador orbital a 200 rpm. Da cultura inicial foram retirados 150 µl que foram inoculados em 15 ml de meio de cultura LB. O crescimento da cultura, que ocorreu com agitação a 180 rpm e a 37 °C, foi seguido através da leitura da densidade ótica medida a 600 nm num espectrofotómetro. Quando a cultura atingiu uma densidade entre 0,4 – 0,5, foi de imediato colocada em gelo e em seguida centrifugada a 3.000 g, 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 500 µl de solução TSS (*Transformation and Storage Solution*) fria.

A 5 µl da mistura de ligação (secção 2.11.1) foi adicionado 100 µl da suspensão celular. Misturou-se suavemente e colocou-se em gelo durante 30 minutos. Para facilitar a transformação, as amostras foram sujeitas a um choque térmico, em que os tubos foram colocados em banho-maria, a 42 °C durante 90 segundos seguidos de 5 minutos em gelo.

De seguida foi adicionado 900 µl de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*; Hanahan, 1983), e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora.

A suspensão bacteriana (200 µl) foi plaqueada com o auxílio de pérolas de vidro estéreis em placas de *Petri* com meio sólido LB seletivo, com AMP\_XGal\_IPTG (100 ng/ml, 80 ng/ml, 20 ng/ml), seguida de uma incubação durante a noite a 37 °C.

### **2.11.3. Extração do plasmídeo por lise alcalina**

O protocolo de extração de DNA envolve lise celular, com libertação de todo o material intracelular, e purificação do DNA plasmídico (Sambrook *et al*, 2012).

Das colónias que se formaram, durante a noite, sobre caixas de meio seletivo (ver 2.11.2) foram repicadas colónias bacterianas isoladas brancas e azuis (para controlo) para meio líquido (3 – 5 ml de meio LB) suplementado com 100 µl/ml de ampicilina. Os tubos foram colocados num agitador orbital, a 37 °C, permitindo, assim, o crescimento bacteriano durante a noite.

Com uma pipeta estéril, e perto da chama, foi pipetado para um tubo *Eppendorf*<sup>®</sup> 2 ml de suspensão bacteriana. Foi de seguida feita uma centrifugação a 13.000 g durante 1 minuto para ocorrer a sedimentação celular. O meio de cultura (sobrenadante) foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 250 µl de solução TEG (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 % glucose). Para promover a lise celular, foi adicionado 250 µL de tampão de lise (0,2 M NaOH, 1,5% SDS) e os tubos gentilmente invertidos. As amostras foram colocadas imediatamente em gelo, durante 5 minutos. Para promover a neutralização das amostras foi adicionado 250 µl de acetato de potássio (3M) e os tubos foram suavemente invertidos. As amostras foram de seguida centrifugadas a 13.000 g durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo *Eppendorf*<sup>®</sup> de 1,5 ml. Para ocorrer a precipitação dos ácidos nucleicos foi adicionado 700 µl de isopropanol e centrifugado a 13.000 g durante 25 minutos. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 250 µl de etanol a 70% para permitir dissolver sais e moléculas orgânicas hidrossolúveis que também precipitaram. Foi feita uma centrifugação a 13.000 g durante 5 minutos, de seguida o sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e os tubos foram secos em vácuo, a 45 °C durante 5 minutos no *Concentrator 5301* (*Eppendorf*, Alemanha). O sedimento foi dissolvido em 50 µl de TE suplementado com 50 µg/ml de RNase. As amostras foram colocadas durante 30 minutos num banho a 37 °C para degradar possível RNA presente na amostra.



Foi feita um eletroforese num gel de agarose a 0,8 % onde se aplicou 2 µl de cada uma das amostras e que permitiu perceber em quais dos plasmídeos recombinantes extraídos o fragmento teria sido inserido (cerca de 3500 pb). Numa primeira fase, as moléculas de DNA plasmídico extraídas de clones de *E. coli* independente foram separadas num gel de agarose a 1%, onde a sua migração foi comparada à de um plasmídeo (*pJET™ 1.2/blunt*; *Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.) de tamanho idêntico ao vetor *pGEM T-Easy*. Nesta abordagem, as moléculas derivadas de *pGEM T-Easy* contendo insertos de DNA exógeno corresponderam àquelas que apresentaram uma migração retardada relativamente à do plasmídeo usado como controlo. A verificação da presença destes insertos de DNA foi efetuada por hidrólise enzimática.

#### **2.11.4. Hidrólise de DNA plasmídico com a endonuclease de restrição *EcoRI***

As amostras positivas, as que apresentaram uma banda de cerca de 3500 pb, foram posteriormente digeridas com a enzima *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.). Para tal, adicionou-se 1 µl de DNA, 0,4 µl de enzima *EcoRI* (10 U/µl), 2 µl de tampão *EcoRI* concentrado 10x e 16,6 µl de água livre de nucleases. A mistura ficou a incubar durante a noite a 37 °C. No dia seguinte, os produtos de hidrólise enzimática de DNA foram analisados através da sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%, onde a sua migração relativa foi analisada comparativamente à de marcador de massa molecular (*Thermo Fisher Scientific*, E.U.A.).

## **2.12. Purificação de DNA para Sequenciação**

### **2.12.1. Purificação de DNA, produto de PCR**

As amostras em que se verificou a presença de banda foram purificadas com o sistema comercial *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*, (*Zymo Research Europe*, Alemanha) adaptando as instruções do fabricante.

Os fragmentos de DNA correspondentes aos produtos de amplificação por PCR de sequências virais foram separados por eletroforese em gel de agarose. As bandas foram extraídas do gel com recurso a uma lamela e a secção de agarose removida do gel foi pesada. A esta adicionou-se 3 vezes o volume de tampão *Agarose Dissolving Buffer* (ADB). O tubo foi incubado a 65 °C até todo o gel de agarose estar derretido. A amostra foi

transferida para uma coluna *Zymo-Spin* colocada dentro de um tubo coletor limpo e centrifugada a 10.000 g durante 1 minuto. A restante amostra (agarose dissolvida) que permaneceu no tubo coletor foi colocada novamente na coluna e submetida a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Nesta fase a amostra que ficou no tubo foi descartada.

Posteriormente efetuaram-se dois ciclos de lavagem da coluna, por adição de 200 µl de *DNA Wash Buffer* seguido de uma centrifugação a 10.000 g durante 30 segundos e descartando o líquido que ficou no tubo coletor. Para a eluição foi colocado sob a coluna um tubo novo de 1,5 ml e adicionou-se 11 µl de *DNA Elution Buffer* para eluição do DNA fixo às colunas de purificação. Passados 3 minutos (para promover uma completa hidratação da coluna) foi feita uma centrifugação a 10.000 g durante 1 minuto para recolha do DNA purificado.

Os rendimentos de purificação obtidos foram avaliados através da observação das moléculas purificadas em gel de agarose a 1% após eletroforese, tendo sido analisado 1 µl da amostra de DNA purificado (à qual se adicionou 1 µl de *Loading Buffer* para facilitar a colocação da amostra no gel e visualizar o seu percurso durante a migração). Como marcador de massa molecular foi utilizado 2 µl de *NZYDNA Ladder VI* (*NZYTech*, Portugal). O DNA obtido foi enviado para sequenciação tal como descrito na secção 2.13.

### **2.12.2. Purificação do DNA plasmídico**

Para purificar o DNA plasmídico extraído por lise alcalina (descrito na secção 2.11.3), ajustou-se o volume da solução contendo o DNA para 100 µl e adicionou-se igual volume de LiCl 10M para precipitar algum RNA/proteínas contaminantes. Após uma agitação os tubos foram colocados a -20 °C durante 15 minutos seguido de uma centrifugação a 14.000 g durante 10 minutos. Depois de recuperar o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 200 µl de isopropanol para precipitar o DNA, foi feita uma agitação seguida por uma incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida os tubos foram centrifugados a 14.000 g durante 30 minutos, cuidadosamente invertidos para retirar o máximo de líquido, e adicionado 500 µl de etanol a 70% para lavar o DNA. Após fazer uma agitação no vortex, foi feita uma nova centrifugação a 14.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com uma pipeta, o sedimento de DNA foi seco em vácuo, a 45 °C (*Concentrator 5301*, *Eppendorf*, Alemanha) e ressuspensão em 20 µl de tampão Tris-

HCl (10 mM, pH 8). Para verificar o rendimento da purificação efetuada, 1 µl de cada uma das amostras foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

### 2.13. Sequenciação de DNA

As amostras foram enviadas para a empresa STAB VIDA (Portugal), e foram sequenciadas pelo método inicialmente descrito por *Sanger* (*Sanger et al.*, 1977). Este método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado. Após ocorrer a desnaturação do fragmento de DNA ocorre hibridação com um *primer* e são adicionados os ddNTPs (didesoxirribonucleótidos) que terminam a reação de polimerização. Os *primers* utilizados para a sequenciação dos fragmentos de DNA obtidos por PCR foram HRT-GL3276R e HRT-GL2759F. Para a sequenciação dos fragmentos de DNA clonados foram utilizados *primers* universais complementares da região que flanqueia a zona de clonagem do plasmídeo *pGEM-T Easy*.

### 2.14 Análise Bioinformática das sequências obtidas das reações de sequenciação

Os resultados das reações de sequenciação, disponibilizados sob a forma de cromatogramas, foram analisados com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.2.6 (Hall, 1999). Quando, para uma mesma amostra, vieram a ser obtidos resultados de sequenciação múltiplos (incluindo sequenciação em ambos os sentidos) foi construído um *contig* único com a ferramenta deste software *CAP (Contig Assembly Program Manager)*.

A pesquisa de sequências homólogas disponíveis nas bases de dados de acesso público foi levada a cabo utilizando BLASTn, nas opções *megablast* (procura de sequências semelhantes) e *discontiguous megablast* (para procura de homólogos mais distantes do ponto de vista genético) através do servidor NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A construção de alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas e aminoácidos foi feita com o programa MAFFT, versão 7 (Kato, *et al.*, 2002, 2013), usando a opção G-INS-i (Kato *et al.*, 2013). A edição dos alinhamentos foi feita com a opção GUIDANCE2 (Sela *et al.*, 2015), selecionando colunas com níveis de confiança superiores a 0,9.

As árvores filogenéticas foram construídas por três métodos: *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Verosimilhança (*Maximum Likelihood* – ML), (usando o programa Mega 6; Tamura *et al.*, 2013) e análise Bayesiana (usando a aplicação informática MrBayes 3.2.6, Ronquist *et al.*, 2012). As análises de NJ foram levadas a cabo usando matrizes de distâncias genéticas corrigidas com a fórmula de Kimura (modelo K2-P), enquanto nas abordagens de reconstrução filogenética usando ML ou uma abordagem *bayesiana*, foi assumido como modelo evolutivo o indicado pelo programa Mega 6, assumindo o critério de *Akaike*. A consistência das árvores de NJ e ML obtidas foi investigada por *bootstrap*, usando 1000 amostragens aleatórias dos dados iniciais.

As sequências nucleotídicas obtidas neste estudo foram depositadas na base de dados GenBank/EMBL/DDBJ com os números de acesso LC374218 a LC374286.

# **Resultados e Discussão**



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização da população de ixodídeos recolhida

O objetivo deste estudo foi investigar a eventual presença de *Phlebovirus* em ixodídeos, através da deteção de sequências parciais do segmento genómico viral que codifica a respetiva polimerase de RNA, tendo como ponto de partida o trabalho iniciado por Pereira *et al.* (2016). Uma vez que o rastreio anteriormente efetuado se restringia ao sul de Portugal, foi nossa intenção estender as colheitas de ixodídeos ao centro e norte de Portugal, Ilha de São Miguel (arquipélago dos Açores), Ilha da Madeira (arquipélago da Madeira) e região oeste-centro de Espanha (província da Estremadura).

Foram recolhidos 1993 ixodídeos, sendo que 773 (31,8% do total de espécimes colhidos) foram colhidos diretamente da vegetação, distribuindo-se, em número e espécie da seguinte forma: 8 *Dermacentor marginatus* (1,0%), 32 *Haemaphysalis punctata* (4,1%), 68 *Hyalomma lusitanicum* (8,8%), 4 *Ixodes frontalis* (0,5%), 509 *Ixodes ricinus* (65,8%), e 152 *Rhipicephalus sanguineus* (19,7%) (Figura 3.1).

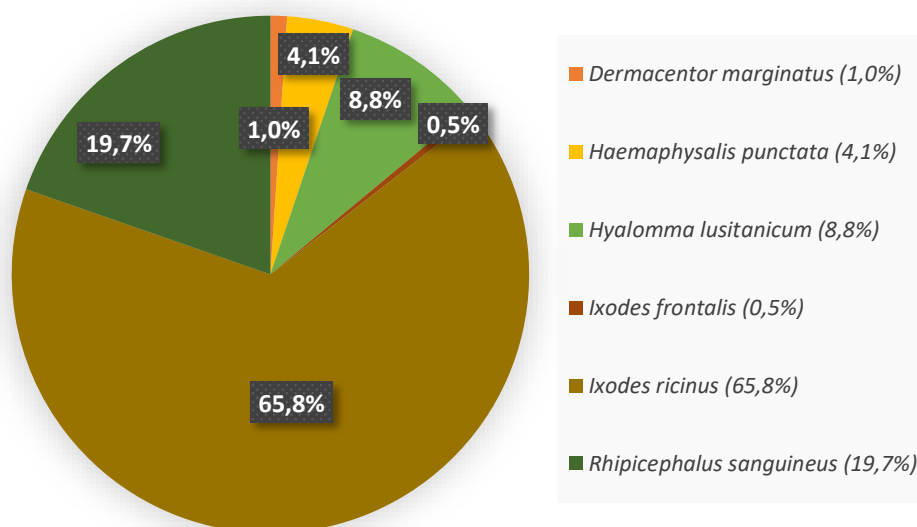


Figura 3.1: Distribuição da população de ixodídeos recolhida da vegetação de acordo com as suas espécies.

