



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA DA AMAZÔNIA

**ESTUDO SOBRE O POTENCIAL DE INFECÇÃO DA CEPA BRASILEIRA DE
WEST NILE VIRUS EM *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (DIPTERA: CULICIDAE)
DA REGIÃO AMAZÔNICA**

LÚCIA ALINE MOURA REIS

Belém-Pará
2021



LÚCIA ALINE MOURA REIS

**ESTUDO SOBRE O POTENCIAL DE INFECÇÃO DA CEPA BRASILEIRA
DE WEST NILE VIRUS EM *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (DIPTERA:
CULICIDAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto

Co-Orientador (a): Prof. Dra. Eliana Vieira Pinto da Silva.

Belém-Pará
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA

Reis, Lúcia Aline Moura.

Estudo sobre o potencial de infecção da cepa brasileira de *West Nile virus* em *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (*Diptera: Culicidae*) da Região Amazônica. / Lúcia Aline Moura Reis. – Belém-Pa: UEPA; IEC, 2021.

69 f.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto.

Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária da Amazônia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Amazônia. Universidade do Estado do Pará, Belém, 2021.

1. Competência Vetorial. 2. *Culex quinquefasciatus*. 3. Vírus do Nilo Ocidental. 4. Arbovirus. I. Nunes Neto, Joaquim Pinto, orient. II. Universidade do Estado do Pará. III. Instituto Evandro Chagas. IV. Título.

CDD 22. ed. 616.9



LÚCIA ALINE MOURA REIS

**ESTUDO SOBRE O POTENCIAL DE INFECÇÃO DA CEPA BRASILEIRA DE
WEST NILE VIRUS EM *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (DIPTERA: CULICIDAE)
DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Amazônia, da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
Laboratório de Entomologia Médica,
SAARB/IEC/MS

Coorientador:

Profa. Dra. Eliana Vieira Pinto da Silva
Laboratório de Cultura de Células,
SAARB/IEC/MS

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Livia Carício Martins
Instituto Evandro Chagas (IEC) / Universidade do
Estado do Pará (UEPA)

Profa. Dra. Flávia Barreto dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Profa. Dra. Izis Mônica Carvalho Sucupira
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Belém, 26 de Julho de 2021

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Arbovirus	12
1.2 Família <i>Flaviviridae</i>	13
1.3 <i>West Nile Virus</i> (WNV)	15
1.4 <i>Culex quinquefasciatus</i>	19
1.5 Competência Vetorial	22
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Tipo de Estudo	30
4.2 Local de Pesquisa.....	30
4.3 População de Estudo	30
4.5 Preparação do Estoque Viral.....	31
4.6 Infecção Experimental Oral de Mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i>	32
4.7 Processamento dos Mosquitos	35
4.8 Isolamento Viral.....	36
4.9 Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)	37
4.10 Titulação Viral	38
4.11 Cálculo das Taxas de Infecção, Disseminação e Transmissão	40
4.12 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Taxa de Infecção, Disseminação e Transmissão.....	42
5.2 Titulação Viral	44
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO A.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da organização do genoma de <i>Flavivirus</i> e processamento de poliproteínas.....	13
Figura 2 - Relações filogenéticas entre os quatro grupos de <i>Flavivirus</i>	14
Figura 3 - Distribuição mundial das linhagens de WNV, 2013.....	17
Figura 4 - Distribuição dos casos de <i>West Nile virus</i> em vertebrados por meio de testes sorológicos, moleculares e isolamento viral.	18
Figura 5 - Ciclo de Transmissão do <i>West Nile virus</i>	19
Figura 6 - Distribuição mundial das espécies de mosquito pertencentes ao complexo <i>Culex pipiens</i>	20
Figura 7 - Ciclo Evolutivo do <i>Culex quinquefasciatus</i>	22
Figura 8 - Esquema do tubo digestivo dos insetos.....	23
Figura 9 - Barreiras anatômicas que um arbovirus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo.	24
Figura 10 - Visão esquemática da infecção, disseminação e transmissão de vírus transmitidos por mosquitos.....	25
Figura 11 - Protocolo de preparação do estoque viral da cepa brasileira de WNV realizado de acordo com os protocolos estabelecidos por Tesh (1979) e Beaty, Calisher e Shope (1995). 32	
Figura 12 – Sistema utilizado para infecção experimental de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> com WNV via alimentador artificial do Laboratório de Entomologia Médica da Seção de Arbovirologia e Febre Hemorrágicas (SAARB/IEC).....	33
Figura 13 - Fluxograma da infecção experimental oral de <i>Culex quinquefasciatus</i> com WNV.	34
Figura 14 - Remoção de pernas e asas de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	35
Figura 15 - Extração de saliva do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> experimentalmente infectado por WNV, via salivação em ponteira de polipropileno com SFB, de acordo com procedimento estabelecido por Castro <i>et al.</i> (2004).	36
Figura 16 - Protocolo de isolamento viral em células e imunofluorescência indireta, de acordo com os protocolos estabelecidos por Igarashi (1978) e Gubler <i>et al.</i> (1984).	37
Figura 17 - Protocolo de titulação viral em placadas realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Dulbecco & Vogt (1953).	40
Figura 18 - Taxas de infecção, disseminação e transmissão do WNV em fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> (n=22) oralmente infectadas, de acordo com o dia de pós-infecção (dpi)...	42

Figura 19 - Imunofluorescência Indireta de amostras de corpo, cabeça e saliva de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* infectadas oralmente com a cepa brasileira de WNV.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	Peptídeos Microbianos
CBS	Cabine de Segurança Biológica
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
CMC	Carboximetilcelulose
DENV	<i>Dengue virus</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPI	Dia de pós-infecção
ECP	Efeito Citopático
EUA	Estados Unidos
FAI	Fluído Ascítico Hiperimune
FBS	Soro Fetal Bovino
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
ILHV	<i>Ilheus virus</i>
IMD	<i>Immune Deficiency</i>
ISF	<i>Insect-specific flaviviruses</i>
JAK-STAT	<i>Janus Kinase</i> / Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
JEV	<i>Japanese encephalitis viruses</i>
KW	Teste de Kruskal-Wallis
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MBFV	<i>Mosquito-borne dual-host flaviviruses</i>
MEB	Barreira de Escape do Intestino
MIB	Barreira de Infecção do Intestino Médio
MP	Membrana Peritrófica
MS	Ministério da Saúde
MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i>
NKV	<i>Viruses with known vector</i>
NS	<i>Non-structural</i>
OROV	<i>Oropouche orthobunyavirus</i>
PAMPs	Padrões de Moléculas Associadas a Patógenos
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PFU	Unidade Formadora de Placa
PIE	Período de Incubação Extrínseco
PPO	Cascata de Profenoxidase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SAARB	Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>
SNS	Sistema Nervoso Central
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TBFV	<i>Dual-host tick-borne flaviviruses</i>
USUV	<i>Usutu virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

RESUMO

A Febre do Nilo Ocidental é uma arbovirose causada pelo *West Nile virus* (WNV), cujos principais vetores são mosquitos do gênero *Culex* spp., dentre eles *Culex quinquefasciatus*. A espécie possui hábitos hematofágicos ornitofílicos e antropofílicos, crepusculares e com preferência para oviposição em coleções contendo água estagnada com alto teor de matéria orgânica em decomposição, é muito bem adaptada a ambientes urbanos. As fêmeas de *Culex quinquefasciatus* ao realizarem o repasto sanguíneo ingerem sangue contendo diversos nutrientes para a maturação dos ovos, assim como estão vulneráveis a vários agentes patogênicos. Logo, ressalta-se que uma importante característica para a disseminação das arboviroses é uma alta competência vetorial, a qual define-se como a capacidade do artrópode ser susceptível a infecção, com multiplicação e disseminação de patógenos pelos tecidos até à saliva, por onde pode ser transmitido em um novo repasto sanguíneo. Com isso, o presente estudo objetivou avaliar a competência vetorial de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* da cidade de Ananindeua, Estado do Pará (Região Amazônica), oralmente infectadas com uma cepa brasileira de WNV (cepa BE AN 854747) a fim de verificar a susceptibilidade dessa população, determinar o título viral nas regiões de corpo, cabeça e saliva e calcular as taxas de infecção, disseminação e transmissão viral. Para isso, os mosquitos foram alimentados artificialmente com 2mL de sangue de carneiro desfibrinado e 2mL de suspensão de células Vero infectadas ($1,4 \times 10^8$ PFU/mL), em seguida realizou-se no 7^o, 14^o e 21^o dia de pós-infecção (dpi) a extração da saliva e segmentação das fêmeas para verificar a presença do vírus utilizando as técnicas de isolamento viral e titulação viral em placas. Foram observadas altas taxas de infecção nos três dpi's analisados (100%), com títulos que variaram de $1,1 \times 10^4$ a 7×10^5 PFU/mL no 7^o dpi, $1,3 \times 10^4$ a $4,3 \times 10^4$ PFU/mL no 14^o dpi e $1,9 \times 10^8$ a $5,1 \times 10^8$ PFU/mL no 21^o dpi, demonstrando alta susceptibilidade da espécie a infecção. A taxa de disseminação foi maior do 21^o dpi com 100% das amostras de cabeça positivas e com títulos entre $1,8 \times 10^7$ e $4,2 \times 10^8$ PFU/mL. A taxa de transmissão também se mostrou mais elevada ao 21^o dpi, com 100% das salivas positivas, com títulos entre $1,3 \times 10^4$ e 4×10^2 PFU/mL. Conclui-se que, a população de *Culex quinquefasciatus* estudada possui alta susceptibilidade a infecção pela cepa brasileira do WNV com elevada competência vetorial e probabilidade de a espécie tornar-se um vetor importante do vírus, uma vez que a cepa brasileira estudada foi capaz de superar as barreiras anatômicas, com constante disseminação viral ao longo dos 21 dias avaliados, permitindo assim sua transmissão para diversos hospedeiros vertebrados, incluindo os invertebrados.

ABSTRACT

West Nile Fever is an arbovirus caused by the *West Nile virus* (WNV), whose main vectors are mosquitoes of the *Culex* spp. genus, including *Culex quinquefasciatus*. The species has crepuscular, ornithophilic and anthropophilic habits, with preference for oviposition in collections containing stagnant water with a high content of decomposing organic matter, it is very well adapted to urban environments, being considered in Brazil the main vector of *Wuchereria bancrofti* causing Filariasis Lymphatic and secondary vector of the *Oropouche orthobunyavirus* (OROV). Females of *Culex quinquefasciatus*, when performing the blood meal, ingesting blood containing several nutrients for egg maturation, as well as being vulnerable to various pathogens. Therefore, it is noteworthy that an important characteristic for the dissemination of arboviruses is a high vector competence, which is defined as the ability of the arthropod to be susceptible to infection, with multiplication and dissemination of pathogens through tissues to saliva, where it can be transmitted in a new blood meal. Thus, the present study aimed to evaluate the vector competence of females of *Culex quinquefasciatus* from the Ananindeua city (Amazon Region) orally infected with WNV (strain BE AN 854747) to verify the viability of infection in this population, to determine the viral titer in the body and head regions and also saliva, in order to calculate WNV infection, dissemination and transmission rates. For this purpose, the mosquitoes were artificially fed with 4mL of defibrinated sheep blood containing 2mL of infected Vero cell suspension, then, on the 7th, 14th and 21st day of post-infection (dpi) the saliva extraction and segmentation of the engorged females was performed to verify the presence of the virus using the techniques of Viral Isolation and Viral Titration in plates. High infection rates were observed in the three dpi's analyzed (100%), with titers ranging from $1,1 \times 10^4$ to 7×10^5 PFU/mL on the 7th dpi, $1,3 \times 10^4$ to $4,3 \times 10^4$ PFU/mL on the 14th dpi and $1,9 \times 10^8$ to $5,1 \times 10^8$ PFU/mL at 21st dpi, demonstrating high susceptibility of the species to infection. The dissemination rate was higher at 21st dpi with 100% of the positive samples and titers between $1,8 \times 10^7$ and $4,2 \times 10^8$ PFU/mL. The transmission rate was also higher in samples from the 21st dpi, with 100% of positive saliva, with titers between $1,3 \times 10^4$ and 4×10^2 PFU/mL. We concluded that the population of *Culex quinquefasciatus* studied has a high susceptibility to WNV infection with high vector competence and probability of the species becoming an important vector of the virus, since the Brazilian strain studied was able to overcome anatomical barriers, with constant viral dissemination over the 21 days evaluated, thus allowing its transmission to animals and humans.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVIRUS

Os arbovirus (*Arthropod-borne viruses*) são caracterizados como vírus que realizam parte de seu ciclo replicativo dentro de artrópodes sendo transmitidos para animais vertebrados pelos mesmos (Lopes *et al.*, 2014).

O ciclo de transmissão silvestre dos arbovirus ocorre a partir da picada de um artrópode hematófago, exemplo *Aedes (Stg.) aegypti*, *Aedes (Och.) serratus*, *Aedes (Stg.) albopictus*, *Culex (Cux.) pipiens* e *Haemagogus (Hag.) janthinomys*, em um animal silvestre virêmico que atuam como hospedeiros de amplificação. O ciclo prossegue com a replicação do vírus no organismo do artrópode até chegar na saliva por onde pode ser transmitido para outros animais, bem como para o ser humano que se caracteriza como hospedeiro acidental (Donalisio; Freitas; Von Zuben, 2017; Lopes *et al.*, 2014).

O ciclo dos arbovirus pode ocorrer tanto em ambiente silvestre, quanto em regiões periurbanas e urbanas, devido principalmente ao grande avanço populacional para regiões de mata onde são encontradas uma grande quantidade de vetores como o mosquito *Culex (Cux.) quinquefasciatus* (Donalisio; Freitas; Von Zuben, 2017; Lopes *et al.*, 2014; Silva, Angerami, 2008).

As manifestações clínicas de infecções por arbovirus podem ser divididas em cinco formas, as assintomáticas, doença febril (indiferenciada, moderada ou grave), em erupções cutâneas, quadros de síndromes neurológicas (encefalites) e em síndromes hemorrágicas (Donalisio *et al.*, 2017; Lima-Camara, 2016; Lopes *et al.*, 2014; Viana *et al.*, 2018).

Atualmente, os arbovirus conhecidos que infectam humanos e outros vertebrados são pertencentes a sete famílias virais, *Peribunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Asfarviridae*, *Phenuiviridae* (Donalisio *et al.*, 2017; ICTV, 2019; Lopes *et al.*, 2014; Pimentel *et al.*, 2019; Vasilakis *et al.*, 2019).

Lopes *et al.* (2014) e Donalisio *et al.* (2017) destacam que, devido ao grande potencial de dispersão e adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros, as arboviroses caracterizam-se como importantes ameaças de saúde em diversos países, principalmente aqueles com clima tropical, em virtude de a temperatura favorecer a replicação viral, bem como as mudanças climáticas, os desmatamentos ocasionados pela ocupação desordenada, migração populacional, precariedade das condições sanitárias etc. serem fatores que contribuem para a amplificação e transmissão viral.

1.2 Família *Flaviviridae*

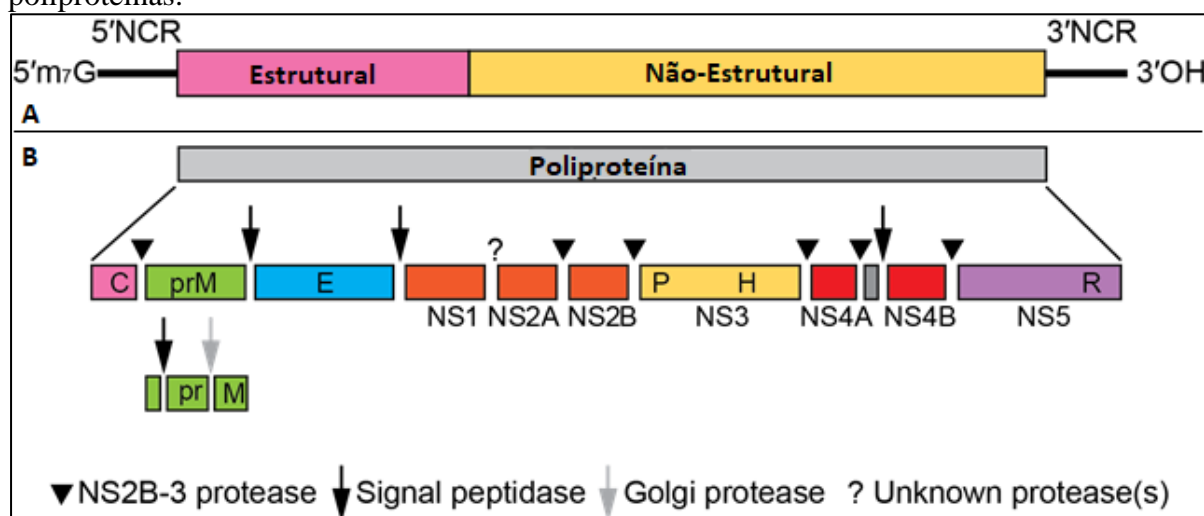
O termo *Flavivirus* é originário do latim, *Flavus* que significa amarelo, referindo-se à espécie viral do *Yellow Fever virus* (YFV) que causa icterícia devido a disfunção hepática resultante da infecção pelos vírus (Rocha *et al.*, 2014; Westaway *et al.*, 1985).

A família *Flaviviridae* possui quatro gêneros, *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. O gênero *Flavivirus* possui 53 espécies de vírus, dentre eles, destacam-se os *Dengue virus* (DENV), *Ilheus virus* (ILHV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), *West Nile virus* (WNV), YFV e *Zika virus* (ZIKV) (ICTV, 2021; Goenaga *et al.* 2015).

As partículas virais dos *Flavivirus* possuem em média de 40 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro, simetria icosaédrica com capsídeo proteico (C) envolvido por um envelope lipídico onde inserem-se as proteínas de membrana (M) e as espículas glicoproteicas (E) (ICTV, 2021).

São formados por um genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva [(+) ssRNA], não segmentado, medindo aproximadamente 11 kb. O genoma dos *Flavivirus* codifica três proteínas estruturais, a proteína C do capsídeo proteico, proteína pré-M do envelope e a proteína E, bem como, sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que possuem funções reguladoras e de expressão viral, como replicação, virulência e patogenicidade (**Figura 1**) (Cruz *et al.*, 1997; ICTV, 2021; Lopes *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014).

Figura 1 - Esquema da organização do genoma de *Flavivirus* e processamento de poliproteínas.

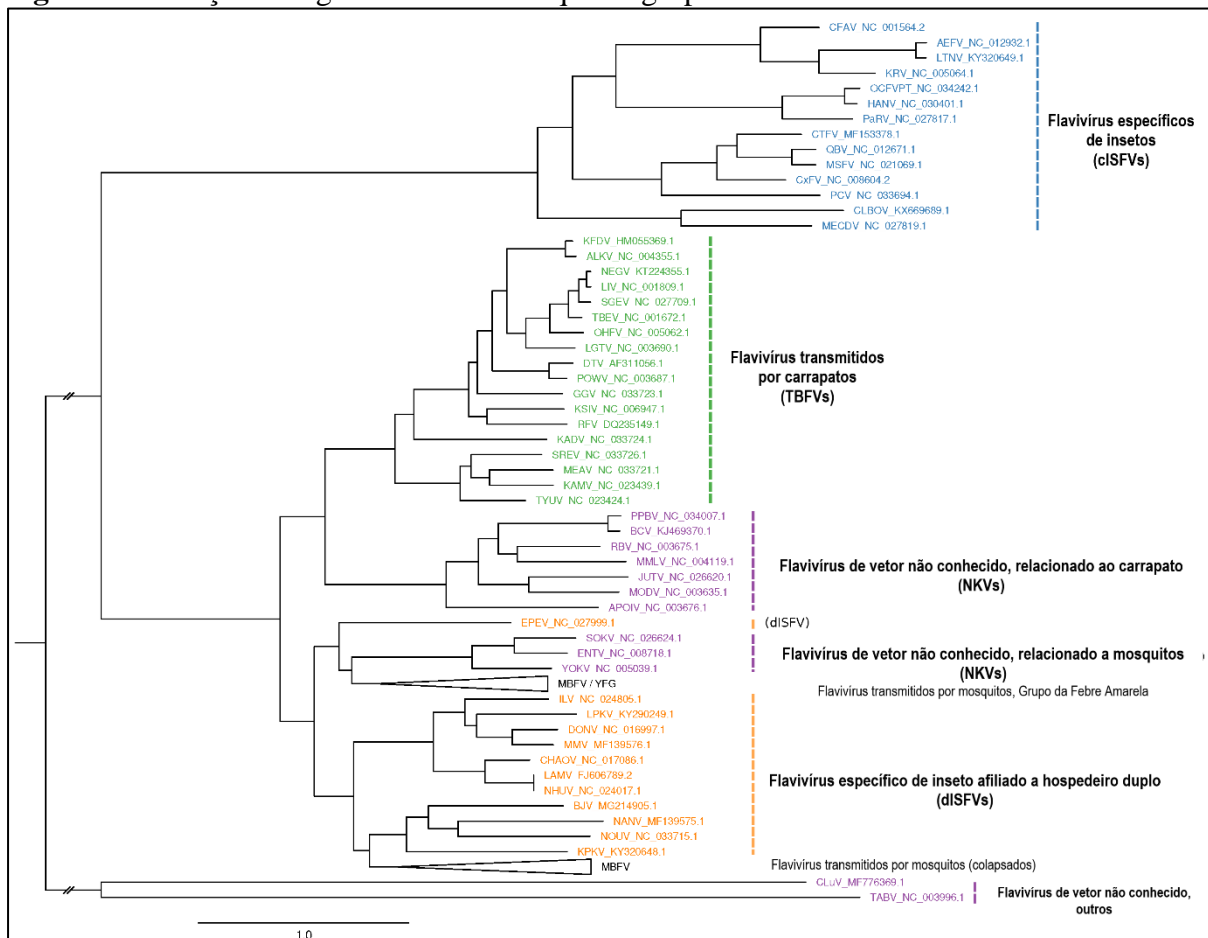


Fonte: IVTC, 2019.

Legenda: A: genoma viral com as regiões codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais e os 5' e 3'-NCRs. **B:** proteínas virais geradas pela cascata de processamento proteolítico. Os símbolos P, H e R indicam a localização dos domínios NS3 protease, RNA NS3 helicase e NS5 RdRP, respectivamente.

Goenaga *et al.* (2015), Cook *et al.* (2012), Gaunt *et al.* (2001) e Ochsenreiter, Hofacker e Wolfinger (2019) salientam que análises filogenéticas de cepas de flavivírus revelaram que tais vírus agrupam-se em quatro grupos de acordo com a preferência por hospedeiros. Sendo estes, os flavivírus específicos para insetos (*insect-specific flaviviruses* - ISFs), flavivírus transmitidos por carrapatos de duplo hospedeiro (*dual-host tick-borne flaviviruses* – TBFVs), vírus sem vetor conhecido (*viruses with no known vector* - NKV) e flavivírus transmitido por mosquito com hospedeiro duplo (*mosquito-borne dual-host flaviviruses* - MBFVs). Segundo os autores, todos os flavivírus relacionados a doenças humanas que já foram descritos, pertencem aos grupos MBFV e TBFV, dentre eles o DENV sorotipo 1 a 4, YFV, *Japanese encephalitis virus* (JEV), WNV, SLEV e *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) (**Figura 2**).

Figura 2 - Relações filogenéticas entre os quatro grupos de *Flavivirus*.



Fonte: Ochsenreiter, Hofacker, Wolfinger, 2019.

Legenda: Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gênero *Flavivirus*, destacando os principais grupos ISFVs (azul), diSFVs (laranja), TBFVs (verde) e NKVs (magenta) A árvore foi calculada a partir de um

alinhamento MAFFT de sequências completas de aminoácidos de poliproteínas com iq-tree. figura renderizada com *FigTree*.

1.3 WEST NILE VIRUS (WNV)

O *West Nile virus* (WNV) caracteriza-se como um patógeno neurotrópico causador da Febre do Nilo Ocidental, o qual pode desenvolver quadros neurológicos. As infecções pelo vírus em humanos costumam ser assintomáticas, com apenas um em cada quatro indivíduos evoluindo para a Febre do Nilo Ocidental, na qual a sintomatologia pode variar desde febre, mialgia, meningoencefalite e casos de óbitos. As encefalites ocorrem em menos de 1% das infecções, contudo, o acometimento neurológico pode provocar paralisia flácida, sendo os idosos e lactentes mais suscetíveis ao comprometimento neurológico resultando em óbito (Alves *et al.*, 2012; Colpitts *et al.*, 2012, Vogels *et al.*, 2017).

De acordo com o CDC (2002) há descrito um caso de transmissão por acidente de trabalho, no qual um microbiologista feriu-se com um bisturi contaminado ao realizar a coleta de material de cérebro de camundongo infectado e quatro dias após a lesão apresentou sintomas de febre (38,3°C), cefaleia, mialgia, mal-estar, calafrios, sudorese, edema dos gânglios linfáticos pós-auriculares e anorexia, além de *rash* maculopapular na face, tórax, braço e pernas por um período de três dias com desaparecimento gradual.

Segundo Colpitts *et al.* (2012) e Soares *et al.* (2010) a infecção pelo WNV costuma ter um período de incubação de dois a 14 dias, podendo ser identificado anticorpos IgM anti-WNV em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo o mesmo muito utilizado para o diagnóstico, entretanto, observa-se reatividade cruzada com outros flavivírus relacionados pertencente ao mesmo grupo antigênico como o vírus da JEV, SLEV, entre outros.

O WNV foi isolado pela primeira vez em 1937, a partir de um caso humano no distrito de West Nile em Uganda, na África, sendo também detectado em aves no Delta do Nilo, contudo não demonstrando patogenicidade para as mesmas até 1997, quando uma cepa altamente virulenta, causou a morte de várias espécies de aves por encefalite e paralisia (Arjona *et al.*, 2011; Brackney *et al.*, 2011; Smithburn *et al.*, 1940; Taylor, 1955; Work; Hurlbut, 1955).

No verão de 1999, uma cepa encontrada na Tunísia e em Israel foi introduzida no Hemisfério Ocidental, na cidade de Nova York, com transmissão por mosquitos e levando a um alto número de óbitos humanos, aves e equinos por encefalite, e desde então, o vírus se dispersou por outros países da América do Norte, Central e Sul, como Canadá, México, Caribe e Venezuela (Arjona *et al.*, 2011; Brackney *et al.*, 2011; Colpitts *et al.*, 2012; WHO, 2017).