Por outro lado, 1220 exemplares (correspondendo a 61,2% da amostra total) foram colhidos de animais (Fig. 3.2). Estes incluíram 44 *Dermacentor marginatus* (3,6%), 13 *Haemaphysalis punctata* (1,1%), 109 *Hyalomma lusitanicum* (8,9%), 338 *Hyalomma marginatum* (27,7%), 1 *Ixodes frontalis* (0,1%), 14 *Ixodes hexagonus* (1,1%), 54 *Ixodes ricinus* (4,4%), 4 *Rhipicephalus boophilus* (0,3%), 34 *Rhipicephalus bursa* (2,8%) e 609 *Rhipicephalus sanguineus* (49,9%).

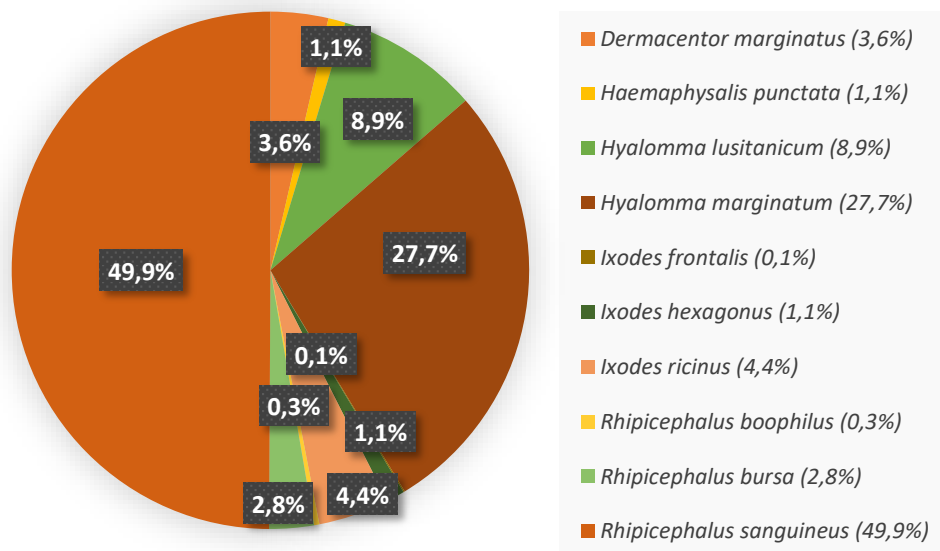


Figura 3.2: Distribuição da população de ixodídeos recolhida de animais de acordo com as suas espécies.

Em termos de estádios de desenvolvimento foram recolhidas da vegetação 396 larvas (51,2%), 131 ninfas (16,9%), 119 espécimes adultos machos (15,4%) e 127 espécimes adultos fêmea (16,4%), enquanto que nos animais foram recolhidos 1 larva (0,1%), 186 ninfas (15,2%), 531 espécimes adultos machos (43,5%), 502 espécimes adultos fêmeas (41,1%), 299 das quais (24,5%) se encontravam engorgitadas (Fig. 3.3). Foram também examinadas 3 posturas de ovos.



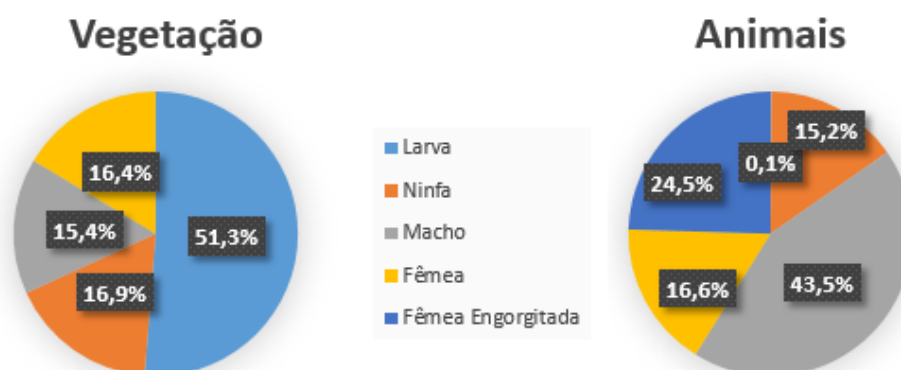


Figura 3.3: Caracterização das colheitas de ixodídeos da vegetação e animais em termos de fase de desenvolvimento.

### 3.2. Caracterização da população de ixodídeos estudada

Com base no conjunto de ixodídeos recolhidos, e tendo selecionado para inclusão neste estudo outros ixodídeos obtidos no âmbito de outros estudos realizados no IHMT, foram analisadas um total de 746 espécimes e três posturas ovos (Fig. 3.4). Estes incluíram 3 *Dermacentor reticulatus* (0,4 %), 5 *Ixodes hexagonus* (0,7 %), 12 *Haemaphysalis punctata* (1,6 %), 15 *Rhipicephalus bursa* (2,0 %), 44 *Dermacentor marginatus* (5,9 %), 69 *Hyalomma lusitanicum* (9,3 %), 98 *Hyalomma marginatum* (13,1 %), 132 *Ixodes ricinus* (17,7 %) e 368 *Rhipicephalus sanguineus* (49,3 %). As três posturas de ovos provinham de fêmeas *Rhipicephalus sanguineus*.

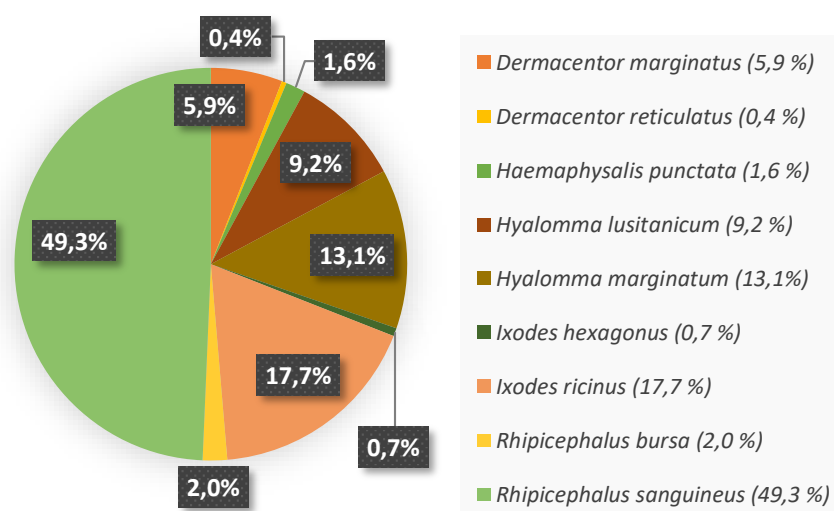


Figura 3.4: Distribuição da população de ixodídeos estudada de acordo com as suas espécies.

Dos 746 ixodídeos estudados 221 (29,6%) foram recolhidos da vegetação e 525 (70,6%) de hospedeiros vertebrados. Foram testadas 3 posturas de ovos, 100 larvas (13,4%), 120 ninfas (16,1%), 259 machos (34,7 %), e um total de 267 fêmeas (35,8%), 43 das quais apresentavam evidências claras de uma refeição sanguínea recente (5,8%).

Finalmente, os 746 ixodídeos estudados foram organizados em 92 grupos (doravante designados *pools*) de acordo com a região geográfica onde foi feita a colheita, bem como a espécie, o género e o estágio de desenvolvimento dos espécimes em questão. Cada *pool* veio a incluir entre 1 a 100 espécimes (Anexo 3), sendo que, quando analisados espécimes adultos, esse número variou entre 1 e 21. Foram analisadas 18 *pools* (19,6%) de ixodídeos recolhidos da vegetação e 74 *pools* de ixodídeos recolhidos de animais (80,4%). Após a extração do RNA total dos espécimes analisados (Secção 2.6.2), na sequência da sua fragmentação mecânica, e uma vez que o genoma dos vírus que estamos a pesquisar é de RNA, foi feita uma reação de transcrição reversa (secção 2.7), seguida por uma reação de amplificação de sequências genómicas virais em um (*Phlebovirus*) ou dois passos (para o caso específico da deteção de CCHFV) (secção 2.8).

### **3.3. Amplificação de sequências genómicas virais**

#### **3.3.1. Amplificação de sequências genómicas de *Phlebovirus* (Segmento L) por *multiplex*-PCR**

A amplificação parcial do gene da polimerase viral (segmento L) de *Phlebovirus*, região mais conservada do genoma destes vírus, foi feita adaptando uma abordagem de *multiplex*-PCR, técnica originalmente descrita por Matsuno *et al.* (2015), e anteriormente utilizada por Pereira *et al.* (2016). Por se tratar de um protocolo de PCR que combina a utilização de *primers* de sequência degenerada e apenas uma etapa de amplificação, os 40 ciclos de amplificação inicialmente descritos foram aumentados para 50. Esta alteração do protocolo original (para além da combinação dos 2 pares de *primers* numa única reação, i.e., convertendo a estratégia de rastreio descrita por Matsuno *et al.* (2015) numa abordagem de *multiplex*) traduziu-se na maioria das situações, pela obtenção de uma quantidade suficiente

de produto de amplificação que permitiu a sua direta purificação a partir de um gel de agarose, a qual, por sua vez, permitiu a sequenciação direta dos mesmos. A amplificação de seqüências genómicas virais foi efetuada usando como matriz cDNA preparado a partir de cada um dos 92 *pools* (Anexo 3).

Os produtos amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, tendo sido considerados resultados de amplificação positiva todos aqueles que revelavam um produto de amplificação com cerca de 500 pb (tal como representado na Figura 3.5). Tal como acima referido, estes produtos foram purificados e enviados para sequenciação (Stabvida). Em alternativa, quando (i) a quantidade de produto de amplificação impedia a sua purificação, pois o rendimento não era compatível com a obtenção de resultados de sequenciação de análise clara ou (ii) quando se pretendeu analisar a variabilidade genética na população de produtos de amplificação obtidos, a sequenciação foi precedida da clonagem dos amplicões purificados num vetor comercial (ver secção 2.11). As seqüências nucleotídicas obtidas foram editadas manualmente, e através da ferramenta BLASTn foi feita uma pesquisa de homologias para confirmar a identidade das seqüências como pertencendo ao genoma de flebovírus.

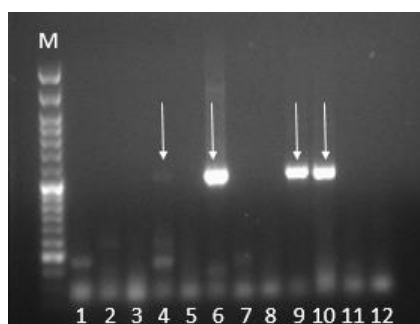


Figura 3.5: Deteção de seqüências de flebovírus por RT-PCR em extratos de RNA preparados a partir de ixodídeos. No gel estão representadas as reações de amplificação parcial de seqüências do segmento L de flebovírus referentes à análise de 11 das amostras incluídas neste estudo (pistas 1 a 11). M- Marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder VI* (*NZYTech*, Portugal); pista 12- controlo negativo da reação de PCR. As amostras indicadas (R44, pista 4; R46, pista 6; R55, pista 9 e R56, pista 10) revelaram a presença de genomas virais pela observação do fragmento esperado (indicado pelas setas verticais).

Nas 92 *pools* estudadas foi detetada a presença de genomas de flebovírus (ou seja, a reação de amplificação revelou amplicões, com aproximadamente 500 pb (o tamanho esperado)), em 45 *pools*, correspondendo a 48,9% das amostras analisadas. Das 18 *pools* estudadas de ixodídeos recolhidos na vegetação 8 foram consideradas positivas (44,4%), e das 74 *pools* de ixodídeos recolhidos nos animais 37 foram consideradas positivas (50%). Do total das

*pools* consideradas positivas para a presença de genomas virais, 1 correspondia a espécie *Hyalomma lusitanicum* (2,2%), 1 a *Hyalomma marginatum* (2,2%), 3 a *Rhipicephalus bursa* (6,7%) e 40 a *Rhipicephalus sanguineus* (88,9%). A elevada frequência de detecção para Flebovírus em *Rhipicephalus bursa e sanguineus* é concordante com os resultados anteriormente obtidos por Pereira *et al.* (2016), sendo que no nosso trabalho apenas 3 *pools* de *Rhipicephalus bursa* foram analisadas (e todas foram consideradas positivas) (Figura 3.6). Das 92 *pools* analisadas, 48 (52%) correspondiam a espécimes de *Rhipicephalus bursa e sanguineus*, sendo que os resultados obtidos podem ser devidos ao viés da amostragem, por outro lado, estes resultados são muito superiores aos obtidos por Papa *et al.* (2016), em que ao testarem 210 *pools* de ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus*, obtiveram resultados positivos em apenas 6 (2,6 %).

Embora os ixodídeos do género *Haemaphysalis* sejam conhecidos como importantes vetores de tiovírus (Yu *et al.*, 2011, Elliott e Brennan, 2014, Li *et al.*, 2015, Papa *et al.*, 2016) no nosso trabalho as 2 *pools* estudadas revelaram-se negativas para a presença do genoma de *Phlebovirus*.

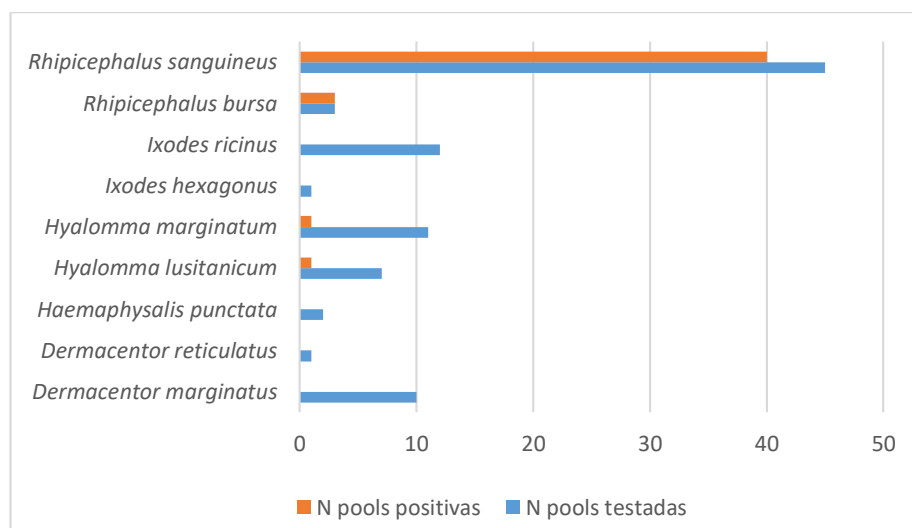


Figura 3.6: Análise comparativa da distribuição de *pools* positivas para a presença de sequências de flebovírus em função do nº total de *pools* testadas por espécies de ixodídeos estudada. A azul estão apresentadas o número de *pools* estudadas/espécie de ixodídeo e a laranja o número de *pools* positivas para *Phlebovirus*/espécie de ixodídeo.