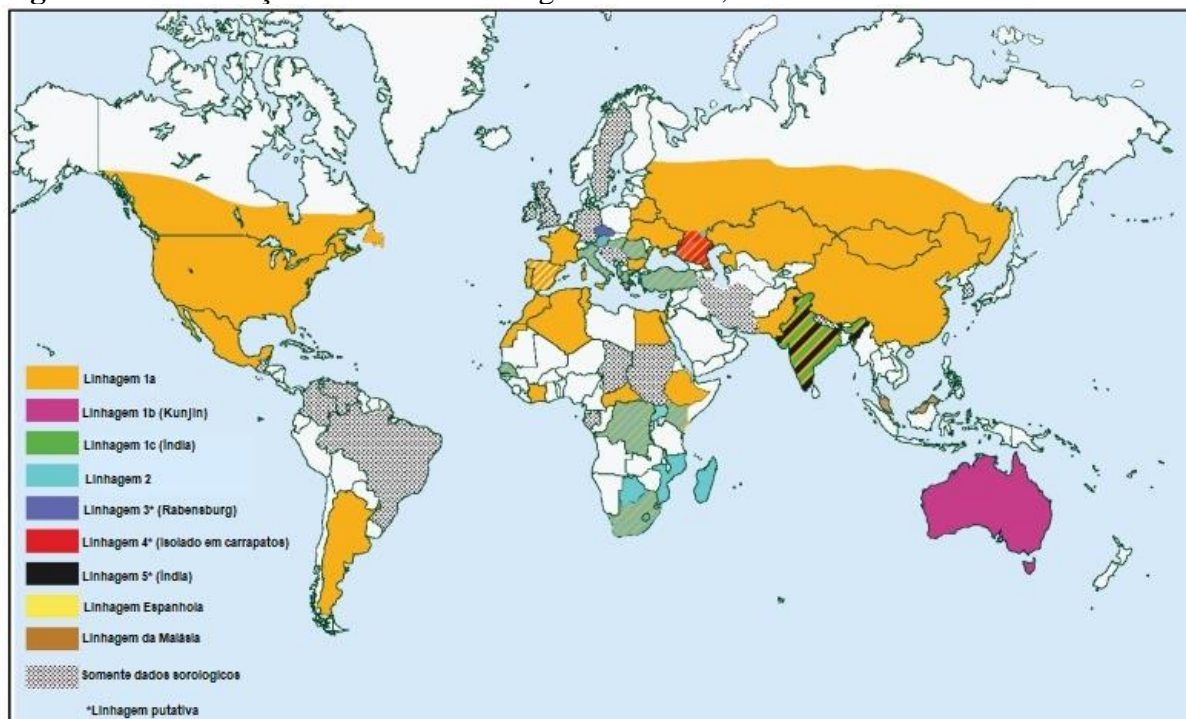
Na América do Sul, o primeiro relato de isolamento foi realizado em 2006, a partir de amostra de equino da Argentina, seguido de amostras de flamingos da Colômbia em 2008 (Martins *et al.*, 2019; WHO, 2017).

No Brasil, o primeiro isolamento do WNV foi realizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) no ano de 2018, de amostras de cérebro e de Sistema Nervoso Central (SNC) de equino adulto provenientes do estado do Espírito Santo, no entanto, evidências sorológicas de exposição ao vírus, foram descritas previamente em equinos e aves nos estados do Mato Grosso e Paraíba (Martins *et al.*, 2019; Melandri *et al.*, 2012; Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013).

Análises filogenéticas demonstram que o primeiro isolado de WNV em 1937, pertence ao sorogrupo do *Japanese encephalitis virus* (JEV), sendo próximo aos vírus *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV) e *Usutu virus* (USUV). O WNV pode ser caracterizado em cinco linhagens, contudo, atualmente, tem-se uma melhor compreensão das linhagens I e II, na qual a linhagem I é epidêmica em diversos países da Europa, América do Norte, Ásia, África e Austrália, sendo responsável pelo surto ocorrido em Nova York em 1999. Já a linhagem II, é encontrada na África Subsaariana e em Madagáscar, contudo, em 2010, foi também identificada na Grécia em um surto com 191 casos notificados (Arjona *et al.*, 2011; Ciota & Kramer, 2013; Fall *et al.*, 2017) (**Figura 3**).

Análises de sequenciamento do primeiro isolado do vírus no Brasil, demonstraram que a cepa BE AN 854747 (*GenBank*: MH643887) pertence a linhagem 1A circulante nos EUA e México (Martins *et al.*, 2019).

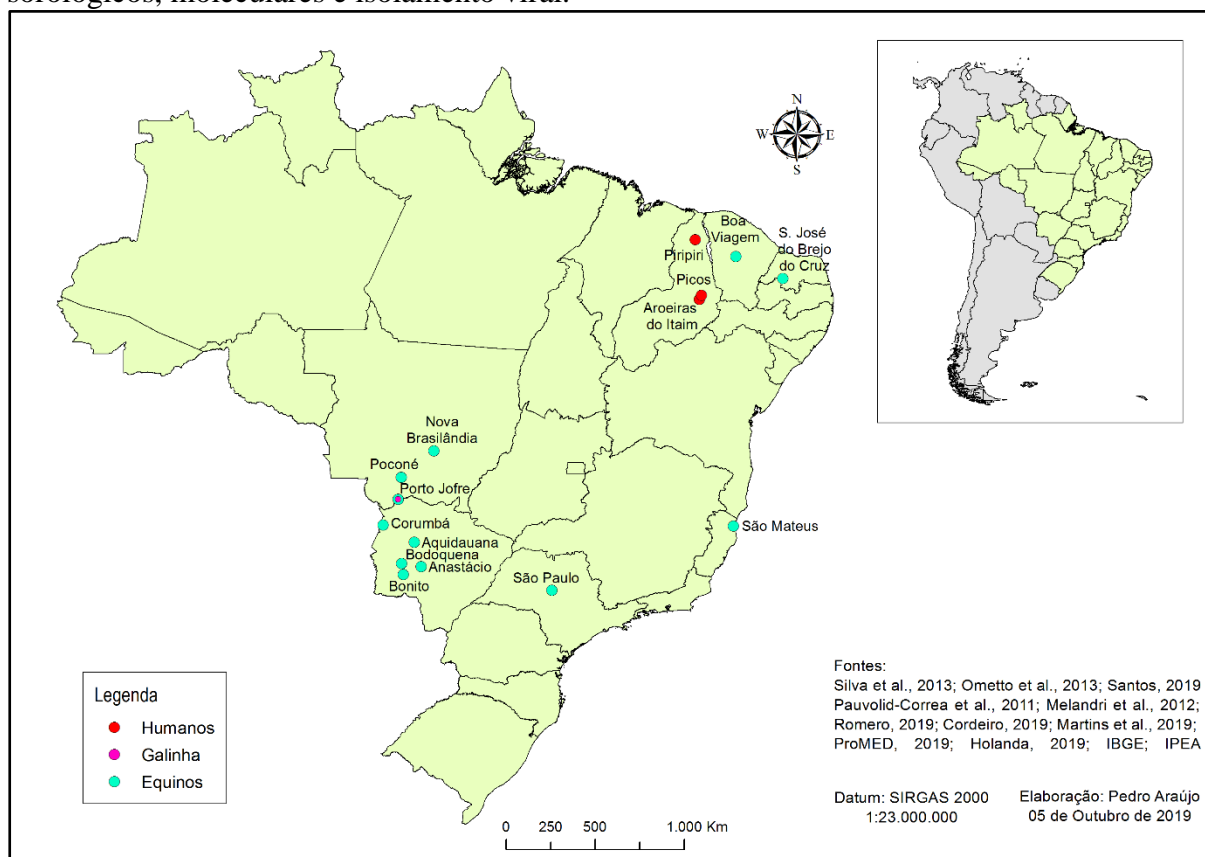
Figura 3 - Distribuição mundial das linhagens de WNV, 2013.



Fonte: Ciota & Kramer, 2013.

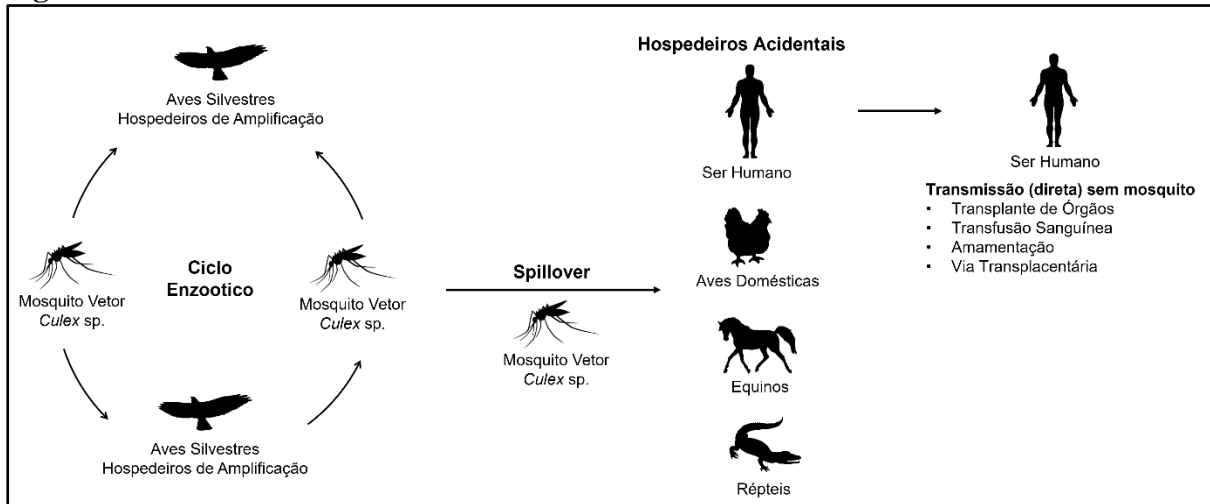
Atualmente, observa-se um crescente número de casos humanos suspeitos da Febre do Nilo Ocidental, principalmente no estado do Piauí, contudo, amostras de equinos positivas para o vírus têm sido identificadas em diversos outros estados como Ceará, Espírito Santo e São Paulo (**Figura 4**). Dessa forma, de acordo com relatório do Ministério da Saúde (MS) acerca do monitoramento da Febre do Nilo Ocidental, até julho de 2019 foram confirmados no país apenas dois casos humanos entre os anos de 2014 e 2017, ambos no estado do Piauí. Contudo, o MS afirma que após a confirmação das infecções observa-se um aumento no número de notificações de casos suspeitos da infecção, devido a uma maior sensibilidade na vigilância epidemiológica dos casos humanos (Brasil, 2019; Cordeiro, 2019; Martins *et al.*, 2019; Romero, 2019; Santos, 2019).

Figura 4 - Distribuição dos casos de *West Nile virus* em vertebrados por meio se testes sorológicos, moleculares e isolamento viral.



De acordo com o *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC) o WNV já foi detectado em 27 espécies de mosquitos nos Estados Unidos, dentre eles mosquitos do gênero *Aedes*, nove do gênero *Anopheles*, uma espécie de *Coquillettidia*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Orthopodomyia* e *Uranotaenia*, 14 espécies do gênero *Culex*, dentre elas o *Culex quinquefasciatus*, seis do gênero *Culiseta* e cinco do gênero *Psorophora* (CDC, 2018).

O ciclo de transmissão enzoótico do WNV é constituído por artrópodes hematófagos, aves como hospedeiros de amplificação e mamíferos (equinos e humanos) como hospedeiros acidentais e terminais, haja vista que, uma vez infectados não produzem viremia suficientemente alta para a transmissão dos vírus (**Figura 5**) (Arjona *et al.*, 2011; Vogels *et al.*, 2017; WHO, 2017).

Figura 5 - Ciclo de Transmissão do *West Nile virus*.

Fonte: Produzido pelos autores.

As infecções em humanos são mais frequentes como resultantes de picadas de mosquitos infectados, ao injetarem o vírus junto com a saliva no momento do repasto sanguíneo, podendo multiplicar-se e possivelmente causar doenças, principalmente quadros neurológicos. O WNV pode também ser transmitido por meio de contato com sangue e tecidos de animais infectados e através de transplantes de órgãos, transfusões sanguíneas, amamentação e via transplacentária (WHO, 2017).

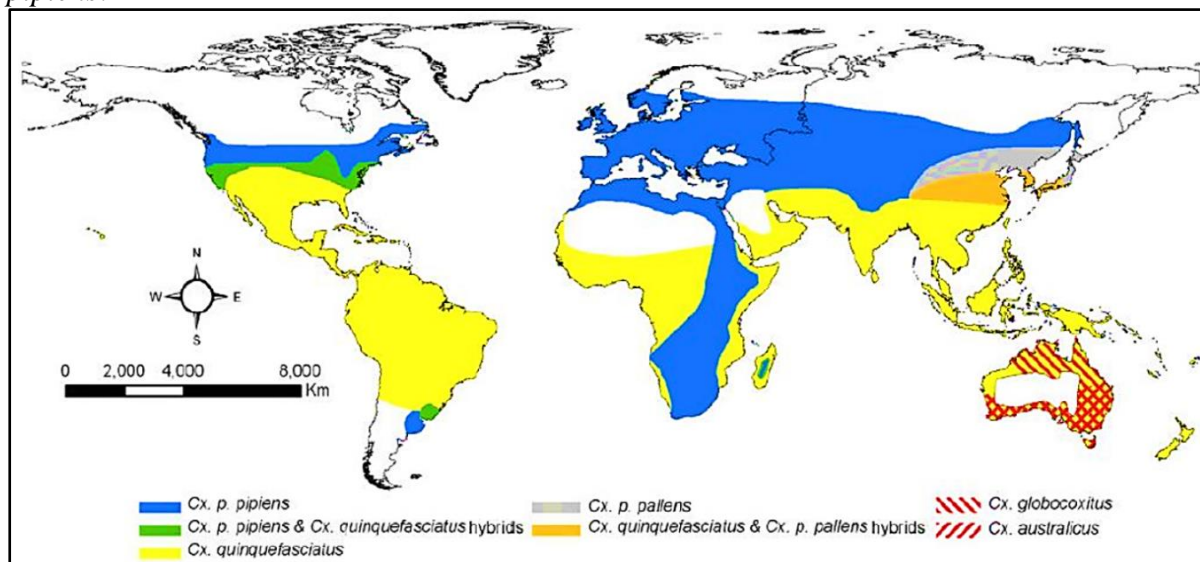
Diversas aves possuem susceptibilidade a infecções por WNV nos Estados Unidos (**Anexo A**), dentre elas *Corvus brachyrhynchos*, *Cyanocitta cristata*, *Elanoides forficatus*, bem como muitos mosquitos também foram identificados portando o vírus, contudo, os mosquitos do gênero *Culex* são atualmente aceitos como os principais vetores de WNV, como *Culex tarsalis*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* dentre outros, tendo já sido identificadas mais de 65 espécies de mosquitos infectadas, havendo relatos de mosquitos do gênero *Aedes* infectados (**Anexo B**) (Colpitts *et al.*, 2012; Vogels *et al.*, 2017; WHO, 2017).

1.4 *Culex* (*Cux.*) *quinquefasciatus*

O gênero *Culex* possui uma distribuição cosmopolita, ou seja, global, e inclui cerca de 768 espécies subdivididas em 26 subgêneros (Harbach, 2012). Já o complexo do *Culex pipiens* é composto por diversas espécies muito semelhantes morfológicamente, porém com grandes diferenças em padrões comportamentais, fisiológicos, bem como em preferências de hospedeiros, tais espécies incluem *Culex* (*Cux.*) *australicus*, *Culex* (*Cux.*) *globocoxitus*, *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus*. A espécie *Culex pipiens* por sua vez, possui duas

subespécies, o *Culex p. pallens* e o *Culex pipiens molestus* (**Figura 6**) (Ciota & Kramer, 2013; Harbach, 2012; Ribeiro *et al.*, 2004).

Figura 6 - Distribuição mundial das espécies de mosquito pertencentes ao complexo *Culex pipiens*.



Fonte: Ciota & Kramer, 2013.

As distinções biológicas entre as espécies que compõem o complexo do *Culex pipiens* variam de fêmeas de mosquitos com comportamento anautógeno, ou seja, as fêmeas necessitam realizar o repasto sanguíneo para obterem os nutrientes presentes no sangue necessários para a maturação dos ovos, ornitófilas, isto é, realizam o repasto sanguíneo em aves, eurigâmicas, no qual os machos formam enxames para realizarem a cópula. Tais comportamentos são característicos da subespécie *Culex pipiens pallens* (Becker *et al.*, 2012; Sawabe *et al.*, 2010).

Com relação as fêmeas da subespécie *Culex pipiens molestus*, elas apresentam um comportamento estenogâmico, ou seja, não formam enxames para o acasalamento, são capazes de se acasalar em locais pequenos, durante o voo ou em repouso sobre uma superfície. São antropófilas, ou seja, realizam o repasto sanguíneo nos seres humanos, bem como são autógenas, isto é, as fêmeas não necessitam realizar o repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, são capazes de realizar em torno de um ciclo gonotrófico sem alimentação sanguínea (Becker *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2013)

A espécie *Culex quinquefasciatus* é amplamente adaptada ao ambiente urbano, sendo facilmente encontrada em habitações humanas e de animais, com atividade de hematofagia realizada preferencialmente a noite. É principalmente encontrada em países de clima tropical, uma vez que em temperaturas de 22°C há um aumento na atividade de oviposição ao passo que, em temperaturas abaixo de 2°C a oviposição é interrompida. Em temperaturas de 5°C e 40°C,

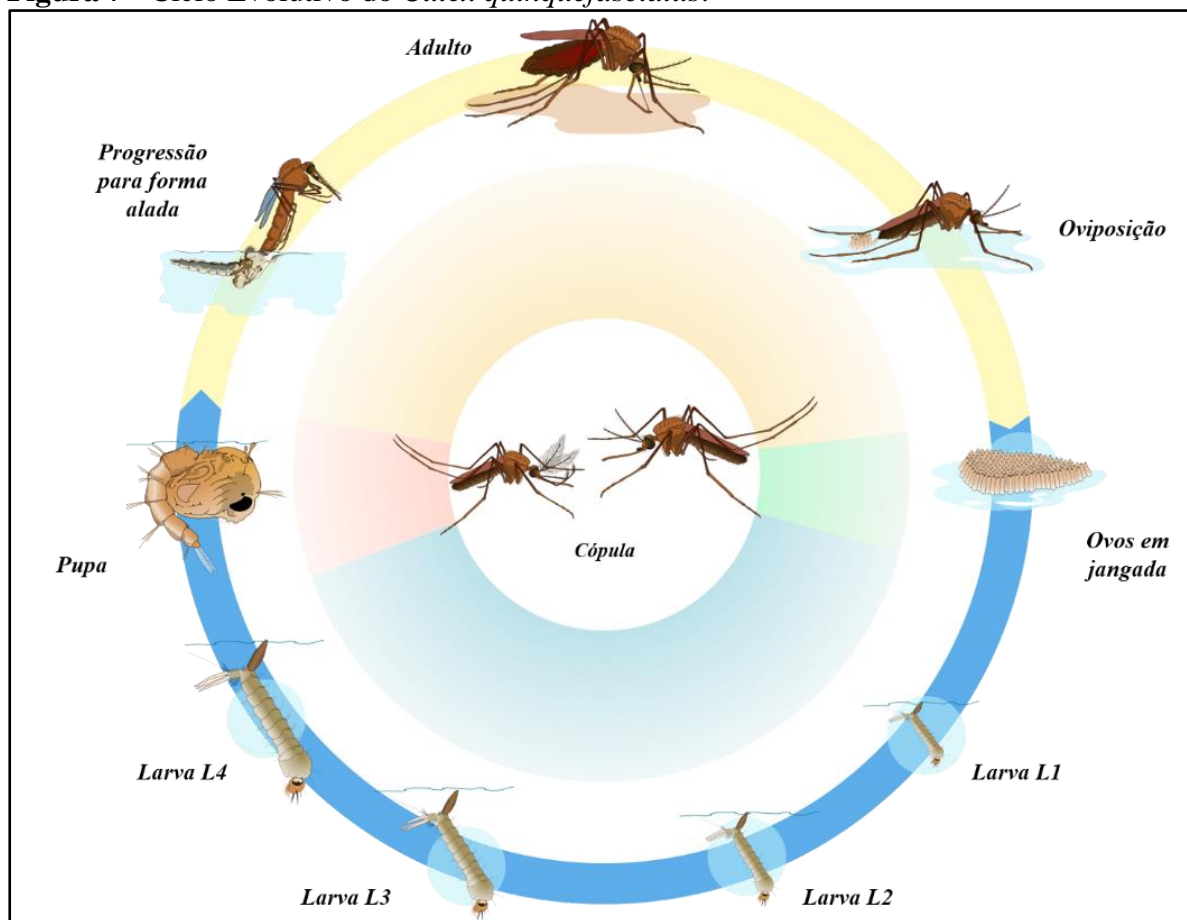
ocorre uma diminuição no desenvolvimento das larvas, demonstrando assim que a variação de temperatura característica de países de clima tropical propicia o desenvolvimento de todas as fases do ciclo de vida do mosquito (Andreadis, 2012; Becker *et al.*, 2012; Ciota & Kramer, 2013; Ribeiro *et al.*, 2004; Zित्रa *et al.*, 2016)

É uma espécie muito bem adaptada ao ambiente urbano onde encontra diversos criadouros propícios a sua reprodução, haja vista que as fêmeas depositam seus ovos em pequenas coleções de água estagnada contendo alto teor de matéria orgânica, tornando assim tal espécie resistente a efeitos da poluição da água nos grandes centros urbanos (Laporta *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2004).

Os machos alimentam-se exclusivamente de seiva de plantas no qual encontra água e substâncias energéticas suficientes para manutenção de suas atividades biológicas, ambos os sexos possuem hábitos crepusculares, isto é, sua maior taxa de atividade ocorre após o crepúsculo vespertino e antes do matutino, sendo seu pico de atividade no período de 18 horas às seis horas (Charlwood, 1979; Forattini, 2002; Becker *et al.*, 2012).

Assim como outros culicídeos, o mosquito *Culex quinquefasciatus* possui quatro fases de desenvolvimento, a fase de ovo, quatro estadiamentos larvais, fase de pupa e fase alada (adulto) (**Figura 7**). Seus ovos apresentam formato alongado e são ovipostos na superfície das coleções de água em formato de jangada, ou seja, são unidos, as formas larvais alimentam-se da matéria orgânica presente na água, além de nesse período realizarem o armazenamento dos nutrientes necessários a maturação do exoesqueleto na fase de pupa e início da fase adulta (Brasil, 2011).

Figura 7 - Ciclo Evolutivo do *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: VDCI, 2019.

Culex quinquefasciatus é caracterizado como o principal vetor da *Wuchereria bancrofti* causadora da Filariose Linfática, além de também transmitir a *Brugia malayi* causadora da Dirofilariose. Contudo, tal espécie também é identificada como vetor ou potencial vetor de várias arboviroses, como WNV, SLEV, JEV, *Oropouche orthobunyavirus* (OROV) dentre outros, bem como, diversos estudos já demonstraram a competência vetorial do *Culex quinquefasciatus* para a transmissão do WNV (Barrera *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2015; Ciota & Kramer, 2013; Ciota, 2017; Fall *et al.*, 2014; Hannon *et al.*, 2019; Nitatpattana *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2014; Silva & Langoni, 2009; Vogels *et al.*, 2016).

1.5 COMPETÊNCIA VETORIAL

A prática da hematofagia é comum entre diversos insetos que parasitam os animais vertebrados, dentre eles destacam-se as pulgas, os piolhos, barbeiros, dentre outros. Muitos desses insetos pertencem a Ordem Diptera, como os mosquitos e flebotomíneos, contudo, entre as espécies de mosquitos somente as fêmeas realizam a hematofagia, em razão de utilizar o

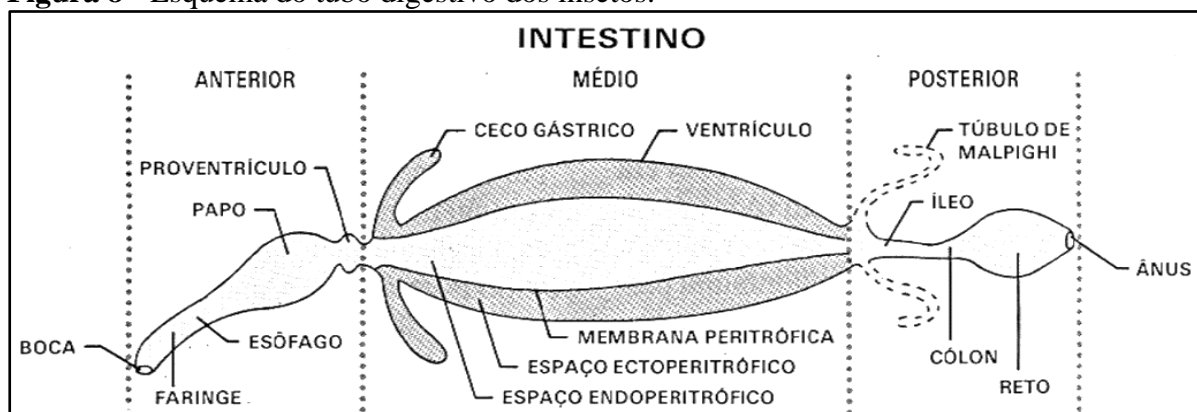
sangue como uma fonte de aminoácidos necessários para a maturação de seus ovos (Silva *et al.*, 2012).

O sangue de animais vertebrados é rico em diversos nutrientes, uma vez que é composto por plasma, hemácias, leucócitos e plaquetas que carregam diversas proteínas importantes para os mosquitos, como a hemoglobina, albumina e imunoglobulina. As hemácias constituem cerca de 47% do volume sanguíneo e possuem em seu interior moléculas de hemoglobina, desse modo, a lise das hemácias é o primeiro processo realizado na digestão desses insetos, iniciando no intestino médio (Silva *et al.*, 2012; Sojka *et al.*, 2013).

Salienta-se que a alimentação sanguínea além de fornecer nutrientes aos artrópodes, também é uma rica fonte de infecção para tais animais, uma vez que os expõe a uma série de patógenos, como bactérias, fungos e vírus, logo, tais animais desenvolveram ao longo de seu processo evolutivo diversas barreiras anatômicas e fisiológicas a fim de dificultar a infecção (Amaral & Dansa-Petretski, 2012).

O trato digestivo dos insetos constitui-se de uma camada de células epiteliais que se estende da boca (abertura na região anterior), até o ânus (região posterior). O tubo digestivo subdivide-se em três regiões, intestino anterior, médio e posterior (**Figura 8**) (Bolognesi & Terra, 2005; Silva *et al.*, 2012).

Figura 8 - Esquema do tubo digestivo dos insetos.