Foram obtidos resultados positivos de amplificação, usando como ponto de partida extratos de RNA preparados a partir de ixodídeos em todas as fases de desenvolvimento, exceto para o estágio larvar, onde apenas uma *pool* foi testada. Ainda que tivesse sido interessante ter testado mais amostras correspondentes a ixodídeos nesta fase de desenvolvimento, a detecção no decurso deste trabalho de sequências virais em todas as outras fases de desenvolvimento indica que os vírus em questão podem ser mantidos naturalmente por transmissão transtádial sendo, por consequência, expectável que estejam também presentes no estágio de larva. Em particular, a detecção de sequências virais numa amostra correspondente a uma postura de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* claramente indica que os espécimes fêmeas estavam infetados. É igualmente provável, mas não obrigatório, que as larvas que eclodem destes ovos possam já estar infetadas com estes vírus. Infelizmente não foi possível proceder à análise das sequências virais detetadas no par fêmea/ovos pois o exemplar adulto em questão foi analisado enquanto parte de uma *pool* contendo mais três fêmeas da mesma espécie recolhidas na mesma área geográfica. O resultado de amplificação desta *pool* (R7.1) foi igualmente positivo para a presença de flebovírus, mas não podemos inferir sobre a origem das sequências virais detetadas. Para além de detetadas em adultos de ambos os géneros (Fig. 3.7) e ovos, as sequências virais foram igualmente amplificadas de alguns *pools* contendo ninfas, corroborando a provável transmissão transtádial, como um dos possíveis mecanismos de manutenção natural destes vírus. Para as fêmeas adultas foi feita uma análise separada entre fêmeas engorgitadas e não engorgitadas para tentar perceber se os vírus são transmitidos por via de uma ingestão de sangue. Tal não se verificou, uma vez que o número de *pools* positivas nas fêmeas não engorgitadas (61,8% de *pools* positivas) foi superior aos resultados de *pools* positivas nas fêmeas engorgitadas (18,8% de *pools* positivas). Além disso, se estes vírus se mantivessem através da ingestão de sangue o número de *pools* positivas para os machos deveria ser muito reduzida, dado que estes se alimentam menos, o que não se verificou uma vez que obtivemos resultados positivos em 50% das *pools* de machos estudadas.

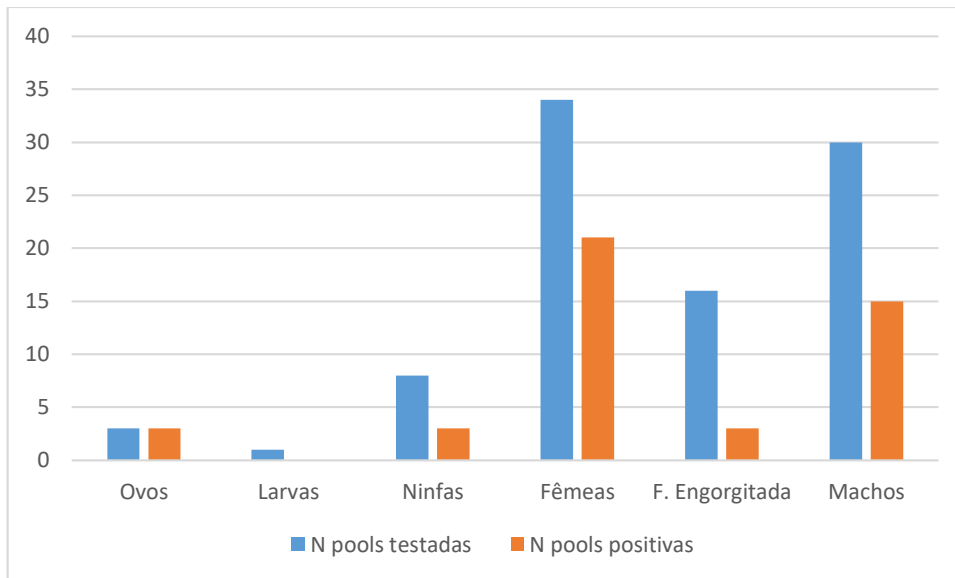


Figura 3.7: Distribuição da população estudada por estádios de crescimento. A azul estão apresentadas o número de *pools* estudadas/fase crescimento, em que foram estudadas no estado adulto *pools* de fêmeas engorgitadas separadas das fêmeas não engorgitadas, e a laranja o número de *pools* positivas para *Phlebovirus*/fase crescimento.

A abordagem utilizada para o rastreio da presença de flebovírus em ixodídeos (TBPVs), tem por base uma reação de amplificação de sequências virais sob a forma de cDNA por PCR utilizando *primers* degenerados, que têm como alvo uma região conservada do segmento L do genoma viral. Trata-se de uma primeira linha de rastreio da presença de TBPVs, e tem como objetivo a eventual descoberta e identificação de novos vírus em ixodídeos, o que irá permitir melhorar o nosso conhecimento sobre a distribuição, diversidade genética, evolução e epidemiologia destes vírus. Esta técnica de PCR apresenta-se como uma técnica simples, relativamente barata, rápida, sensível e facilmente adaptada à rotina de um laboratório. Igualmente, os resultados reportados por Matsuno *et al.* (2015) ou Pereira *et al.* (2016), claramente demonstram que a comparação das árvores filogenéticas obtidas tendo como base a análise das sequências correspondentes a fragmentos de cerca de 500 pb (tal como os obtidos no decurso deste trabalho), ou à sequência completa do genoma viral, evidenciam topologias genericamente coincidentes. Tal facto indica que o sinal filogenético contido nas sequências dos fragmentos analisados é suficiente para permitir clarificar qual a posição taxonómica do *Phlebovirus* cuja presença seja por eles revelada.

Contudo, este tipo de abordagens para a detecção de genomas virais que se baseiam na utilização de *primers* para alvos específicos, pecam pela possibilidade de darem origem a resultados falsos negativos. Ainda que tendo por base a utilização de *primers* cuja capacidade de detecção de sequências virais geneticamente diversas é possível através da degeneração da sua sequência (em especial através do uso de nucleótidos com inosina, os quais permitem que o *primer* hibride com alvos de sequência variável, sem aumentar a complexidade da mistura de *primers* empregue), as abordagens baseadas em amplificação dirigida só permitem a amplificação de sequência virais quando os *primers* de amplificação com elas hibridam. Em contrapartida, as abordagens de tipo NGS (*next-generation sequencing*), permitem a caracterização de genomas virais usando amplificações independentes das sequências alvo a atingir, o que permite a detecção/análise de vírus geneticamente divergentes ou mesmo desconhecidos até então, as quais não possam ser detetadas por quaisquer pares de *primers* disponíveis. Contudo, esta apresenta-se como uma abordagem difícil de implementar em rastreios em larga escala, uma vez que os custos e tempo necessário associado são ainda muito elevados. Por outro lado, dada a sensibilidade que o conjunto destas técnicas oferece, as amostras têm de ser extensamente tratadas de forma a eliminar a quase totalidade de ácidos nucleicos ditos “contaminantes” (não-virais), normalmente requerendo a purificação da fração viral. Esta purificação é feita, normalmente, por ultracentrifugação, tratamento com nucleases, e (i) remoção do rRNA por centrifugação (usando esferas paramagnéticas recobertas de *primers* que hibridam com rRNA) ou (ii) retro-transcrição do RNA extraído usando *primers* que não hibridam com sequências de rRNA. Mais uma vez, estes tipos de procedimentos não podem ser utilizados em larga escala, pela complexidade logística envolvida e custos associados. Em sua alternativa, pode sempre ser tentada a pesquisa de sequências correspondentes a outras secções do genoma viral usando diferentes conjuntos de *primers*, tal como veio a ser feito (ver secção 3.3.2).

Tal como em trabalhos anteriormente realizados, do ponto de vista formal foram executados dois controlos, os quais tiveram por objetivo demonstrar que as amplificações obtidas tinham como origem RNA viral encapsidado, e não de genomas virais transcritos a partir de cópias de genomas integrados no cromossoma do hospedeiro sobe a forma de DNA, ou destas mesmas cópias de genoma viral endogenizadas. Para tal, foram escolhidas aleatoriamente algumas amostras para as quais o rastreio efetuado tinha revelado resultado positivo de amplificação (R65, R67, R72, R75 e R76), as quais foram utilizadas como

controlo. Assim, no mesmo dia, com as mesmas condições de amplificação, foi executada uma PCR para tentar amplificar sequências virais utilizando o extrato de RNA diretamente (secção 2.6.2), os respetivos produtos de retro-transcrição de RNA total, (cDNA) (secção 2.7) e ainda usando o extrato de DNA preparado a partir de frações dos macerados (secção 2.6.1). Podemos verificar que, para cada uma das amostras analisadas, a presença de uma banda de cerca de 500 pb surge quando cDNA é utilizado como matriz de amplificação (pistas 1, Fig. 3.8), tal como esperado. Por outro lado, e tal como se anteciparia, quando o RNA é diretamente usado nas reações de amplificação a ausência de banda em questão para todas as amostras de RNA (pistas 3, Figura 3.8) foi um resultado igualmente expectável. Em combinação estes resultados demonstram que a origem dos produtos de amplificação obtidos é RNA. Curiosamente, o terceiro controlo revelou resultados não esperados, pois não seria expectável a presença de uma banda quando o uso do extrato de DNA. Apesar da quantidade de produto de amplificação obtido ser significativamente inferior à que se obtém quando cDNA é usado como matriz, é também um facto que em todas as amostras foi possível visualizar uma banda de cerca de 500 pb (setas vermelhas/pista 2, na Figura 3.8). Se considerarmos a hipótese que a origem dos produtos de amplificação obtidos tivesse origem não em RNA encapsidado, mas de RNA transcrito a partir de cópias de genoma viral endogenizadas, seria de esperar que estas sequências viessem a dar origem a produtos abundantes, quando o extrato de DNA foi usado para amplificação, partindo do princípio que estas sequências virais estariam presentes em todas as células dos exemplares analisados. Para além do mais, caso as sequências amplificadas até então tivessem origem em DNA viral endogenizado, não seria expectável observar-se uma diversidade genética tão grande quanto a que se veio a constatar (ver secção 3.5). No final, foram testadas mais amostras para tentar compreender melhor as observações efetuadas. Os resultados obtidos indicaram a ausência de amplificação de sequências virais nos extratos de DNA sempre que as reações de PCR, partindo do cDNA preparado a partir do mesmo macerado, eram igualmente negativas. Por outro lado, quando as reações de amplificação por PCR geravam resultados de amplificação positivos para uma amostra partindo de cDNA, por vezes, mas não sempre, reações de amplificação equivalentes efetuadas a partir de extratos de DNA das amostras em questão geravam resultados de amplificação positivos, enquanto que noutras, não foi revelada amplificação aparente de sequências virais. Perante estes resultados, a hipótese de que as amplificações obtidas traduzissem a presença de sequências



virais num grande número de células de ixodídeos não parece ser confirmada. Nesta situação, seria espectável que tivessem sido obtidos produtos de amplificação bastante abundantes, traduzidos pela observação de bandas de intensidade bem mais forte do que o obtido (apenas bandas ténues foram observadas). Várias hipóteses se levantam sobre a origem destas bandas observadas, como ocorrer uma transcrição reversa ao nível celular, ou o genoma viral não se encontrar integrado em todas as células.

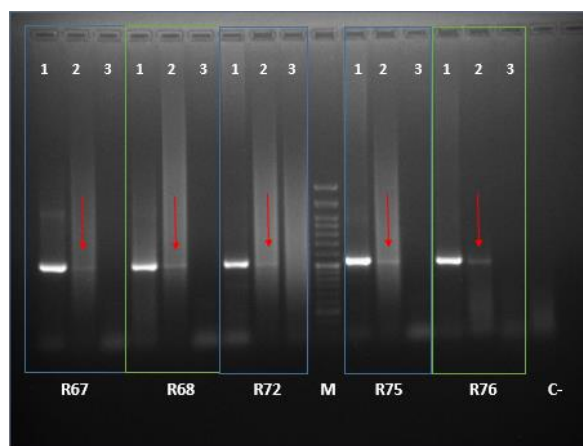


Figura 3.8: Amplificação de seqüências virais por RT-PCR usando extratos de cDNA (pistas 1), DNA (pistas 2) ou RNA obtidos a partir das amostras R67, R68, R72, R75 e R76; PCR; M – Marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); C- Controlo negativo em que água foi utilizada como amostra para o PCR.

As amostras positivas, após a amplificação do DNA (bandas com cerca de 500bp), foram enviadas para sequenciação, e foram identificadas como *Phlebovirus* por BLASTn. Estes resultados não esperados devem ser explorados em futuros trabalhos, para tentar compreender a origem destes segmentos nas amostras de DNA.

### 3.3.2. Amplificação de seqüências genómicas de *Phlebovirus* (Segmento S) por *multiplex-PCR*

Ainda que a análise de seqüências virais correspondentes a parte do segmento L do genoma de flebovírus tenha permitido a sua caracterização genética preliminar, esta revelou uma maior diversidade de seqüências virais, do que as já anteriormente documentadas por Pereira *et al.* (2016), justificando uma mais extensa análise dos vírus em questão. Considerando que limitações técnicas e financeiras nos impediram de processar as amostras nas quais foi detetada a presença de seqüências genómicas de flebovírus no sentido de

permitir a sua caracterização por via da utilização de metodologias de tipo NGS, a prossecução da sua caracterização teria de passar por uma abordagem mais “conservadora”, isto é, utilizando conjuntos de *primers* que eventualmente permitissem uma amplificação dirigida de sequências virais. Porém, duas limitações são impostas a este tipo de abordagem. Por um lado a falta de sequências virais diferentes das correspondentes a sequências homólogas às amplificadas no contexto deste trabalho e, por outro, a certeza que o segmento L do genoma viral é o mais conservado, sendo que as tentativas de alinhamento das poucas sequências M ou S disponíveis nas bases de dados, se traduziram pela obtenção de alinhamentos a partir dos quais a inexistência de zonas claramente conservadas entre os genomas virais comparados tornou muito difícil o desenho de *primers* de amplificação que, *a priori*, permitissem antecipar a possibilidade de obtenção de produtos de amplificação baseados na sua utilização. Ainda assim, pelo menos um trabalho (Lambert *et al.*, 2009) reportou a possibilidade de amplificação de sequências parciais do fragmento S do genoma de flebovírus relativamente próximos do ponto de vista filogenéticos dos descritos no contexto deste trabalho, tendo por base a análise de sequências L. Assim, foi decidido utilizar os *primers* em questão para rastrear uma fração das amostras biológicas analisadas.

A amplificação parcial do segmento S de flebovírus foi, então, levada a cabo adaptando as condições descritas por Lambert *et al.*, 2009; (secção 2.8.2). Para tal, foram aleatoriamente selecionadas do universo de amostras previamente analisadas um conjunto (R2015, RM, R3.1, R5.1, R6.1, R8.1, R64, R67, R68, R69.1, R69.2, R70, R71, R72, R73, R75 e R76; Anexo 3), para o qual tinha sido previamente revelada a presença de produtos de amplificação traduzindo a presença do segmento L dos vírus em questão. A análise de frações das reações de PCR relativas à análise de parte deste conjunto de amostras está graficamente representada na Fig. 3.9. Enquanto no painel esquerdo é bem patente a presença de um produto de amplificação que traduz a presença de sequências L, não foi possível observar qualquer produto de amplificação aquando da utilização de *primers* com alvos complementares no segmento S de alguns destes vírus (painel direito).

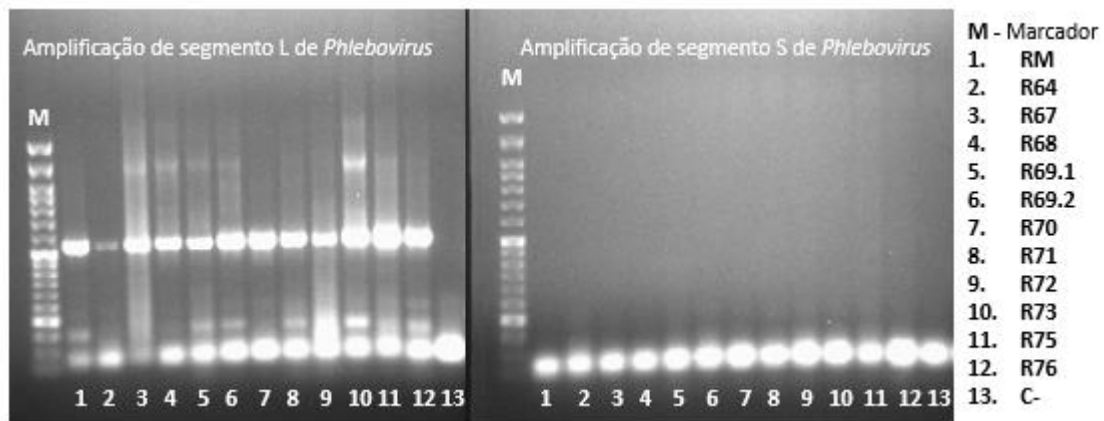


Figura 3.9: Análise em gel de agarose de reações de PCR destinadas à amplificação de sequências parciais do segmento L (esquerda) e do segmento S (direita) de flebovírus. M-Marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder VI* (*NZYTech*, Portugal); 1-13 Amostras estudadas; 13-controlo negativo da reação de PCR. Todas as amostras apresentam o fragmento de cerca de 500 pb na reação de amplificação do segmento L e nenhuma apresenta o fragmento esperado de 370 pb na reação de amplificação do fragmento S.

O facto de não termos qualquer banda pode ser devido a alguma condição inerente aos *primers* utilizados (uma vez que os restantes reagentes e condições são utilizados para outros PCRs com resultados positivos (Figura 3.9 – imagem da esquerda). Não podemos esquecer também que para a amplificação do segmento L estamos a utilizar *primers* degenerados e que tal não acontece com os *primers* utilizados na amplificação do segmento S. A utilização de *primers* degenerados, é feita com o intuito de abranger, tanto quanto possível, a diversidade genética destes vírus.

### 3.3.3. Amplificação de fragmentos de DNA de CCHFV por *nested*-PCR

Todas as amostras analisadas compostas por espécimes das espécies *Hyalomma marginatum* e *Hyalomma lusitanicum* foram rastreadas, por *nested*-PCR, para a presença de genoma de CCHFV (Anexo 3). A amplificação de sequências genómicas de CCHFV (secção 2.9) foi feita adaptando as condições descritas por Figueira (2016), tendo por base a utilização de *primers* de amplificação desenhados com base no alinhamento de um grande número de sequências de segmentos S deste vírus, disponíveis nas bases de dados de acesso público. Todas as amostras rastreadas revelaram-se negativas. Uma vez que a deteção deste vírus na península ibérica remonta a 1985 (Filipe *et al.*, 1985), que na última década vários casos foram reportados em Espanha (Estrada-Penã *et al.*, 2012; Cajimat *et al.*, 2017; Negredo *et al.*, 2017) e dada a proximidade do nosso país, é de extrema importância a vigilância em rotina dos vetores com capacidade de transmitir CCHF.

### 3.4. Clonagem e análise de produtos de amplificação PCR no vetor plasmídico *pGEM®-T Easy*

A obtenção de clones de DNA plasmídico recombinante contendo sequências genómicas de flebovírus permite-nos estabilizar produtos de amplificação muito pouco abundantes através da sua clonagem num vetor comercial, os quais, dificilmente poderiam ser diretamente sequenciados. Por outro lado, este tipo de abordagem permite-nos proceder à análise de clones múltiplos e independentes, dando-nos a possibilidade de avaliar, ainda que em pequena escala, a diversidade genética da população viral. Para tal, teremos de assumir que esta é transposta para o conjunto de moléculas amplificadas, isto é, que todas as variantes genómicas são igualmente passíveis de amplificação pelos *primers* usados, e, por outro, que a clonagem, *per se*, não introduz um viés na forma como esta diversidade *a priori* (isto é, na amostra biológica de partida) é refletida no conjunto de clones obtidos.

Assim, o conjunto de amostras cujos produtos de amplificação por PCR de sequências virais se traduziam na observação de uma banda fraca num gel de agarose (como por exemplo a amostra 4 da Figura 3.5), depois de purificadas, foram clonados com o vetor plasmídico *pGEM®-T Easy* (Promega, E.U.A.). Foram selecionadas para este tipo de abordagem 9 amostras aleatórias (RBR, R11.2, R44, R51, R54, R58.2, R61, R64 e R70).

O sistema de clonagem usado permitiu selecionar, com base no mecanismo de  $\alpha$ -complementação, os clones com vetor recombinante através da coloração branca das colónias face às colónias bacterianas de cor azul (clones que apresentavam plasmídeos *a priori* não recombinantes). Após o crescimento das colónias nas placas com meio seletivo foram repicadas 8 colónias bacterianas referentes a cada uma das amostras analisadas e extraído o respetivo DNA plasmídico. Com base no padrão da eletroforese do gel de agarose, comparou-se o perfil de bandas obtidas com as correspondentes à migração de um extrato plasmídico de uma amostra de referência (utilizada como controlo negativo), transportando um plasmídeo com o mesmo tamanho do vetor utilizado (3kpb; designada M na figura 3.10). Foram selecionados para posterior hidrólise com a enzima *EcoRI* (reconhece sequências alvo nos limites do local onde são inseridas sequências de DNA exógeno no vetor utilizado), os extratos de DNA que apresentam bandas com maior massa molecular que as observadas no controlo, sendo por isso expectável que contivessem um fragmento de DNA inserido em *pGEM®-T Easy* (Figura 3.10).

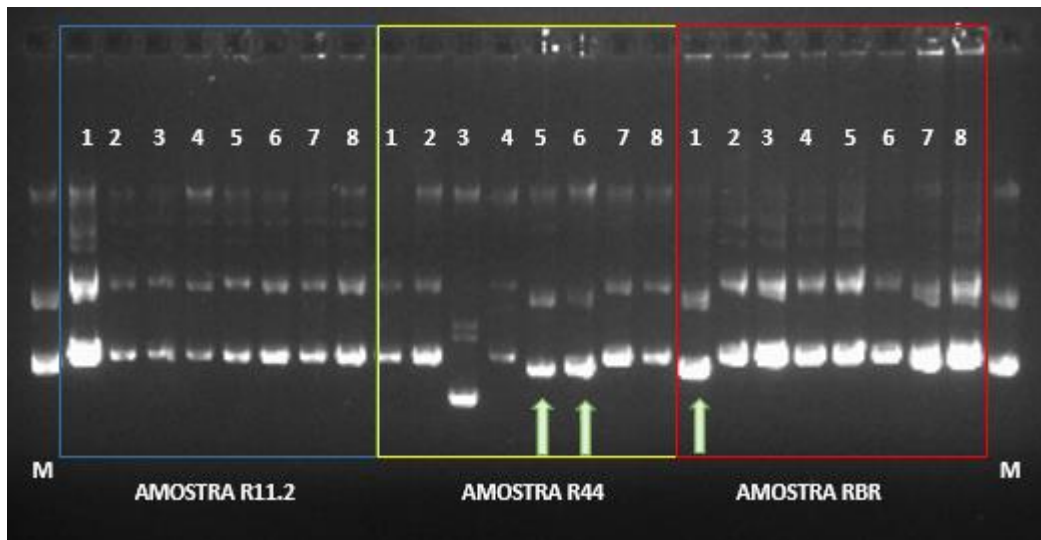


Figura 3.10: Padrão de migração do DNA plasmídico, em gel de agarose, de 8 clones bacterianos das clonagens dos fragmentos de DNA das amostras R11.2, R44 e RBR. As setas verdes indicam as amostras que apresentam uma banda do mesmo tamanho do plasmídeo de referência (M) e que em princípio, não apresentam o fragmento clonado. M - Marcador - plasmídeo de referência com 3kpb.

Na figura 3.11 podemos verificar um exemplo de uma eletroforese em gel de agarose de um perfil de digestão resultante da hidrólise enzimática efetuada, identificando potenciais plasmídeos recombinantes que contêm os amplicões desejados. Esta análise permite claramente observar uma banda correspondente ao vetor plasmídico (3kpb) e uma correspondente aos fragmentos de DNA exógeno neles inseridos (500pb) (Fig. 3.11).

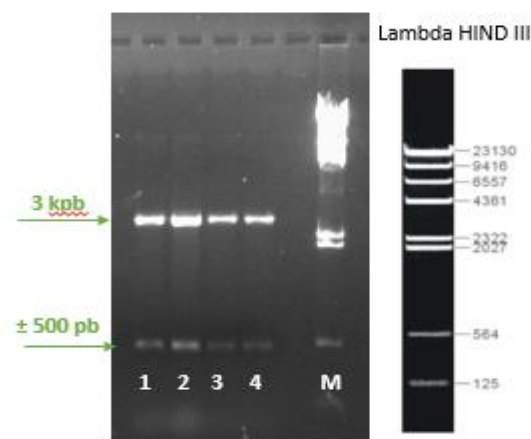


Figura 3.11 Exemplo de um padrão de migração dos plasmídeos recombinantes após hidrólise com a enzima *EcoRI*. A banda correspondente a um fragmento de DNA de 3 kpb representa o vetor plasmídico *pGEM-T Easy* linearizado, e as bandas com cerca de 500 pb indicam a presença do fragmento de DNA clonado. M – Marcador de massa molecular *Lambda HindIII*.

Cada um dos clones de DNA plasmídico recombinante foi submetido a um processo de purificação, tendo sido subsequentemente sequenciado utilizando *primers* universais cujas sequências de hibridação flanqueiam o local de clonagem múltipla do vetor utilizado. Das amostras que foram clonadas foram selecionados para sequenciação 1 clone das amostras R58.2, R64 e R70. Para tentar estudar a variabilidade genética destes vírus, foram selecionados mais clones de cada amostra: 4 clones das amostras R44 (R44\_1, R44\_2, R44\_7 e R44\_8), R51 (R51\_2, R51\_11, R51\_41 e R51\_AZ), R54 (R54\_A, R54\_B, R54\_D e R54\_11) e RBR (RBR2, RBR3, RBR4 e RBR6); 7 clones da amostra R61 (R61\_A, R61\_B, R61\_C, R61\_D, R61\_F, R61\_G e R61\_2) e 8 clones da amostra R11.2 (R11.2\_1, R11.2\_2, R11.2\_3, R11.2\_4, R11.2\_5, R11.2\_6, R11.2\_7 e R11.2\_8).

### **3.5. Análise bioinformática das sequências obtidas das reações de sequenciação**

Para a totalidade dos casos analisados, as reações de sequenciação executadas, tendo por base a utilização de DNA plasmídico purificado, traduziram-se na obtenção de resultados de sequenciação de melhor qualidade do que os obtidos tendo por base a sequenciação direta de amplicões (ainda que purificados antes de terem sido sequenciados). A análise das sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação de amplicões com o *primer* ppL2R (HRT-GL3276R) serviu para efetuar a caracterização genética da maioria dos mesmos. No entanto, quando a reação de sequenciação com este *primer* terminava precocemente, gerando uma sequência com um tamanho consideravelmente menor, ou qualidade mais baixa do que a maioria, era feita uma nova sequenciação do mesmo produto de amplificação com o *primer* ppL1F (TBPVL2759F), e da sobreposição parcial das duas sequências foi construída uma sequência *contig*.