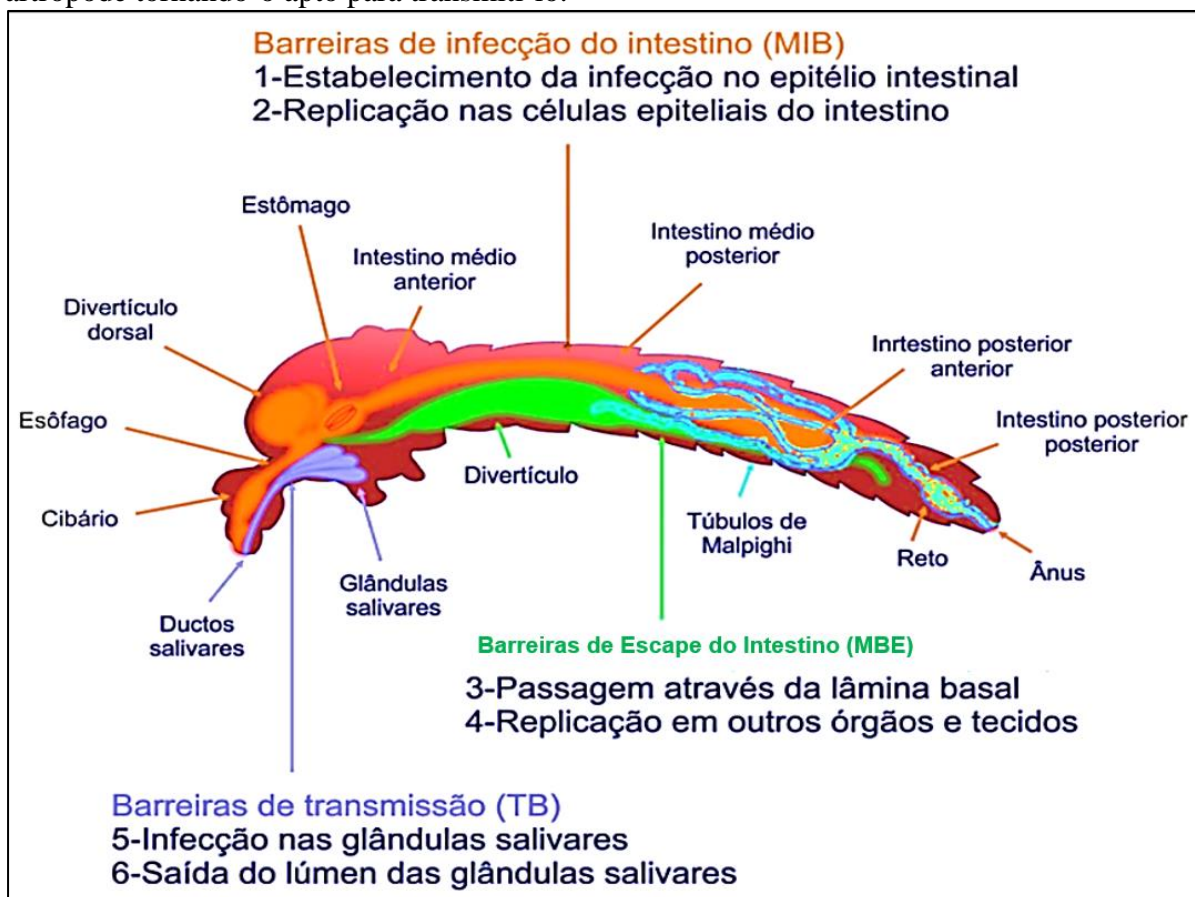
Fonte: Bolognesi & Terra, 2005.

Na região do intestino anterior ocorre o processo de ingestão do alimento, condução e armazenamento. Já o intestino médio é responsável por realizar grande parte do processo de digestão, no qual ocorrem a absorção de nutrientes e secreção de enzimas digestivas. Nele, o bolo alimentar é envolto por uma camada acelular semipermeável composta por quitinas e proteínas responsáveis por tornar a parede do órgão impermeável a diversas substâncias, denominada de membrana peritrófica (MP), cuja uma das funções é delimitar o espaço

endoperitrófico, onde se encontra o bolo alimentar, e o espaço ectoperitrófico, ou seja, espaço luminal entre a MP e o epitélio. O intestino posterior do tubo digestivo, por sua vez, realiza o processo de excreção dos resíduos da digestão, uma vez que é formado pelo íleo, ampola retal e ânus (Bolognesi & Terra, 2005; Silva *et al.*, 2012).

Desse modo, verifica-se que os mosquitos possuem em sua anatomia diversos métodos de proteção, dentre eles há as barreiras de proteção. A barreira de infecção do intestino médio (MIB) tem por finalidade evitar que os patógenos infectem as células epiteliais mesenteronais, uma vez que, tal tecido é rico em quitinas e outras proteínas, além de forte resposta imunológica ao vírus, já a barreira de escape do intestino médio (MBE), busca impedir que o agente invasor atravesse a lâmina basal do mesentério adentrando a hemocele, meio este propício para a multiplicação das partículas virais e a barreira de infecção da glândula salivar tem a função de impedir a entrada dos patógenos na glândula salivar e posterior saída para a luz da glândula (**Figura 9**) (Amaral & Dansa-Petretski, 2012; Colpitts *et al.*, 2012; Pesko & Mores, 2009; Souza-Neto *et al.*, 2019).

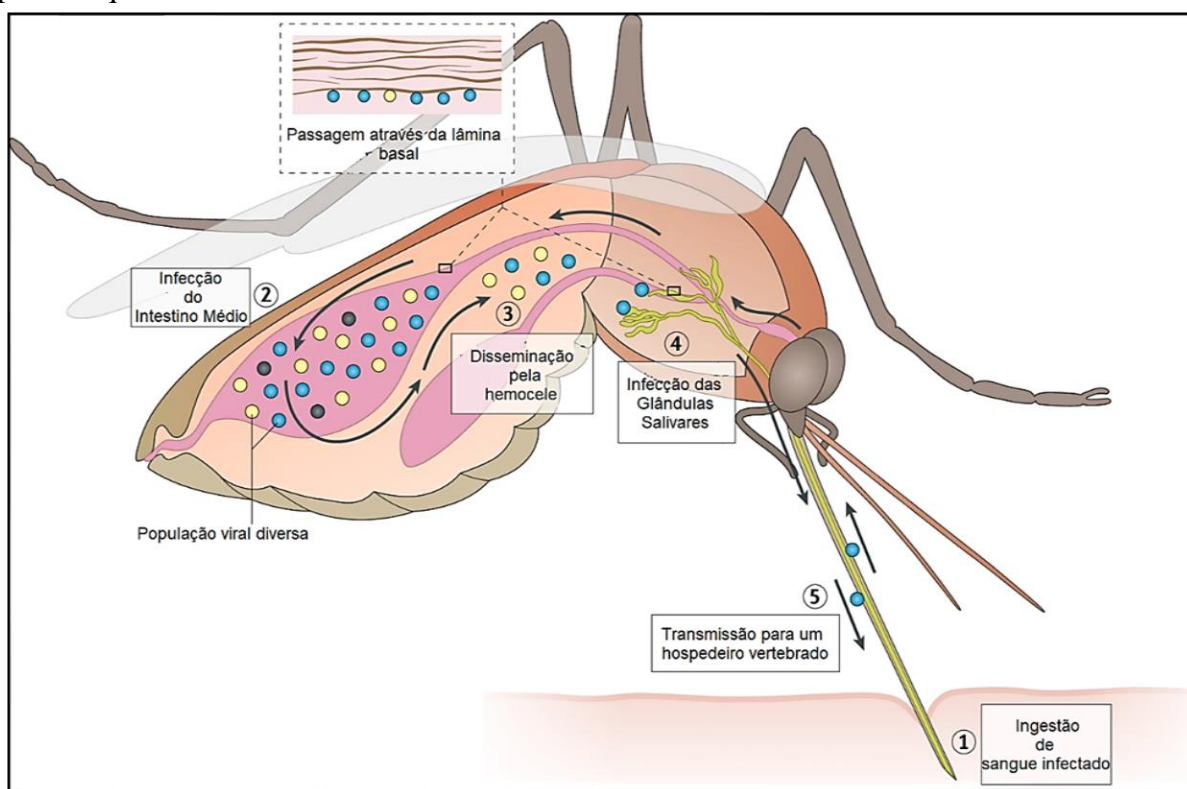
Figura 9 - Barreiras anatômicas que um arbovirus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo.



Fonte: Amaral & Dansa-Petretski, 2012.

Assim sendo, a capacidade vetorial é definida como a capacidade de um vetor em transmitir patógenos, a partir da ação de diversos fatores, como o comportamento alimentar, alta densidade de mosquitos, sobrevivência do mosquito quando infectado e as condições ambientais. Já a competência vetorial define-se como a capacidade de um vetor em infectar-se com um patógeno (susceptibilidade a infecção), mantê-lo em multiplicação pelos tecidos (período de incubação extrínseco – PIE) e transmiti-lo a partir de uma alta viremia nas glândulas salivares e na saliva (**Figura 10**) (Colpitts *et al.*, 2012; Crockett *et al.*, 2012; Guedes, 2012; Vogels *et al.*, 2017).

Figura 10 - Visão esquemática da infecção, disseminação e transmissão de vírus transmitidos por mosquitos.



Fonte: Weaver *et al.*, 2021.

Segundo Guedes (2012), o PIE possui duração variada de acordo com o patógeno infectante, bem como sofre ação de fatores externos ao organismo do hospedeiro, como temperatura e umidade. Tal período inicia-se a partir da ingestão de sangue contaminado estendendo-se até a transmissão do patógeno a um outro hospedeiro. No decorrer desse período, o vírus deve replicar-se nas células do intestino médio, migrar através da hemolinfa para órgãos

secundários alcançando a glândula salivar e, posteriormente, a saliva, podendo então, ser transmitido para ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo.

Souza-Neto *et al.* (2019) afirmam que, após o repasto sanguíneo ocorre um grande aumento no número de bactérias presentes no intestino médio, interferindo em processos fisiológicos associados ao controle da homeostase no órgão, a exemplo, a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e matriz peritrófica, podendo assim afetar a competência vetorial do mosquito.

Outro aspecto relevante para a determinação da competência vetorial é o entendimento da resposta imune do mosquito a partir de uma infecção, haja vista que, a ação de fatores imunológicos pode influenciar no processo de multiplicação das partículas virais determinando assim a carga viral, o período de incubação até a transmissão do patógeno (Kingsolver & Hardy, 2012).

Segundo Colpitts *et al.* (2012) considerava-se que os mosquitos possuíam apenas duas vias de resposta antiviral, a via da imunidade inata e a via de interferência de RNA (RNAi), no qual a resposta imune inata consiste na ação de três vias de sinalização: a via Toll, JAK-STAT e IMD, onde as vias Toll e IMD resultam na expressão de peptídeos antimicrobianos mediada por NF-B (AMPs), e a sinalização de IMD atuar controlando infecções causadas por vírus de RNA em amostras de *Drosophila*.

Amaral & Dansa-Petretski (2012) destacam que a imunidade inata limita a infecção por patógenos, sendo esta a resposta antiviral mais antiga evolutivamente, representando a primeira linha de defesa contra patógenos invasores dos artrópodes. Segundo o autor, os insetos apresentam dois tipos de resposta imune inata, a resposta humoral que está relacionada com a atuação de lecitinas, a cascata de profenoloxidase (PPO) e na produção de peptídeos antimicrobianos e a resposta celular na qual ocorre a fagocitose, agregação hemocítica e encapsulação de patógenos, haja vista que, na superfície dos hemócitos encontram-se receptores transmembrana que atuam reconhecendo Padrões de Moléculas Associadas a Patógenos (PAMPs), presentes na superfície dos patógenos iniciando assim a ativação das vias da imunidade do hospedeiro.

Já Paradkar *et al.* (2014) identificou que a ativação da via do RNA de interferência (RNAi) é essencial para a resposta imunológica antiviral do hospedeiro frente a infecção por vírus de RNA de cadeia dupla (dsRNA), haja vista que a partir da ativação desta via a enzima Dicer-2 é estimulada e atua na detecção e degradação do dsRNA viral, que é produzido a partir da replicação do genoma viral, clivando o RNA viral e formando RNAs interferentes virais, além de ativar o Culex Vago (CxVago) que é uma citocina estável que atua nos mosquitos

homologamente aos interferons em mamíferos, ou seja, estimula a atividade antiviral específica em outras células do organismo não infectadas.

Lee *et al.* (2019) em seu estudo destaca a atividade dos hemócitos na ocorrência de infecção viral em mosquitos. Segundo os autores, os hemócitos são células presentes na hemolinfa, susceptíveis a infecção viral dos mosquitos. Tais células possuem duas formas, as circulantes, ou seja, as formas presentes na hemolinfa, e as sésseis que estão presentes nos tecidos, possuem também três categorias, os prohemócitos, oenocitóides e os granulocitos. A resposta imune de tais células é imediata e inclui o reconhecimento de partículas virais, fagocitose, produção de AMPs, assim como iniciam a cascata de sinalização de células efectoras citotóxicas a fim de eliminar a infecção.