A totalidade das sequências obtidas foram editadas manualmente para remoção, quando necessário, das sequências dos *primers* de amplificação ou de zonas onde a interpretação automática dos cromatogramas (*base-calling*) gerava sequências ambíguas, após o que foi feita uma análise bioinformática das mesmas para confirmar a sua identidade enquanto sequências virais recorrendo à ferramenta BLASTn, usando as opções de análise *megablast* (que permite a identificação de sequências homólogas de grande semelhança às obtidas) ou *discontiguous megablast* (que permite a identificação de homólogos menos semelhantes dos que os que são identificados com a opção anterior).

Foram sequenciadas um total de 70 amplicões/clones de DNA plasmídico; neste conjunto a amostra R73 apesar de ter sido claramente identificada como correspondente à porção desejada do genoma de flebovírus por BLASTn (revelando uma identidade de 93% com a sequência LC146424), e apesar de ter sido novamente sequenciada, não apresentava qualidade suficiente para ser corrigida manualmente e analisada, tendo sido por isso excluída do estudo.

De forma a prosseguir com a caracterização genética das sequências obtidas estas foram submetidas a uma análise filogenética de acordo com o descrito em 2.14, usando três opções para a reconstrução de filogenias: o algoritmo de associação junção-de-vizinhos (*Neighbor-Joining*), que permite a obtenção de árvores sem raiz a partir de uma matriz de distâncias genéticas corrigidas, o critério de otimização de Máxima Verosimilhança (*Maximum Likelihood*, ou ML), pesquisa qual a árvore que maximiza a probabilidade de obtenção do alinhamento de partida, com base num modelo evolutivo previamente adotado, e a análise Bayesiana usando *priors* não-informativos (i.e., não dando a nenhum deles qualquer peso em particular).

Para inferir sobre as relações de parentesco evolutivo entre as sequências obtidas no decurso deste trabalho, e um conjunto bastante extenso de sequências homólogas disponíveis, através de consulta nas bases de dados, foi construído um alinhamento de todas elas, com base no qual foi obtida uma árvore filogenética de *Phlebovirus*, utilizando o método de ML a partir de matrizes de distâncias calculadas pelo modelo GTR+ $\Gamma$ +I (anexo 4).

Para facilitar o nosso estudo, foram posteriormente construídas duas árvores filogenéticas com as nossas sequências, e com as sequências que na árvore anterior (anexo 4, retângulo a tracejado) estavam inseridas no mesmo grupo monofilético utilizando o método de ML como modelo. Na figura 3.12 estão apresentados os valores de *bootstrap* considerados significativos (valores superiores a 75%) na figura 3.13 são apresentados \* que indicam apenas *bootstrap* ou valores de probabilidade significativa e que aparecem nos ramos que tiveram suporte estatístico nas abordagens NJ, ML ou análise *bayesiana*. Dado que as árvores obtidas são topologicamente congruentes, a análise dos resultados foi feita relativamente à figura 3.12.

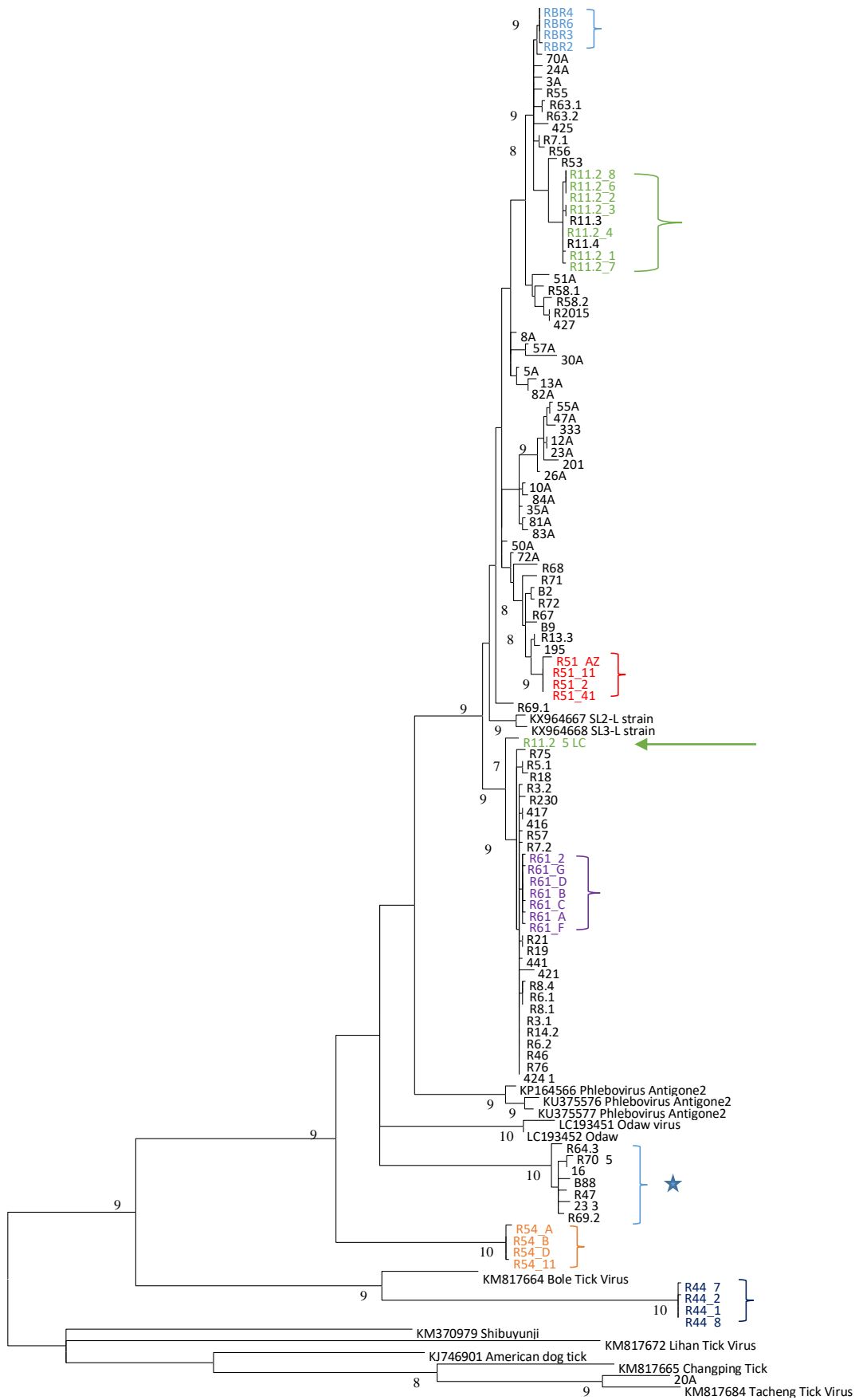


Figura 3.12: Relações filogenéticas entre as amostras em estudo, baseadas na análise das sequências nucleotídicas parciais do segmento L de *Phlebovirus*. A árvore filogenética foi obtida com 51 sequências de referência e 69 amostras (amostras com prefixo R) pelo método da máxima verossimilhança ML, utilizando o modelo GTR+I+Γ. Estão também indicados os valores de *bootstrap* (percentagem de 1000 réplicas) considerados significativos (Valores superiores a 75%).



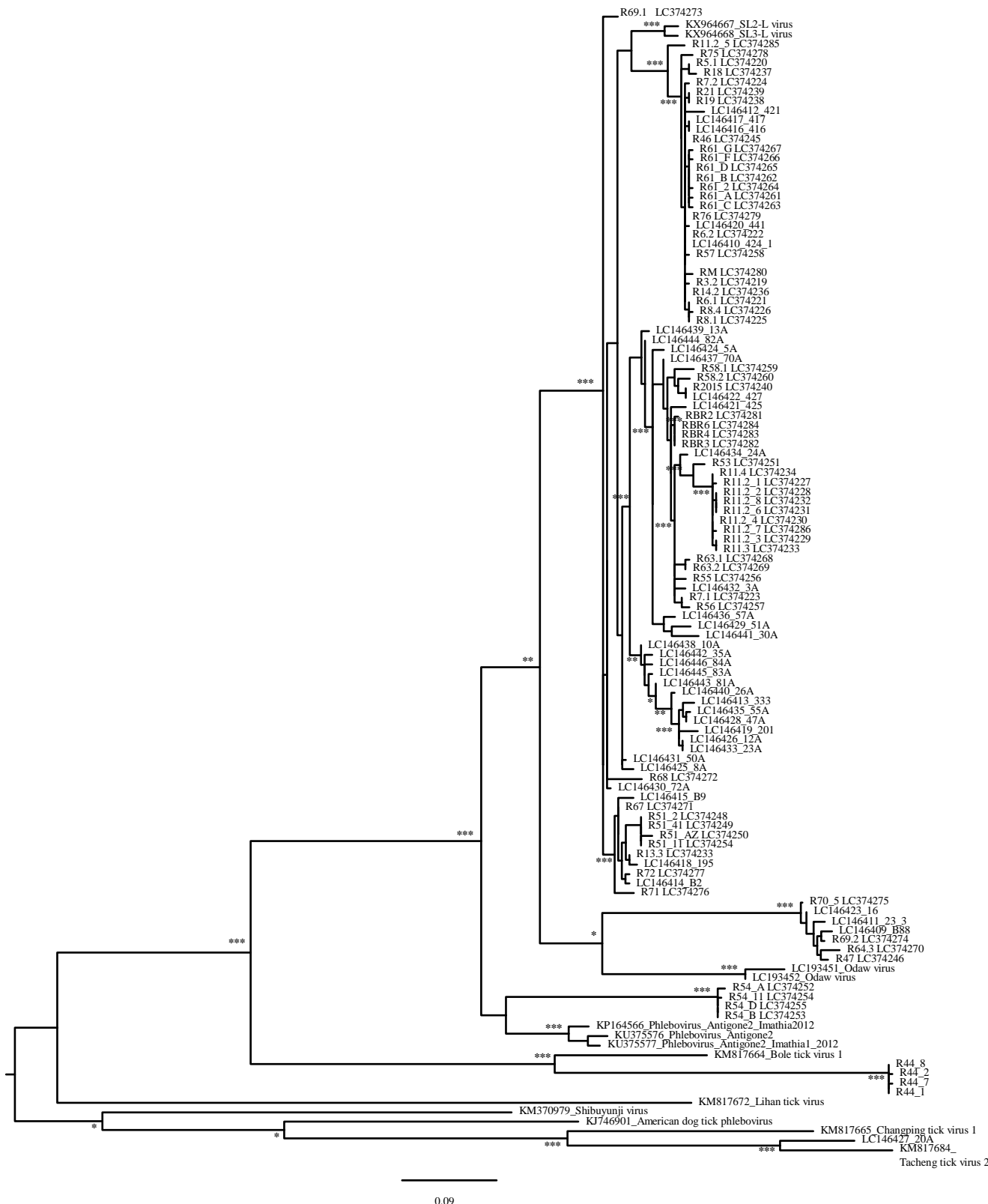


Figura 3.13: Relações filogenéticas entre as amostras em estudo, baseadas na análise das sequências nucleotídicas parciais do segmento L de *Phlebovirus*. A árvore filogenética foi obtida com 51 sequências de referência e 69 amostras (amostras com prefixo R) pelo método ML, utilizando o modelo GTR+I+Γ. Estão apresentados \* que indicam apenas *bootstrap* ou valores de probabilidade significativa e que aparecem nos ramos que tiveram suporte estatístico nas abordagens NJ, ML ou análise *bayesiana*.

Podemos verificar pela análise da árvore filogenética das sequências parciais do segmento genómico L, a presença de duas linhagens virais distintas que partilham um ancestral comum, suportado por um valor de *bootstrap* de 90%.

A primeira linhagem apresenta as sequências obtidas do fragmento clonado da amostra R44, correspondente a duas fêmeas *Hyalomma lusitanicum* recolhidas de bovinos em Gáname (Zamora, Espanha). Estas sequências formam um grupo monofilético, suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, e partilham o mesmo ancestral comum que a sequência de *Bole Tick Virus*, com o número de acesso KM17664, proveniente da China (Li *et al*, 2015), e correspondente a *Hyalomma asiaticum*. Na caracterização de cada linhagem genética através da análise das sequências putativas dos produtos que cada uma delas codifica (Figura 3.14), conseguiu-se agrupar as sequências com base nos padrões de combinações dos resíduos de aminoácidos da proteína L, e podemos verificar como estas cinco sequências apresentam o mesmo padrão de aminoácidos (Figura 3.14, quadrado azul).

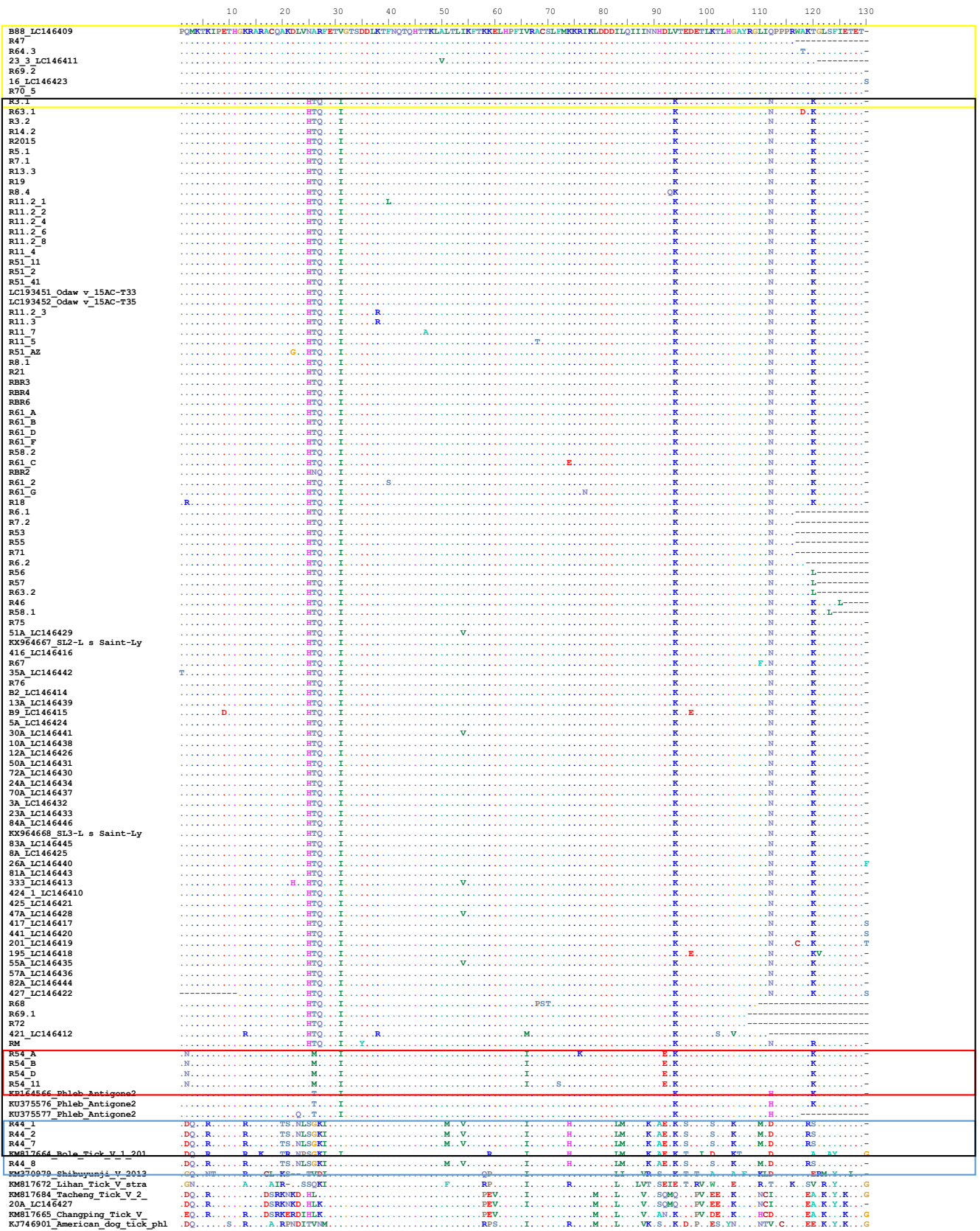


Figura 3.14: Caracterização de cada linhagem genética através da análise das sequências putativas dos produtos que cada uma delas codifica. Sequências encontram-se agrupadas com base nos padrões de combinações dos resíduos de aminoácidos da proteína L.

A segunda linhagem viral, contém o grupo onde estão incluídas todas as nossas sequências estudadas, bem como, as sequências de vírus identificados na Grécia (Papa *et al*, 2016), Ghana (Kobayashi *et al*, 2017) e França (Prinz *et al*, 2017).

Dentro desta linhagem podemos verificar que as sequências dos clones da amostra R54 (R54\_A, R54\_B, R54\_D e R54\_11), correspondente a duas fêmeas engorgitadas *Rhipicephalus sanguineus* recolhidas de um cão em Siete Iglesias de Trabancos (Valladolid, Espanha), além de pertencerem ao mesmo grupo monofilético, suportado por um valor de *bootstrap* de 100% apresentam o mesmo padrão de aminoácidos (Figura 3.14, quadrado vermelho). O mesmo se pode verificar para o grupo monofilético representado na figura 3.12 com a estrela azul, e que apresenta o mesmo padrão de resíduos de aminoácidos da proteína putativa L.

As sequências R64.3, R69.2, R70\_5, identificadas no decorrer deste trabalho e LC146411, LC146423, LC146409 identificadas por Pereira *et al.*, 2016, estão agrupadas no mesmo grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 100% e apresentam o mesmo padrão de resíduos de aminoácidos da proteína putativa L (retângulo amarelo, figura 3.14).

As sequências identificadas na Grécia (KP164566 *Phlebovirus* Antigone2 Imathia 2012, KP375576 *Phlebovirus* Antigone2 Pella2 2013 e KP375577 *Phlebovirus* Antigone2 Imathia1 2012) (Papa *et al*, 2016), formam um grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 99% e apresentam o mesmo padrão de resíduos de aminoácidos da proteína putativa L.

As sequências identificadas no Ghana (Kobayashi *et al*, 2017), LC193451 Odaw virus 15 AC-T33 e LC193452 Odaw virus 15 AC-T35, embora se encontrem agrupadas no mesmo grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, o seu padrão de resíduos de aminoácidos da proteína putativa L não apresenta um perfil único.

Todas as restantes sequências identificadas no decorrer deste trabalho, bem como as restantes identificadas por Pereira *et al.*, 2016, e as sequências identificadas em França por Prinz *et al*, 2017 (KX964667 SL2-L strain Saint-Lys 2 e KX964668, SL3-L strain Saint-Lys 3), formam um grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 99%. Estas sequências e as identificadas no Ghana (Kobayashi *et al*, 2017), apresentam o mesmo padrão de resíduos de aminoácidos da proteína putativa L (retângulo cinzento, figura 3.14).

As sequências obtidas dos fragmentos que foram clonados para as amostras RBR, R44, R51, R54 e R61 aparecem sempre agrupadas em grupos monofilético, sendo o produto

amplificado representativo da variante mais presente. Uma vez que foram sempre testadas *pools* de amostras e nunca ixodídeos isolados, não podemos inferir se temos a presença de uma população homogénea destes vírus, ou se apenas temos um ixodídeo infetado nessa *pool*. Na amostra R11.2 (colheita de 8 machos, *Rhipicephalus sanguineus*, Dunas de São Jacinto, Aveiro da vegetação), 7 das 8 sequências obtidas dos clones da amostra R11.2 formam um grupo monofilético com as amostras R11.3 e R11.4, suportado por um valor de *bootstrap* de 99%. A sequência obtida para o clone R11.2\_5 (seta verde, figura 3.12), não aparece incluída neste grupo, o que denota a elevada variabilidade genética destes vírus.

São várias as causas da diversidade genética dos Bunyavirus, as quais incluem mutações que ocorrem na replicação do RNA, redistribuição dos segmentos genómico (*segment reassortment*) e recombinação (Deyde *et al.*, 2006; Amroun *et al.*, 2017).

Durante a replicação do RNA não há nenhuma atividade da RdRp que permita corrigir as incorporações incorretas de nucleótidos, conduzindo à formação de *quasispécies*, ou seja, de um grupo de variantes virais relacionadas, mas geneticamente distintas. A taxa de mutação/substituição nucleotídica em vírus com genoma RNA é de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  por nucleótido incorporado e por ciclo replicativo.

Os vírus com genoma RNA que têm que replicar em ambientes celulares muito diferentes (por exemplo, num ixodídeo e num hospedeiro vertebrado), têm que atingir um compromisso genético (*genetic tradeoff*), que pode limitar a dispersão da maioria das variantes virais que são aleatoriamente geradas no decurso da replicação viral e que são eliminadas devido à sua baixa *fitness* nestes dois ambientes.

Outra causa da diversidade genética é o rearranjo genómico dos segmentos, que pode acontecer nos *Phlebovirus*, e que é o resultado da troca de segmentos genómicos, dando origem a novos vírus geneticamente diferentes. Isto pode ocorrer quando uma célula do hospedeiro é infetada com dois ou mais vírus relacionados, cujo genoma é segmentado levando a dramáticas e inesperadas alterações fenotípicas. O arranjo genómico dos segmentos é um mecanismo evolutivo que resulta em importantes alterações na *fitness* dos vírus, na adaptação e transmissão aos hospedeiros e na patogenicidade em vírus de genoma RNA segmentado (Vijaykrishna *et al.*, 2015). Embora a presença de recombinação genética não tenha sido amplamente descrita em tiovírus (Briese *et al.*, 2013), o facto de termos

linhagens genéticas distintas nas mesmas regiões geográficas, e nos mesmos hospedeiros, pode potencializar a que esta situação ocorra.

Em relação à recombinação, esta ocorre em baixa frequência e é mesmo ausente na maioria de vírus RNA de polaridade negativa. Para ocorrer recombinação um ou mais vírus têm que infectar a mesma célula hospedeira. Este processo ocorre durante a replicação do RNA e dá origem a RNA mosaico (Amroun *et al.*, 2017).

Os *Phlebovirus* transmitidos por ixodídeos encontram-se distribuídos, de acordo com as análises filogenéticas das sequências virais, em quatro grupos genéticos distintos: SFTS/Heartland, Bhanja, Uukuniemi e Kaisodi (Figura 1.3; Matsuno *et al.*, 2015). Podemos verificar que todas as nossas sequências se encontram agrupadas num grupo monofilético (Figura 3.14, assinalado com a estrela vermelha), que não pertence a nenhum dos quatro grupos descritos.

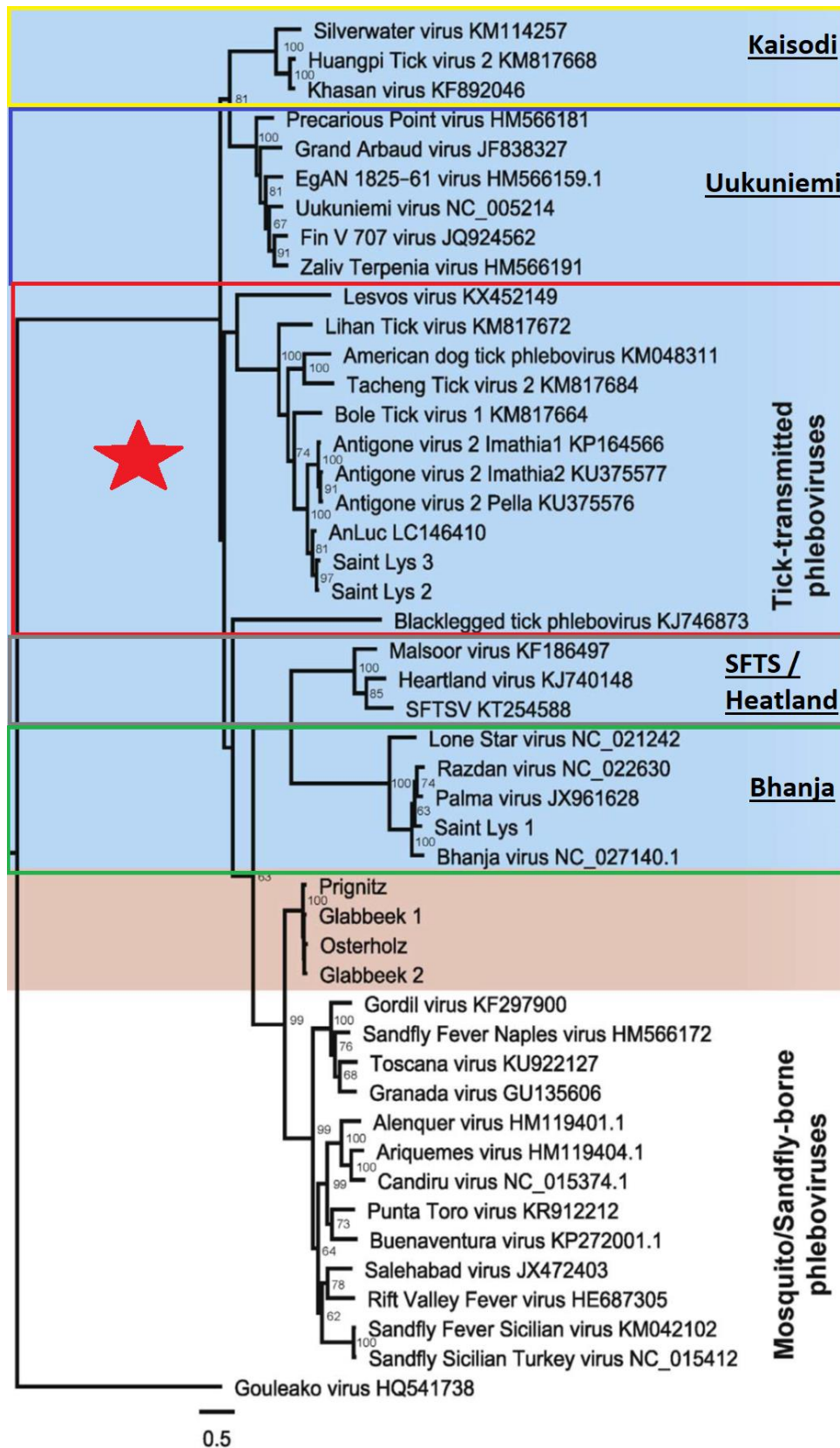


Figura 3.14: Relações filogenéticas entre as amostras em estudo e seqüências de referência, baseadas na análise das seqüências nucleotídicas do segmento L de *phlebovirus*. A estrela vermelha representa o grupo onde todas as nossas seqüências estão contidas. Estão assinalados os quatro grupos genéticos SFTS/Heartland, Bhanja, Uukuniemi e Kaisodi (Adaptado de Prinz *et al.*, 2017).





**Conclusões**  
**e**  
**Perspetivas**



#### 4. Conclusões e perspectivas

A descoberta dos vírus Heartland e SFTS, patogênicos para o homem, potenciou na última década a descoberta e caracterização de novos flebovírus transmitidos por ixodídeos. Estes estudos têm ocorrido por todo o mundo e dada a escassez de informação sobre estes vírus no sul da Europa, foi iniciado um estudo por Pereira *et al.*, 2016, e continuado no desenvolvimento deste trabalho, a caracterização em Portugal e na província Espanhola da Estremadura. Utilizámos para este rastreio a estratégia de deteção por RT-PCR (Matsuno *et al.*, 2015), do segmento genómico viral L de *phlebovirus*, que codifica a RdRp responsável pela replicação e transcrição do RNA viral no citoplasma das células infetadas (Amroun *et al.*, 2017). Obtivemos resultados positivos em 48,9% das *pools* estudadas, independentemente dos ixodídeos terem sido recolhidos nos animais ou diretamente na vegetação, do seu estágio de desenvolvimento e do género.