As formas granulócitas ao serem ativas agem realizando a fagocitose, já os oenocitóides atuam como produtores de componentes da chamada cascata de fenoloxidase (PO), que se caracteriza por uma resposta imune humoral estabelecida a partir de moléculas de reconhecimento de padrões associadas a patógenos levando a processos proteolíticos, ou seja, processos de degradação (Lee *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

O WNV atualmente tem se mostrado como um arbovirus de relevância para a saúde pública do Brasil, sendo considerado um arbovirus emergente no país, o WNV exibe uma crescente de notificações ao MS, de epizootias em equídeos desde o ano de 2014, com 5 casos confirmados em 2018 no estado do Espírito Santo. O primeiro caso humano confirmado ocorreu no ano de 2014 no estado do Piauí e o segundo caso humano em 2017 no mesmo estado, a partir desse período diversos casos suspeitos foram notificados, visto que através da Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 os casos suspeitos de Febre do Nilo Ocidental tornaram-se de notificação compulsória, demonstrando a importância do acompanhamento da circulação do vírus no país a fim de se identificar o início de possíveis surtos da doença, requerendo medidas de controle e prevenção (Brasil, 2016; 2019).

A espécie *Culex quinquefasciatus* caracteriza-se como um importante vetor de arboviroses, uma vez que o isolamento de arbovirus como o WNV já foi realizado na espécie em diversos países como EUA e México, bem como em mosquitos do gênero *Culex* spp. no Brasil (dados não publicados). Tais dados demonstram a necessidade da realização de estudos de competência vetorial, a fim de comprovar a susceptibilidade à infecção pelo vírus, sua replicação no organismo da espécie, assim como a possibilidade de transmissão do vírus por esse vetor através do repasto sanguíneo.

Apesar dos diversos estudos de competência vetorial do *Culex quinquefasciatus* para transmissão do WNV, estudos realizados com espécies coletadas no país e na Região Amazônica ou utilizando-se a cepa viral isolada no país ainda são inexistentes (Fall *et al.*, 2014; Goddard *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2014). Portanto, tendo em vista a relevância epidemiológica do WNV no Brasil, sendo o mesmo considerado um arbovirus emergente, a realização da presente pesquisa se faz necessária para o entendimento da competência vetorial da espécie ao vírus, assim como seu papel em potencial no ciclo de transmissão desta arbovirose no país.

A pesquisa também apresenta relevância para o desenvolvimento de ações de vigilância entomológica, virológica e de controle vetorial, buscando assim, prevenir a ocorrência de novos casos humanos da Febre do Nilo Ocidental, bem como, de infecções de animais que atuam como hospedeiros de amplificação do vírus.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a competência vetorial do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) da região amazônica para transmissão da cepa de *West Nile virus* isolada no Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a viabilidade da infecção de mosquitos *Culex quinquefasciatus* a partir de suspensão viral de células infectadas com *West Nile virus*.
- Identificar a susceptibilidade da população natural de *Culex quinquefasciatus* da região Amazônica à cepa de WNV brasileira.
- Determinar o título do *West Nile virus* nas regiões de cabeça, corpo e saliva.
- Calcular as taxas de infecção, disseminação e transmissão.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo constitui-se em uma pesquisa quantitativa analítica experimental de caráter prospectivo.

4.2 LOCAL DE PESQUISA

A criação de colônias de *Culex quinquefasciatus*, bem como os procedimentos de infecção experimental foram realizadas no Laboratório de Entomologia Médica da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC).

As técnicas de isolamento viral, bem como o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) e titulação viral foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células da SAARB-IEC.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

As colônias de *Culex quinquefasciatus* (Cidade Nova – Ananindeua/Pará) foram provenientes do insetário da SAARB e mantidas com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $80\% \pm 10\%$ e ciclos de claro/escuro de 12h/12h, de acordo com protocolo estabelecido por Vogels *et al.* (2017).

As jangadas de ovos foram criadas em bacias contendo 700 mL de água destilada e suplementação de ração de peixe triturada e esterilizada durante os quatro estádios do período larval (L1, L2, L3 e L4). Ao atingirem a forma de pupa, as mesmas eram coletadas com auxílio de pipeta Pasteur de 3mL e transferidas para um recipiente transparente de polipropileno (Firstlab®) contendo 50 mL de água destilada e acondicionadas em gaiolas entomológicas com dimensões de 30x30x30cm. As formas aladas foram mantidas com algodão embebido em solução de açúcar a 10% “*ad libitum*”, de acordo com o protocolo estabelecido por Silva *et al.* (1998).

4.4 CEPA VIRAL

A cepa BE AN 854747 (GenBank: MH643887) do WNV utilizada foi originalmente isolada a partir de uma amostra do SNC de um equino adulto da região de Pedra Grande,

município de São Mateus, estado do Espírito Santo, Brasil. O isolamento dessa cepa foi realizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB), Ananindeua/PA. O isolamento viral foi realizado em cultivo de células de artrópodes (*Aedes albopictus* – clone C6/36), confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) que demonstrou aproximadamente 75% de células positivas para os anticorpos policlonais contra os flavivírus e WNV. O sobrenadante de cultivo foi adicionalmente positivo por RT-PCR, com base nos protocolos estabelecidos por Lanciotti *et al.* (2000) e Lanciotti e Kerst (2001) para o WNV e a análise filogenética caracterizou a cepa pertencente à linhagem 1A, relacionada às cepas circulantes nos Estados Unidos e México (Martins *et al.*, 2019).

4.5 PREPARAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL

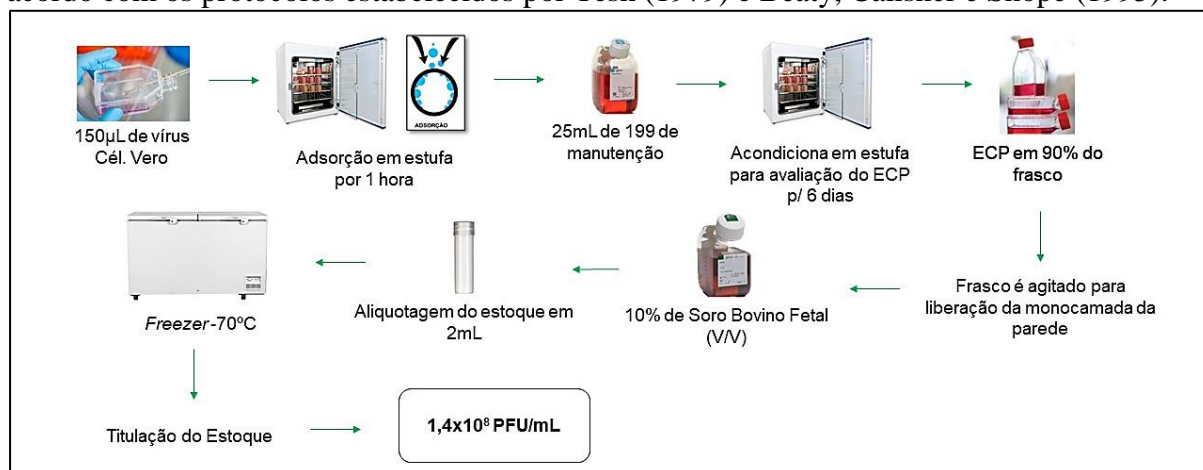
O estoque viral (**Figura 11**) foi preparado em células Vero de rim de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*) (ATCC® CCL-81™), na qual 150µL do vírus foram inoculados em frasco de poliestireno para cultura de células (*Sarstedt*®) com capacidade de 21 a 55 mL. As células infectadas foram incubadas a 37°C em estufa a 5% CO₂, por uma hora para adsorção, com agitação a cada 15 minutos. Após a adsorção, 25mL de meio de cultura de manutenção 199 (*GIBCO*®) contendo 2% de soro fetal bovino (FBS) (*GIBCO*®), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram adicionados.

As células infectadas foram mantidas em estufa e monitoradas diariamente em microscópio invertido (*ZEISS Stemi 508 Greenough Stereo Microscope*) para avaliação da ocorrência de efeito citopático (ECP) por um período de cinco a seis dias. Após a identificação do ECP em 90% da monocamada, as células foram removidas por agitação e, após a adição de 10% de FBS (V/V), centrifugou-se a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C e realizou-se aliquotagem de 2mL do sobrenadante da cultura em tubos criogênicos KMA (*Mylabor*®), mantendo-os em freezer a -70°C até seu uso (Tesh, 1979; Beaty, Calisher, Shope, 1995).

O estoque viral foi submetido à titulação através de ensaios de placa (Dulbecco & Vogt, 1953). Resumidamente, monocamadas de células Vero foram cultivadas em placas de seis poços (TPP) e incubadas com 100 µL de diluições seriadas a uma proporção de 1:10, da amostra viral a 37 °C por 1 hora, sob leve agitação a cada 15 min. Após incubação, o meio contendo vírus não adsorvidos foi substituído por um meio de cultura semissólido (carboximetilcelulose 3% em meio 199) suplementado com FBS a 5%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Após 5 dias a 37 °C, as células foram fixadas e coradas com solução de cristal violeta 0,1%, etanol 30% e formaldeído 20% em PBS e as zonas de morte celular

(placas) foram contadas. O cálculo do título viral foi feito multiplicando-se o número de placas obtidas a partir de uma dada diluição seriada viral e, subsequentemente, pelo fator de diluição, com o resultado sendo expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL), onde se obteve um título para o estoque viral de $1,4 \times 10^8$ PFU/mL.

Figura 11 - Protocolo de preparação do estoque viral da cepa brasileira de WNV realizado de acordo com os protocolos estabelecidos por Tesh (1979) e Beaty, Calisher e Shope (1995).



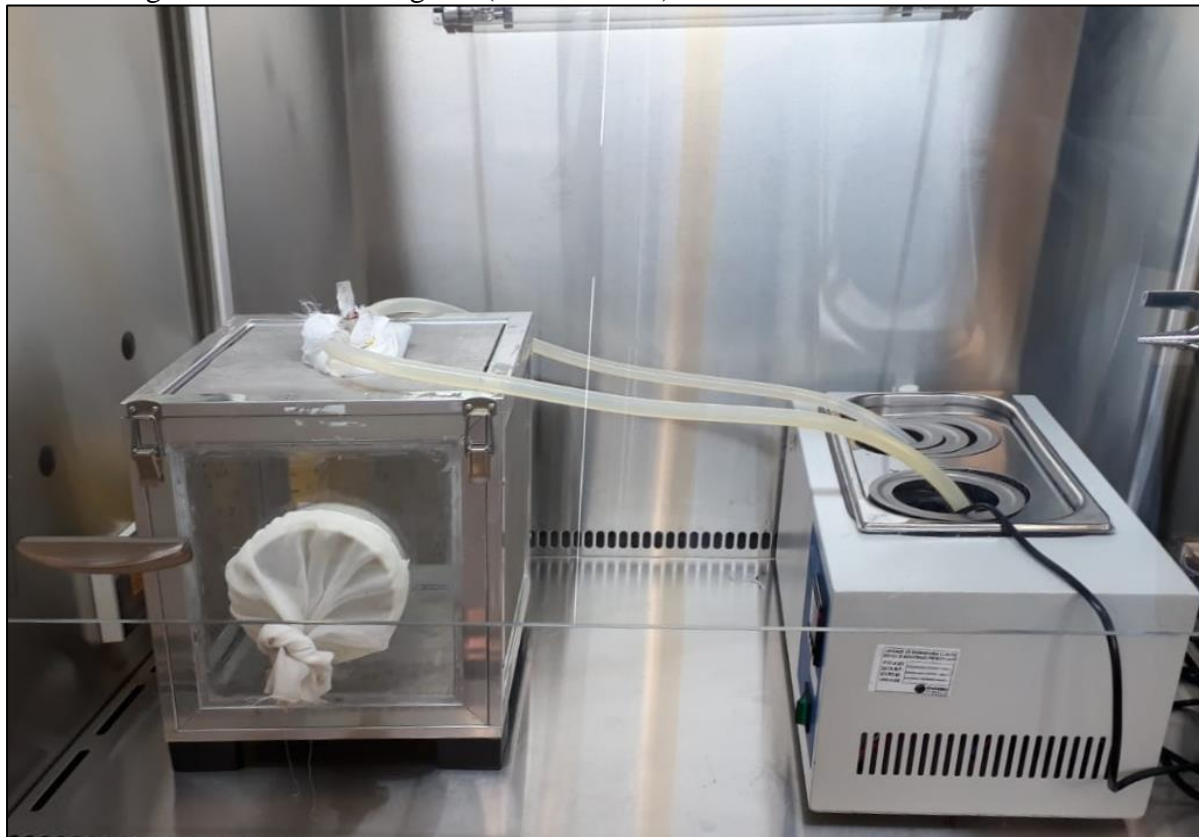
Fonte: Produzido pelos autores.

4.6 INFECÇÃO EXPERIMENTAL ORAL DE MOSQUITOS *Culex quinquefasciatus*

Após a emergência da fase adulta, 106 fêmeas com cerca de cinco a sete dias de vida foram separadas e privadas de açúcar por um período de 24 horas antes da alimentação sanguínea infecciosa. A infecção oral foi realizada com o auxílio de um alimentador artificial de vidro, no qual a área de oferta de sangue para os mosquitos é envolvida por uma membrana de peritônio de fígado bovino adquirida em frigorífico. O alimentador artificial foi preenchido com 2 mL de sangue de carneiro desfibrinado adquirido do biotério do IEC, disponibilizado para rotina de criação de culicídeos do insetário, e 2 mL da suspensão viral de WNV (7×10^7 PFU/mL). O sangue foi mantido constantemente aquecido a 37°C em banho-maria (*Digital Bath NI 1255-25L*).

As fêmeas permaneceram expostas à refeição de sangue infectante por 60 minutos (**Figura 12**). O grupo controle de mosquitos foi composto por uma fêmea não infectada pertencente à mesma geração (F1) utilizada na infecção, da qual extraiu-se saliva e também se realizou a segmentação de cabeça e corpo, de acordo com os protocolos definidos por Salazar *et al.* (2007), Serrão (2004), Goenaga *et al.* (2015) e Vogels *et al.* (2016).

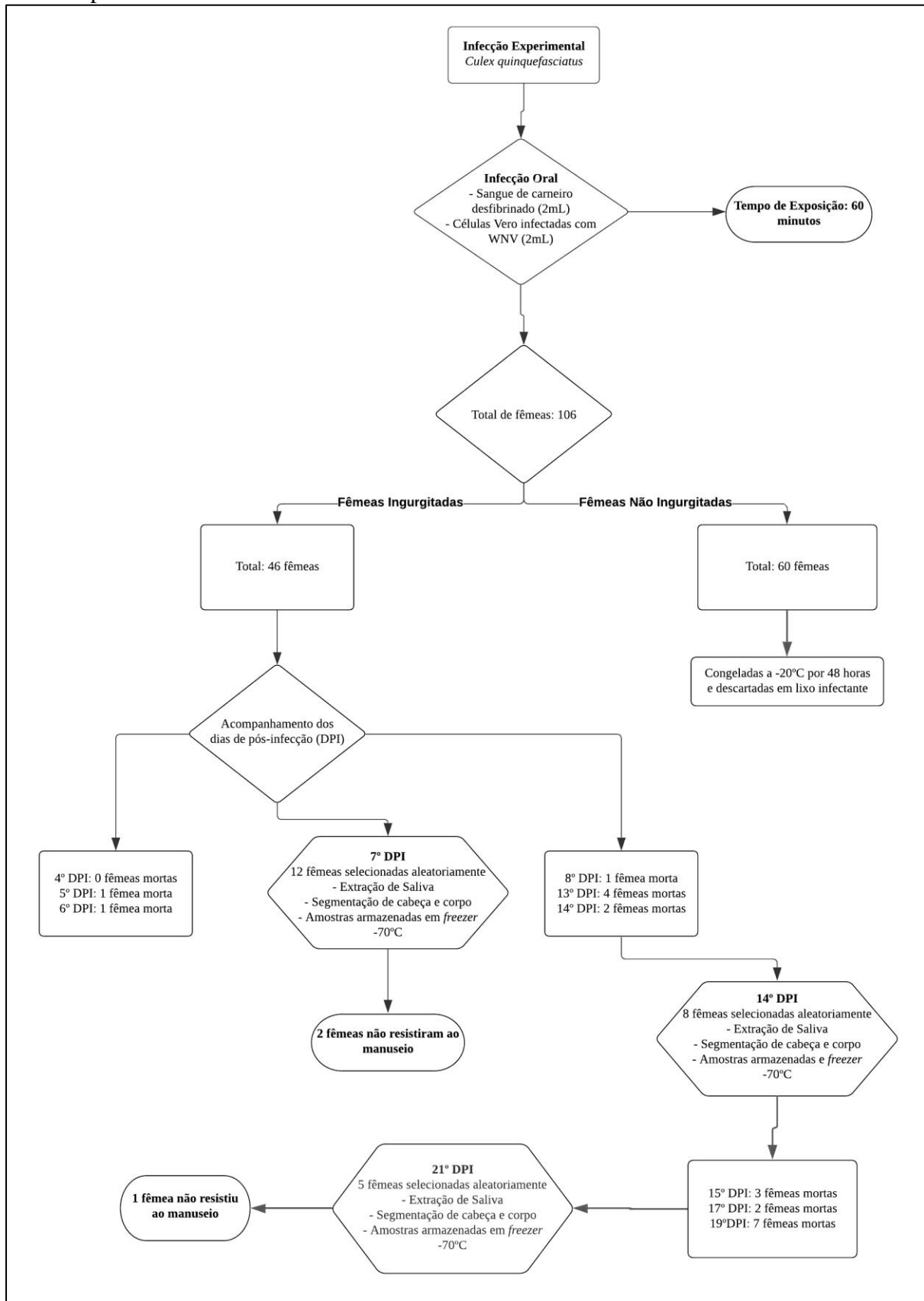
Figura 12 – Sistema utilizado para infecção experimental de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* com WNV via alimentador artificial do Laboratório de Entomologia Médica da Seção de Arbovirologia e Febre Hemorrágicas (SAARB/IEC).



Fonte: Acervo do Laboratório de Entomologia Médica (SAARB/IEC).

Após o período de alimentação, foram obtidas 46 fêmeas ingurgitadas, as quais foram separadas e transferidas para uma gaiola entomológica. Quarenta e oito horas após a alimentação do sangue infectante, um recipiente transparente de polipropileno (*Firstlab*®) contendo 15 mL de água destilada e matéria orgânica para oviposição foi depositado no interior das gaiolas, permanecendo o recipiente no interior da gaiola por um período de até sete dias após a alimentação infectante, conforme proposto por Pesko & Mores (2009) (**Figura 13**).

Figura 13 - Fluxograma da infecção experimental oral de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* com a cepa brasileira de WNV.

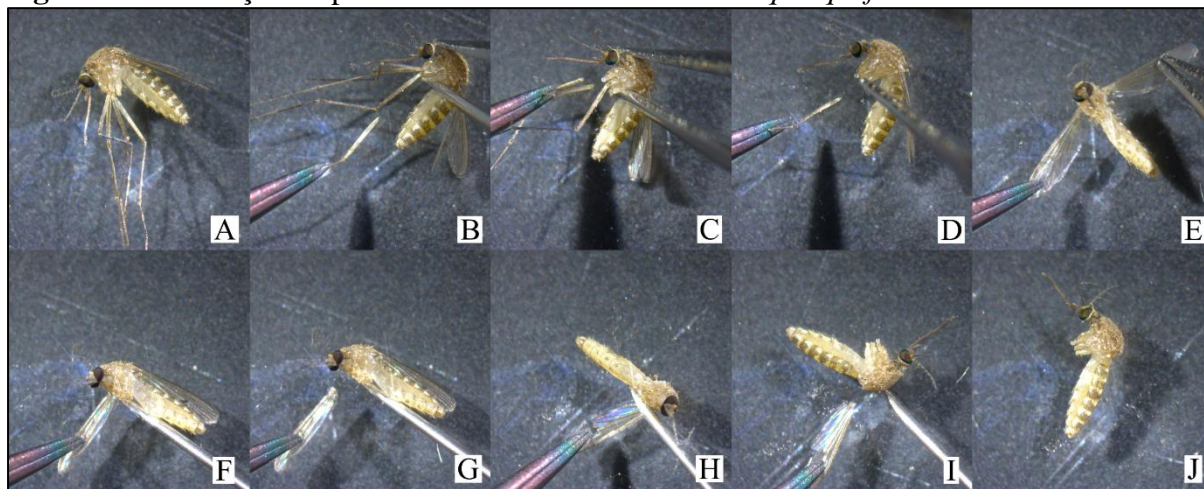


Fonte: Produzido pelos autores.

4.7 PROCESSAMENTO DOS MOSQUITOS

A segmentação dos mosquitos e a extração da saliva foram realizadas no 7^o, 14^o e 21^o dia de pós-infecção (dpi), sendo separados de forma individual cabeça, corpo e saliva. A segmentação do corpo foi realizada de acordo com a técnica descrita por Consoli & Oliveira (1994), na qual as fêmeas são paralisadas em gelo, depositadas em lâmina esterilizada de microscópio (*Kolplast*®) com o ventre para cima, são retirados primeiramente, com auxílio de pinça entomológica, as asas e as pernas (**Figura 14**). Em seguida, foi realizado o procedimento de extração de saliva de acordo com a técnica adaptada descrita por Castro *et al.* (2004) e Nuñez *et al.* (2020), no qual a probóscide da fêmea é inserida na ponta de uma ponteira de polipropileno de 10µL (*Axygen*®) contendo 5µL de FBS (*GIBCO*®) e aguarda-se 30 minutos para a salivação (**Figura 15**). Após esse período, o meio contendo a saliva é transferido para tubos *ependorf* (*Sarstedt*®) contendo 45µL do meio Leibowitz L-15 (*GIBCO*®), sendo a saliva imediatamente armazenada em freezer a -70°C.

Figura 14 - Remoção de pernas e asas de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Acervo do Laboratório de Entomologia Médica da SAARB.

Legenda: **A.** Fêmea de *Culex quinquefasciatus* paralisada em gelo; **B – D:** Retirada de pernas com auxílio de pinça entomológica; **E – J:** Retirada de asas com auxílio de pinça entomológica. (Imagem adquirida com auxílio de Microscópio Estereoscópio Binocular Carl Zeiss modelo Stemi 508 com câmera Axiocam ERc5s acoplada; objetiva: 1,5x FWD 53mm; Macrômetro: 0.63x).

Figura 15 - Extração de saliva do mosquito *Culex quinquefasciatus* experimentalmente infectado por WNV, via salivacão em ponteira de polipropileno com SFB, de acordo com procedimento estabelecido por Castro *et al.* (2004).



Fonte: Acervo do Laboratório de Entomologia Médica da SAARB.

Após a extração da saliva, o corpo foi transferido para tubos *epENDORF* (*Sarstedt*®) e 1000 μ L de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) (*Life technologies, Carlsbad, CA, EUA*) contendo 2% de penicilina e estreptomicina, 1% de fungizona e 5% de FBS, bem como uma microesfera (*bead*) de aço inoxidável de 3 mm é adicionada aos *epENDORFs* contendo corpo e cabeça para então realizar o procedimento de maceração em *TissueLyser II* (*Qiagen, Hilden, Alemanha*), a uma velocidade de 25.000 vibrações (Hz) por um minuto, seguido do armazenamento das amostras em freezer -70°C por um período mínimo de 24 horas, conforme protocolo baseado em Vazeille *et al.* (2010).

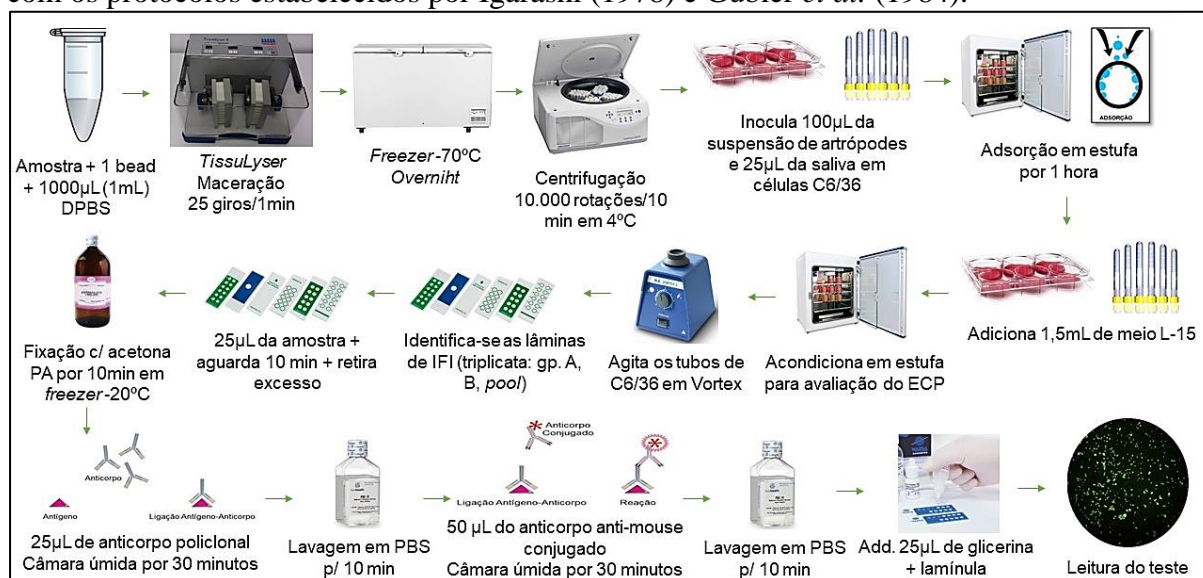
4.8 ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento viral foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Igarashi (1978) (**Figura 16**), no qual após o processo de maceração e incubação das amostras em freezer -70°C , os *epENDORFs* foram retirados do freezer, descongelados e centrifugados (*Hettich*® modelo *Mikro 220R*) a uma velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a

uma temperatura de 4°C, em seguida, 100µL do sobrenadante macerado de corpo e cabeça foram coletados e inoculados na monocamada de cultura de células de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC: CRL-1660) cultivada em tubos de 16 x 125 mm para cultura de células (TPP®), para as amostras de saliva foram inoculados 20µL. Após a inoculação os tubos foram mantidos em incubadora à uma temperatura de 28°C por uma hora para adsorção e homogeneizados a cada 15 minutos. Em seguida, com base no protocolo de Beaty *et al.* (1995), 1,5 mL de meio de manutenção Leibowitz L-15 (GIBCO®) preparado com 2,95% de fosfato de triptose, aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina e 2% de FBS foram adicionados à monocamada.

As células C6/36 inoculadas foram armazenadas em estufa (NAPCO) com 5% de CO₂ a 28°C (± 2°C) e avaliadas diariamente em microscópio óptico invertido (OLYMPUS modelo CK-2) por sete dias para verificar a ocorrência de ECP. Controles positivo e negativo também foram utilizados para conferir maior confiabilidade ao teste.