A análise filogenética do fragmento de cerca de 500 pb do segmento L, permitiu aferir com robustez as relações filogenéticas das nossas sequências, onde as linhagens genéticas encontradas foram consistentes nas árvores filogenéticas efetuadas, em que cada uma delas estava associada com as sequências da proteína putativa L, caracterizada pelos grupos de resíduos de aminoácidos. Podemos verificar a existência de relações filogenéticas entre os TBPV que foram identificados neste trabalho, e os TBPV de referência utilizados e que foram identificados em regiões geográficas distintas: Portugal, Espanha, França, Grécia, Ghana e China (Figura 3.12). Tal como mencionado por Matsuno *et al.*, 2015, estas descobertas esporádicas de Phlebovirus geneticamente relacionados, mas sem relação geográfica ou temporal é uma característica de todos os grupos de TBPV e representa apenas a “ponta do *iceberg*”.

Dada a crescente descoberta de novos *Phlebovirus*, é de extrema importância que estudos como o de Prinz *et al.* (2017), Papa *et al.* (2012, 2016), Pereira *et al.* (2016) continuem a ser feitos e estendidos a toda a Europa (e quem sabe a nível mundial) para rastrear e estudar a diversidade genética, a evolução, a taxonomia, a epidemiologia e a patogenicidade (ou não) destes vírus. Portugal faz parte da rota migratória de milhares de aves que anualmente atravessam o nosso país ([www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt)). Estas aves migratórias param no nosso país aquando das viagens entre os vários continentes e apresentam um potencial perigo de dispersar uma variedade de doenças, algumas delas transmitidas por ixodídeos (Papa *et al.*, 2016).

Dado que a maioria das doenças transmitidas por ixodídeos são zoonóticas, é essencial a existência de um programa nacional de vigilância e controlo dos animais e dos ixodídeos. É crucial termos o conhecimento e controlo dos vetores destes vírus e perceber quais os riscos que estes TBPV apresentam em termos de saúde pública, sendo necessárias equipas multidisciplinares de entomologia, epidemiologia, saúde pública, medicina e veterinária. Tem de se estudar e compreender se as alterações climáticas a que temos assistido nos últimos anos, podem alterar a ecologia e ciclos de vida dos Ixodídeos, e consequentemente dos *Phlebovirus*. Estas alterações climáticas, bem como, os fatores sociogeográficos e o desenvolvimento da agricultura, podem facilitar a migração dos hospedeiros dos ixodídeos levando a uma dispersão de ixodídeos e seus patógenos em novos territórios (Estrada-Pena *et al.*, 2014).

Dada a diversidade genética dos *Phlebovirus* é crucial termos *primers* robustos que permitam a deteção destes vírus, para tentar detetar novos vírus e diagnosticar em humanos e animais prováveis doenças por eles provocadas. Apesar dos métodos moleculares utilizados se terem revelado uma ferramenta eficaz para detetar e caracterizar os *Phlebovirus*, a utilização de metodologias moleculares alternativas, como o NGS e abordagens metagenómicas podem, claramente, levar à descoberta e identificação de novos *Phlebovirus*.

Por fim, será bastante relevante compreender a origem das sequências amplificadas do extrato de DNA, e determinar as características intrínsecas e a natureza patogénica dos vírus molecularmente identificados no decorrer deste trabalho, por isolamento destes mesmos vírus.

**Referências**  
**Bibliográficas**



**Adams, M. J.,** Lefkowitz, E. J., King, A. M., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J. & Nibert, M., 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*, 1-34.

**Amaro, F.,** Zé-Zé, L., Alves, M.J., Börstler, J., Clos, J., Lorenzen, S., Becker, S.C., Schmidt-Chanasit, J., Cadar, D., 2015. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. *Viol. J.* 12, 174.

**Amaro, F.,** Hanke, D., Zé-Zé, L., Alves, M.J., Becker, S.C., Höper, D., 2016. Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. *Virus Res.* 214, 19–25.

**Amroun, A.,** Priet, S., de Lamballerie, X., & Quérat, G., 2017. Bunyaviridae RdRps: structure, motifs, and RNA synthesis machinery. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-26.

**Assadian, O.,** & Stanek, G., 2002. Theobald Smith-the discoverer of ticks as vectors of disease. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114(13/14), 479-481.

**Barroso, H.** (Ed.) 2014. *Microbiologia médica*. Lidel-edições técnicas, lda.

**Bente, D. A.,** Forrester, N. L., Watts, D. M., McAuley, A. J., Whitehouse, C. A., & Bray, M., 2013. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral research*, 100(1), 159-189.

**Bird, B. H.,** Ksiazek, T. G., Nichol, S. T., & MacLachlan, N. J., 2009. Rift Valley fever virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(7), 883-893.

**Bouquet, J.,** Melgar, M., Swei, A., Delwart, E., Lane, R. S., & Chiu, C. Y., 2017. Metagenomic-based Surveillance of Pacific Coast tick *Dermacentor occidentalis* Identifies Two Novel Bunyaviruses and an Emerging Human Rickettsial Pathogen. *Scientific Reports*, 7(1), 12234.

**Briese, T.,** Calisher, C. H., & Higgs, S. (2013). Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants. *Virology*, 446(1-2), 207-216.

**Briese, T.,** Alkhovskiy, S. V., Beer, M., Calisher, C. H., Charrel, R., Ebihara, H., et al., 2016. Create a New Order, Bunyavirales, to Accommodate Nine Families (Eight New, One Renamed) Comprising Thirteen Genera. Technical Report. Report number: ICTV

[International Committee for Taxonomy of Viruses] Proposal (Taxoprop) No. 2016.030a-vM. (<https://data.ictvonline.org/proposals/2016.030a-vM.A.v6.Bunyavirales.pdf>).

**Brites-Neto, J., Duarte, K.M.R., Martins, T.F., 2015.** Tickborne infections in human and animal population worldwide, *Veterinary World* 8 (3) 301-315.

**Cajimat, M. N., Rodriguez, S. E., Schuster, I. U., Swetnam, D. M., Ksiazek, T. G., Habela, M. A., ... & Bente, D. A., 2017.** Genomic Characterization of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus in Hyalomma Tick from Spain, 2014. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(10), 714-719.

**Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Marí, J. M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., ... & De Lamballerie, X., 2005.** Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1657.

**Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H., 1989.** One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172-2175.

**Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013.** Morphological and genetic diversity of Rhipicephalus sanguineus sensu lato from the new and old worlds. *Parasit. Vectors* 6, 213.

**Deyde, V. M., Khristova, M. L., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., & Nichol, S. T. 2006.** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *Journal of virology*, 80(17), 8834-8842.

**Dionisio, D., Esperti, F., Vivarelli, A., & Valassina, M., 2003.** Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Current opinion in infectious diseases*, 16(5), 383-388.

**Elbeaino, T., Digiario, M., & Martelli, G. P., 2009.** Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of virology*, 154(11), 1719.

**Elliott, R. M., & Brennan, B., 2014.** Emerging phleboviruses. *Current opinion in virology*, 5, 50-57.

**Ehrnst, A., Peters, C. J., Niklasson, B., Svedmyr, A., & Holmgren, B., 1985.** Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *The lancet*, 325(8439), 1212-1213.



- Estrada-Peña, A.,** Bouattour, A., Camicas, J., & Walker, A. 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species. Zaragoza: University of Zaragoza Pres, 128.
- Estrada-Peña, A.,** Palomar, A. M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., ... & Oteo, J. A., 2012. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging infectious diseases*, 18(1), 179.
- Estrada-Peña, A.,** Hubálek, Z., & Rudolf, I., 2013. Tick-transmitted viruses and climate change. *Viral Infections and Global Change*, 573-602.
- Figueira, L,** 2016. Tese Mestrado: Caracterização preliminar de vírus de carraças tendo por base a amplificação dirigida *versus* amplificação não-dirigida de sequências genómicas virais.
- Filipe, A. R.,** Calisher, C. H., & Lazwick, J., 1985. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta virologica*, 29(4), 324-328.
- Filipe, A. R.,** Alves, M. J., Karabatsos, N., de Matos, A. A., Nuncio, M. S., & Bacellar, F., 1994. Palma virus, a new Bunyaviridae isolated from ticks in Portugal. *Intervirology*, 37(6), 348-351.
- Guu, T. S.,** Zheng, W., & Tao, Y. J., 2012. Bunyavirus: structure and replication. In *Viral Molecular Machines* (pp. 245-266). Springer US.
- Hall, T. A.,** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* Vol. 41, No. 41, pp. 95-98.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
- Hornak, K. E.,** Lanchy, J. M., & Lodmell, J. S., 2016. RNA Encapsidation and Packaging in the Phleboviruses. *Viruses*, 8(7), 194.
- Hubálek, Z.** 2009. Biogeography of tick-borne Bhanja virus (Bunyaviridae) in Europe. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.

**Hubálek, Z., & Rudolf, I., 2012.** Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology research*, 111(1), 9-36.

**ICTV, 2017.** <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (acesso a 29/09/17).

**INSA, Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. Departamento de Doenças Infeciosas, 2017.** REVIVE 2016 Culicídeos e Ixodídeos, Rede de vigilância de Vetores. CEVDI/INSA

**Katoh, K, Misawa, K, Kuma, K, Miyata, T, 2002.** MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, Vol. 30, N 14, 3059-3066.

**Katoh, K., & Standley, D. M., 2013.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

**Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., & Nuttall, P. A., 2017.** Tick-Borne Viruses and Biological Processes at the Tick-Host-Virus Interface. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 339.

**Kobayashi, D., Ohashi, M., Osei, J. H., Agbosu, E., Opoku, M., Agbekudzi, A., ... & Dadzie, S., 2017.** Detection of a novel putative phlebovirus and first isolation of Dugbe virus from ticks in Accra, Ghana. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(4), 640-645.

**Kosoy, O. I., Lambert, A. J., Hawkinson, D. J., Pastula, D. M., Goldsmith, C. S., Hunt, D. C., & Staples, J. E., 2015.** Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerging infectious diseases*, 21(5), 760.

**Kuno, G., & Chang, G. J. J., 2005.** Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 608-637.

**Labuda, M., Alves, M. J., Eleckova, E., Kozuch, O., & Filipe, A. R., 1997.** Transmission of tick-borne bunyaviruses by cofeeding ixodid ticks. *Acta virologica*, 41, 325-328.

**Labuda, M., & Nuttall, P. A., 2004.** Tick-borne viruses. *Parasitology*, 129(S1), S221-S245

**Lambert, A. J., & Lanciotti, R. S., 2009.** Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the

Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *Journal of clinical microbiology*, 47(8), 2398-2404.

**Lani, R.,** Moghaddam, E., Haghani, A., Chang, L. Y., AbuBakar, S., & Zandi, K., 2014. Tick-borne viruses: a review from the perspective of therapeutic approaches. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(5), 457-465.

**Li, C. X.,** Shi, M., Tian, J. H., Lin, X. D., Kang, Y. J., Chen, L. J., ... & Zhang, Y. Z., 2015. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*, 4, e05378.

**Liu, D. Y.,** Tesh, R. B., da Rosa, A. P. T., Peters, C. J., Yang, Z., Guzman, H., & Xiao, S. Y., 2003. Phylogenetic relationships among members of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *Journal of general virology*, 84(2), 465-473.

**McMullan, L. K.,** Folk, S. M., Kelly, A. J., MacNeil, A., Goldsmith, C. S., Metcalfe, M. G., ... & Nicholson, W. L. 2012. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *New England Journal of Medicine*, 367(9), 834-841.

**Mansfield, K. L.,** Jizhou, L., Phipps, L. P., & Johnson, N., 2017. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 298.

**Matsuno, K.,** Weisend, C., da Rosa, A. P. T., Anzick, S. L., Dahlstrom, E., Porcella, S. F., ... & Ebihara, H., 2013. Characterization of the Bhanja serogroup viruses (Bunyaviridae): a novel species of the genus Phlebovirus and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. *Journal of virology*, 87(7), 3719-3728.

**Matsuno, K.,** Weisend, C., Kajihara, M., Matysiak, C., Williamson, B. N., Simuunza, M., ... & Ebihara, H., 2015. Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus. *Journal of virology*, 89(1), 594-604.

**Negredo, A.,** de la Calle-Prieto, F., Palencia-Herrejón, E., Mora-Rillo, M., Astray-Mochales, J., Sánchez-Seco, M. P., ... & Keough-Delgado, E., 2017. Autochthonous

Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 154-161.

**Núncio**, M. S., Silva, M. S., Sousa, R., Santos, A., Carvalho, I. L. 2011. Formação Revive Carraças, 1ª edição. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

**Núncio**, M. S., Alves, M. J., 2014. Doenças Associadas a Artrópodes Vetores e Roedores. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

**Nuttall**, P. A., & Labuda, M., 2003. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick–host interface. *Advances in virus research*, 60, 233-272.

**Palacios**, G., Savji, N., da Rosa, A. T., Guzman, H., Yu, X., Desai, A., ... & Tesh, R., 2013. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *Journal of virology*, JVI-02719.

**Papa**, A., Kontana, A., Tsioka, K., Chaligiannis, I., & Sotiraki, S., 2016. Novel phleboviruses detected in ticks, Greece. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 690-693.

**Papa**, A., Kontana, A., Tsioka, K., Saratsis, A., & Sotiraki, S., 2017. Novel phlebovirus detected in *Haemaphysalis parva* ticks in a Greek island. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(1), 157-160.

**Pereira**, A., Figueira, L., Nunes, M., Esteves, A., Cotão, A. J., Vieira, M. L., Maia, C., Campino, L., Parreira, R., 2016. Multiple flebovírus (*Bunyaviridae*) genetic lineages in *Rhipicephalus*, *Hyalomma* and *Dermacentor* ticks from southern Europe (Portugal). *Ticks and Tick-borne Diseases* 8, 45–52.

**Pérez-Eid**, C. 2007. Les tiques: identification, biologie, importance médicale et vétérinaire. Lavoisier.

**Plyusnin**, A., Beaty, B.J., Elliott, R.M., Goldbach, R., Kormelink, R., Lundkvist, A., Schmaljohn, C.S., Tesh, R.B., 2011. Family *Bunyaviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom, pp 725-741.

**Prinz**, M., Fuchs, J., Ehrmann, S., Scherer-Lorenzen, M., Kochs, G., & Panning, M., 2017. Molecular identification of novel phlebovirus sequences in European ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P., 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
- Sambrook, J., Green, M., T., 2012.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santos, L., Simões, J., Costa, R., Martins, S., Lecour, H., 2007.** Toscana virus meningitis in Portugal, 2002–2005. *Euro Surveill.* 12, E3–4.
- Savage, H. M., Godsey Jr, M. S., Lambert, A., Panella, N. A., Burkhalter, K. L., Harmon, J. R., ... & Nicholson, W. L., 2013.** First detection of heartland virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) from field collected arthropods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 89(3), 445-452.
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., & Pupko, T., 2015.** GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic acids research*, 43(W1), W7-W14.
- Silva, M. M., Santos, A. S., Formosinho, P., Bacellar, F., 2006.** Carraças associadas a patologias em Portugal. *Acta Méd Port*, 19, 39-48.
- Simpson, D. I. H., Knight, E. M., Courtois, G. H., Williams, M. C., Weinbren, M. P., & Kibukamusoke, J. W., 1967.** Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. Part 1. Human isolations-clinical notes. *East African medical journal*, 44(2), 87-92.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tokarz, R., Williams, S.H., Sameroff, S., Sanchez, Leon, M., Jain, K., Lipkin, W.I., 2014.** Virome analysis of *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis* ticks reveals novel highly divergent vertebrate and invertebrate viruses. *J Virol* 88:11480-11492.

**van Poelwijk**, F., Prins, M., & Goldbach, R., 1997. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *Journal of general virology*, 78(3), 543-546.

**Vijaykrishna**, D., Mukerji, R., & Smith, G. J. (2015). RNA virus reassortment: an evolutionary mechanism for host jumps and immune evasion. *PLoS pathogens*, 11(7), e1004902.

**Yu**, X. J., Liang, M. F., Zhang, S. Y., Liu, Y., Li, J. D., Sun, Y. L., ... & Qu, J., 2011. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *New England Journal of Medicine*, 364(16), 1523-1532.

**Xia**, H., Hu, C., Zhang, D., Tang, S., Zhang, Z., Kou, Z., ... & Li, T., 2015. Metagenomic profile of the viral communities in Rhipicephalus spp. ticks from Yunnan, China. *PloS one*, 10(3), e0121609.

**Xu**, B., Liu, L., Huang, X., Ma, H., Zhang, Y., Du, Y., ... & Zhang, S., 2011. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. *PLoS pathogens*, 7(11), e1002369.

**Anexos**

# **Anexo I**



## BOLETIM DE COLHEITAS DE IXODIDEOS

### Mónica Nunes doutoramento

Coletor: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Colheita N<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

Concelho: \_\_\_\_\_ Freguesia: \_\_\_\_\_

Localidade: \_\_\_\_\_ Coordenadas GPS: \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_ °C Humidade relativa: \_\_\_\_\_ %

#### Condições atmosféricas:

##### Precipitação

Nula  Fraca  Moderada  Forte

##### Visibilidade

Nula  Fraca  Moderada  Boa

##### Vento

Nulo  Fraco  Moderado  Forte

#### Método de Colheita:

##### 1. Vegetação

Número de coletores 1  2  3  Mais de 3  Quantos? \_\_\_\_\_

Tempo de execução: \_\_\_\_\_ min

Trajeto percorrido: \_\_\_\_\_ m

##### Tipo de vegetação:

1 – Vegetação do tipo herbácea (pastagem).

2 – Vegetação do tipo arbustiva.

3 – Vegetação arborea (floresta/bosque).

## 2. Hospedeiro

HOMEM

CÃO

OUTRO

QUAL? \_\_\_\_\_

Número de hospedeiros pesquisados: \_\_\_\_\_

Estimativa do número de ixodídeos que parasitam o animal: 1 - 4  11 - 20  > 50

5 - 10  21 - 50

Local de remoção no hospedeiro: \_\_\_\_\_



### Habitat/Utilização Humana:

- 1 - Pastagem / zona agrícola
- 2 - Zona de caça
- 3 - Limite de habitação / Jardim público
- 8 - Outra \_\_\_\_\_

### Notas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

# **Anexo II**

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS

Observador(es): \_\_\_\_\_

### DADOS DA COLHEITA

Animal / solo: \_\_\_\_\_ Total de ixodídeos: \_\_\_\_\_

Data de recolha: \_\_\_\_\_ Localidade: \_\_\_\_\_

Idade do animal : Jovem  Sub-adulto  Adulto

Sexo: M  F  Gestante: S  N

### IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS

Data de observação: \_\_\_\_\_

Género: \_\_\_\_\_ Espécie: \_\_\_\_\_

Características: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_

Larvas: \_\_\_\_\_ Ninfas: \_\_\_\_\_ Adultos: \_\_\_\_\_

Total Machos: \_\_\_\_\_ Total Fêmeas: \_\_\_\_\_ Fêmeas engorgitadas: \_\_\_\_\_

---

Data de observação: \_\_\_\_\_

Género: \_\_\_\_\_ Espécie: \_\_\_\_\_

Características: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_

Larvas: \_\_\_\_\_ Ninfas: \_\_\_\_\_ Adultos: \_\_\_\_\_

Total Machos: \_\_\_\_\_ Total Fêmeas: \_\_\_\_\_ Fêmeas engorgitadas: \_\_\_\_\_

# **Anexo III**



Tabela: Caracterização da população de ixodídeos estudada

Pool	Nº Ixodídeos	Estádio/ Género	Espécie	Origem Geográfica	Data Colheita	Origem da Colheita	Positivo/Negativo Phlebovirus (L)
R.2013.1*	1	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ria Formosa (Olhão)	05_2013	Vegetação	Negativo
R.2013.2*	1	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ria Formosa (Olhão)	05_2013	Vegetação	Negativo
R.L1*	3	Adulto Masc.	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Vila Real	ND	Javali	Negativo
R.L6*	4	Adulto Fem.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Vila Real	ND	Javali	Negativo
R.VRU19*	9	Adulto Masc.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Vila Real	ND	Javali	Negativo
R.VRU20*	6	Adulto Fem.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Vila Real	ND	Javali	Negativo
R.VRU21*	5	Adulto Fem.	<i>Ixodes ricinus</i>	Vila Real	ND	Javali	Negativo
R.BR11*	5	Adulto Masc.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Bragança	ND	Javali	Negativo
R.BR17*	4	Adulto Fem.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Bragança	ND	Javali	Negativo
R.BR27*	6	Adulto Fem.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Bragança	ND	Javali	Negativo
R.BR30*	6	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Bragança	ND	Javali	Positivo
R2015*	NA	Ovos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cadaval (Lisboa)	04_2015	Cão	Positivo**
R.M*	8	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Monsanto (Idanha-a-Nova)	05_2015	Humano	Positivo**
R1.1	6	Ninfas	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Tapada Nacional de Mafra	05_2016	Vegetação	Negativo
R1.2	6	Adulto Masc.	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Tapada Nacional de Mafra	05_2016	Vegetação	Negativo
R1.3	11	Adulto Masc.	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Tapada Nacional de Mafra	05_2016	Vegetação	Negativo
R1.4	6	Adulto Fem.	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Tapada Nacional de Mafra	05_2016	Vegetação	Negativo
R1.5	100	Larvas	<i>Ixodes ricinus</i>	Tapada Nacional de Mafra	05_2016	Vegetação	Negativo
R3.1	17	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ria Formosa (Olhão)	05_2016	Cão	Positivo**
R3.2	6	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ria Formosa (Olhão)	05_2016	Cão	Positivo
R5.1	7	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ponta Delgada (Açores)	06_2016	Cão	Positivo**
R6.1	3	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Vale da Abrunheira (Setúbal)	06_2016	Cão	Positivo**
R6.2	3	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Vale da Abrunheira (Setúbal)	06_2016	Cão	Positivo
R7.1	4	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Arouca (Aveiro)	06_2016	Cão	Positivo
R7.2	NA	Ovos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Arouca (Aveiro)	06_2016	Cão	Positivo
R8.1	13	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Chaves (Vila Real)	06_2016	Vegetação	Positivo**
R8.4	8	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Chaves (Vila Real)	06_2016	Vegetação	Positivo
R11.1	9	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	07_2016	Vegetação	Negativo
R11.2	8	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	07_2016	Vegetação	Positivo
R11.3	15	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	07_2016	Vegetação	Positivo
R11.4	15	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	07_2016	Vegetação	Positivo
R13.1	7	Ninfas	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Ria Formosa (Olhão)	04_2016	Pássaro	Negativo
R13.2	8	Ninfas	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Ria Formosa (Olhão)	04_2016	Pássaro	Negativo
R13.3	9	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ria Formosa (Olhão)	04_2016	Pássaro	Positivo
R14.2	20	Ninfas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Funchal (Madeira)	08_2016	Cão	Positivo
R18	4	Ninfas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ponta Delgada (Açores)	09_2016	Cão	Positivo

<b>R19</b>	3	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Serpa (Beja)	08_2016	Cão	Positivo
<b>R20.1</b>	4	Adulto Masc.	<i>Ixodes ricinus</i>	Tapada Nacional de Mafra	10_2016	Vegetação	Negativo
<b>R20.2</b>	1	Adulto Masc.	<i>Dermacentor marginatus</i>	Tapada Nacional de Mafra	10_2016	Vegetação	Negativo
<b>R21</b>	32	Ninfas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Proença-a-Nova	10_2016	Cão	Positivo
<b>R22</b>	14	Ninfas	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Serpa	10_2016	Lebre	Negativo
<b>R26.1</b>	29	Ninfas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Torres Vedras	11_2016	Cão	Negativo
<b>R27.1</b>	5	Adulto F. Eng	<i>Ixodes hexagonus</i>	Funchal (Madeira)	11_2016	Cão	Negativo
<b>R31.1</b>	3	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.2</b>	3	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.3</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.4</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.5</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.6</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.7</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R31.8</b>	3	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Funchal (Madeira)	01_2017	Cão	Negativo
<b>R32</b>	4	Adulto F. Eng	<i>Dermacentor marginatus</i>	Badajoz (Espanha)	02_2017	Cavalo	Negativo
<b>R37</b>	3	Adulto F. Eng	<i>Dermacentor marginatus</i>	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R37.1</b>	5	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R38</b>	6	Adulto Masc.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Pereruela (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R39</b>	3	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Vale de Minque (Salamanca, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R42.1</b>	8	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R42.2</b>	13	Adulto Masc.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R44</b>	2	Adulto Fem.	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Gáname (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Positivo
<b>R46</b>	7	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cartaxo (Santarém)	03_2017	Vegetação	Positivo
<b>R47</b>	3	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Garciaz (Cáceres, Espanha)	03_2017	Bovino	Positivo
<b>R49.1</b>	6	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Peñausende (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R49.2</b>	17	Adulto Masc.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Peñausende (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R50</b>	21	Adulto Masc.	<i>Hyalomma lusitanicum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R50.1</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Dermacentor marginatus</i>	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R50.2</b>	5	Adulto Masc.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R51</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Pelayos (Salamanca, Espanha)	03_2017	Cão	Positivo
<b>R52</b>	14	Adulto Masc.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Ledesma (Salamanca, Espanha)	03_2017	Bovino	Negativo
<b>R53</b>	5	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Fresno de Sayago (Zamora, Espanha)	03_2017	Cão	Positivo
<b>R54</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Siete Iglesias de Trabancos (Valladolid, Espanha)	04_2017	Cão	Positivo
<b>R55</b>	2	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Tabera Arriba (Salamanca, Espanha)	04_2017	Porco	Positivo
<b>R56</b>	5	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Montemor-o-Novo (Évora)	04_2017	Cão	Positivo
<b>R57</b>	10	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cadaval (Lisboa)	04_2017	Cão	Positivo
<b>R58.1</b>	NA	Ovos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Proença-a-Nova	04_2017	Cão	Positivo



<b>R58.2</b>	7	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Proença-a-Nova	04_2017	Cão	Positivo
<b>R58.3</b>	4	Adulto F. Eng	<i>Ixodes ricinus</i>	Proença-a-Nova	04_2017	Cão	Negativo
<b>R59</b>	5	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Robledillo de Trujilo (Cáceres, Espanha)	04_2017	Bovino	Negativo
<b>R60</b>	17	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Figueruela de Sayago (Zamora, Espanha)	04_2017	Bovino	Negativo
<b>R61</b>	2	Adulto F. Eng	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	04_2017	Cão	Positivo
<b>R63.1</b>	4	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	04_2017	Vegetação	Positivo
<b>R63.2</b>	8	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Dunas São Jacinto (Aveiro)	04_2017	Vegetação	Positivo
<b>R64</b>	4	Adulto Fem.	<i>Hyalomma marginatum</i> ***	Moreleja de Sayago (Zamora, Espanha)	04_2017	Bovino	Positivo**
<b>R67</b>	14	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Miranda (Salamanca, Espanha)	05_2017	Raposa	Positivo**
<b>R68</b>	10	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Santiago de la Puebla (Salamanca, Espanha)	04_2017	Texugo	Positivo**
<b>R69.1</b>	5	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Portalegre	05_2017	Cão	Positivo**
<b>R69.2</b>	9	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Portalegre	05_2017	Bovino	Positivo**
<b>R70_5</b>	3	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Elvas (Portalegre)	05_2017	Cavalo	Positivo**
<b>R71</b>	4	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Castelo Branco	05_2017	Cão	Positivo**
<b>R72</b>	14	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Castelo Branco	05_2017	Ovelha	Positivo**
<b>R73</b>	15	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Sesimbra (Setúbal)	05_2017	Cão	Positivo**
<b>R75</b>	17	Adulto Masc.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Loures (Lisboa)	05_2017	Cão	Positivo**
<b>R76</b>	9	Adulto Fem.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Viseu	06_2017	Cão	Positivo**

\*Ixodídeos obtidos no âmbito de outros estudos do IHMT

\*\*Amostras selecionadas para amplificação de fragmento do segmento S de *Phlebovirus*

\*\*\*Amostras sujeitas a amplificação de fragmentos de DNA de CCHFV por *nested*-PCR

ND – Não foi possível obter as datas de colheita por mês/ano

# **Anexo IV**