Figura 16 - Protocolo de isolamento viral em células e imunofluorescência indireta, de acordo com os protocolos estabelecidos por Igarashi (1978) e Gubler *et al.* (1984).



Fonte: Produzido pelos autores.

4.9 TESTE DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA (IFI)

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Gubler *et al.* (1984) (**Figura 16**), sendo realizado com o objetivo de confirmar infecção celular e a positividade da amostra.

O teste consiste em adicionar uma gota (25µL) do sobrenadante de células C6/36 inoculadas com as amostras em cada orifício da lâmina de imunofluorescência, aguardar a sedimentação das células por 10 minutos, retirar o excesso de amostra da lâmina, aguardar a secagem da amostra no interior da cabine de segurança biológica (CBS) e realizar a fixação com acetona propanona (PA) por 10 minutos a -20°C. Em seguida as lâminas são imersas em solução de albumina bovina nas concentrações de 3% e 1% e em PBS (pH 7,4) por 10 minutos a 25°C. A seguir, 25µL (uma gota) do anticorpo policlonal fluído ascítico hiperimune (FAI) do WNV (*in house*) produzido em camundongo suíço albino adulto (*Mus musculus*) pela SAARB/IEC, são adicionados aos orifícios das lâminas e as mesmas foram acondicionadas em câmara úmida em estufa (NAPCO) por 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, a lâmina foi lavada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 por 10 minutos, em seguida rinsada em água destilada, secas e 50 µL do anticorpo *anti-mouse* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Cappel*) diluído em 1:900 em PBS e Azul de Evans (*Evans Blues*) a 0,5% foi adicionado a cada orifício da lâmina.

Em seguida, as lâminas foram novamente acondicionadas em câmara úmida em estufa por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂, repetindo a lavagem em PBS por 10 minutos, finalizando o preparo das amostras com uma gota (25µL) de glicerina tamponada (pH 8.2) em cada orifício da lâmina e fixação da lamínula para observação em microscópio de fluorescência (*Olympus BX51, objetiva UPlanFL N 20X / 0,5 e filtros WB e U-25nd*).

As células inoculadas com amostras de cabeça, corpo e saliva de mosquitos não infectados foram utilizadas como controles negativos.

As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com câmera *Canon PowerShot G6* (Canon, Tóquio, Japão) em um aumento de 200X.

O grau de fluorescência das amostras positivas foi analisado de acordo com o protocolo estabelecido por Weller e Coons (1954), no qual as reações de fluorescência são graduadas de 1+ (uma cruz) a 4+ (quatro cruces), onde 1+ indica fluorescência mínima de 4+ indicando fluorescência intensa.

4.10 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação viral foi realizada nas amostras de saliva, corpo e cabeça, de acordo com o protocolo estabelecido por Dulbecco & Vogt (1953) (**Figura 17**).

O teste é realizado em uma placa de cultura de células de 96 poços (*Kasvi*®) dividida ao meio para permitir a diluição em série de 10 vezes (10^{-1} a 10^{-6}) em diluente PBS com bovina a 0,75%, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 2% de FBS.

Inicialmente, adicionaram-se 180µL de meio de cultura de manutenção 199 (*GIBCO*®) em cada orifício da placa, então foram adicionados 20µL da amostra de saliva ao orifício identificado como “-1”, em seguida a mistura é homogeneizada, aspira-se 20µL do orifício “-1” e transfere para o próximo orifício identificado por “-2”, repetindo o procedimento até a última diluição de “-6”. Para as amostras de corpo e cabeça foram utilizados 100µL para realização do teste.

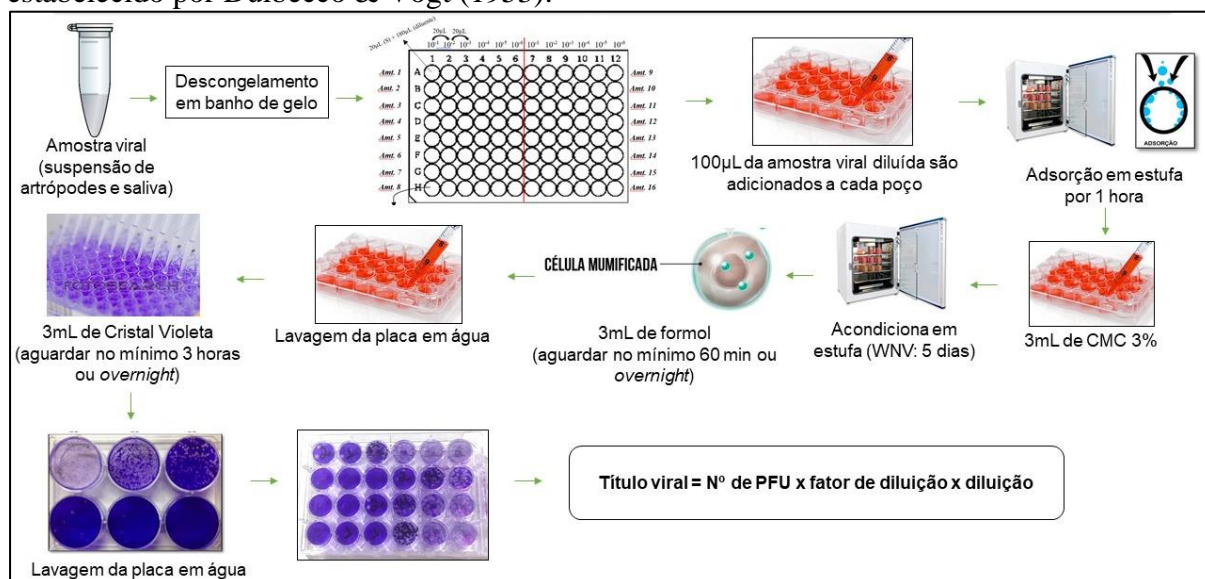
Após a diluição, em uma placa de cultura de células de seis poços (*Kasvi*®) contendo monocamada de células Vero (*Cercopithecus aethiops*) (*ATCC*® *CCL-81*™), onde cada orifício é identificado de -1 a -6 de acordo com a diluição realizada, o meio de cultura 199 (*GIBCO*®) usado para cultivar células VERO foi substituído e 100µL da amostra viral diluída são adicionados a cada poço de acordo com a identificação. Em seguida, a placa é incubada em estufa (*NAPCO*) a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora e a cada 15 minutos a placa foi homogeneizada para aumentar a adsorção viral.

Após esse processo, 3 ml de carboximetilcelulose (CMC, 3% em meio 199) suplementado com 5% de FBS, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram adicionados a cada orifício, seguido pela incubação da placa em estufa a 37°C por cinco dias. Após esse período, as células foram fixadas com 3 mL de formaldeído a 10% e incubadas em estufa por quatro a sete horas ou em *overnight*. Em seguida, a placa é lavada até a completa retirada do sobrenadante e são adicionados 3 mL do corante Cristal Violeta 0,1%. A placa é mantida em temperatura ambiente por um período de 24 horas.

A titulação viral é determinada multiplicando-se o número de placas obtidas em uma determinada diluição, pelo fator de diluição, sendo o resultado expresso em Unidades Formadoras de Placas por Mililitro (PFU/mL), de acordo com o cálculo matemático estabelecido por Guerra (2016).

$$\text{Título viral} = N^0 \text{ de PFU} \times \text{fator de diluição} \times \text{diluição}$$

Figura 17 - Protocolo de titulação viral em placadas realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Dulbecco & Vogt (1953).



Fonte: Produzido pelos autores.

4.11 CÁLCULO DAS TAXAS DE INFECÇÃO, DISSEMINAÇÃO E TRANSMISSÃO

Para calcular as taxas de infecção, disseminação e transmissão, foi empregado o proposto por Couto-Lima *et al.* (2017), no qual a taxa de infecção é calculada a partir do número de mosquitos com o corpo infectado entre as fêmeas ingurgitadas, enquanto a taxa de disseminação é calculada com base no número de mosquitos com a cabeça infectada entre os mosquitos previamente identificados com o corpo infectado e a taxa de transmissão são calculados de acordo com o número de mosquitos com a saliva infectada entre aqueles positivos para infecção e disseminação.

$$\text{Taxa de Infecção: } \frac{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas com o corpo infectado}}{\text{Total de fêmeas ingurgitadas}}$$

$$\text{Taxa de Disseminação: } \frac{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas com cabeça, asas e pernas infectadas}}{\text{Total de fêmeas com o corpo infectado}}$$

$$\text{Taxa de Transmissão: } \frac{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas com saliva infectada}}{\text{Total de fêmeas com corpo, cabeça, asas e pernas infectadas}}$$

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das taxas de infecção, disseminação e transmissão foram expressas em porcentagens, bem como analisadas pelo teste estatístico Qui-quadrado de Tendência, com o

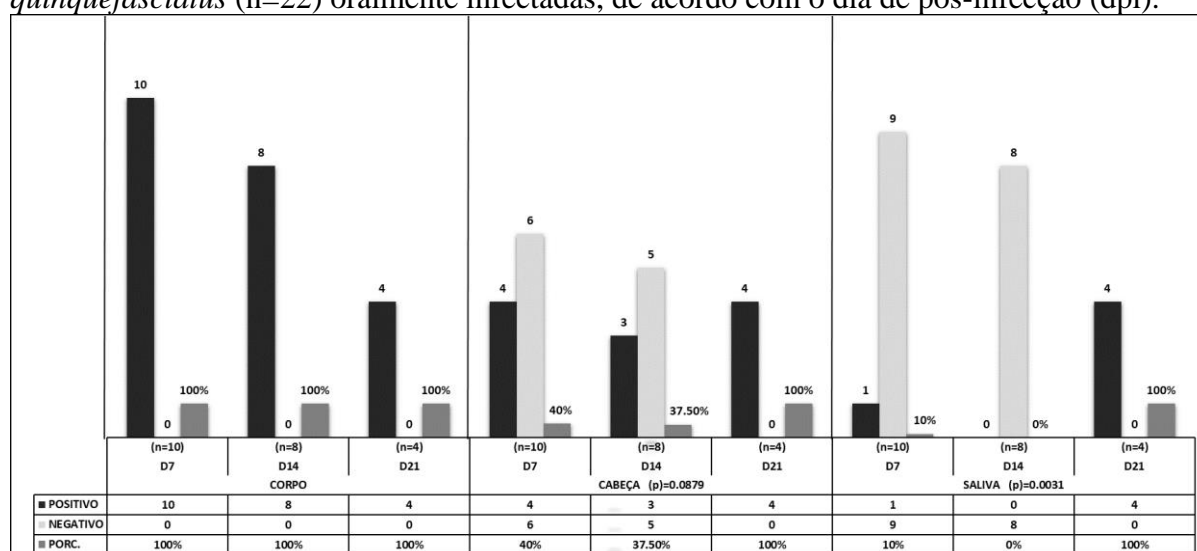
objetivo de avaliar a diferença significativa (Nível de Significância $\alpha = 0,05$) e a tendência de crescimento ou diminuição das taxas. Os títulos virais de corpos, cabeças e saliva foram analisados por meio do Teste de Kruskal-Wallis (KW) e Teste de Dunn para comparações múltiplas, com o objetivo de determinar diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) nos títulos de acordo com o dia pós-infecção (dpi). Os testes estatísticos foram aplicados por meio do programa BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá/PA).

5 RESULTADOS

5.1 TAXA DE INFECÇÃO, DISSEMINAÇÃO E TRANSMISSÃO

Um total de 22 fêmeas de mosquito *Culex quinquefasciatus* foram testadas para avaliar a competência vetorial para a transmissão da cepa WNV (BE AN 854747) isolada no Brasil em 2018. As taxas de infecção permaneceram semelhantes em todos os dpi, no entanto as taxas de disseminação e transmissão variaram amplamente de acordo com o dpi avaliado (**Figura 18** / **Tabela 1**).

Figura 18 - Taxas de infecção, disseminação e transmissão do WNV em fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (n=22) oralmente infectadas, de acordo com o dia de pós-infecção (dpi).



A taxa de infecção no 7^o, 14^o e 21^o dpi foi de 100%, demonstrando que todos os mosquitos foram infectados pelo WNV, porém devido ao baixo quantitativo de amostras de corpo não foi possível obter um *p*Valor para análise de tendência.

Em relação à taxa de disseminação, no 7^o dpi obteve-se uma taxa de 40% de amostras positivas, no 14^o dpi de 37,50% e o 21^o dpi de 100%. De acordo com a análise de tendência, constatou-se que, embora haja uma tendência crescente no número de amostras positivas de cabeça conforme o aumento do dpi ($A > 0$ com $A = 3.000$), esse crescimento ainda não apresenta significância estatística com $p > \alpha$ (p-Valor: 0.0879).

Em relação à taxa de transmissão, observou-se que apenas uma amostra de saliva do 7^o dpi foi positiva para WNV após uma segunda passagem em células, demonstrando uma taxa de 10% de positividade (**Figura 19**), porém o título viral da amostra não pôde ser quantificado

pelo teste de titulação viral em placa, sugerindo uma baixa carga viral. No 14^o dpi nenhuma amostra de saliva foi positiva e no 21^o dpi, todas as amostras de saliva foram positivas para infecção por WNV, com uma taxa de 100%.

Em relação à análise de tendência, as amostras de saliva apresentaram uma tendência de crescimento ($A > 0$ com $A = 4.3636$), assim como tal crescimento demonstrou significância estatística com $p < \alpha$ (p-valor: 0.0031), ou seja, há tendência de maior número de amostras de saliva infectadas com WNV conforme o aumento dos dias pós-infecção.

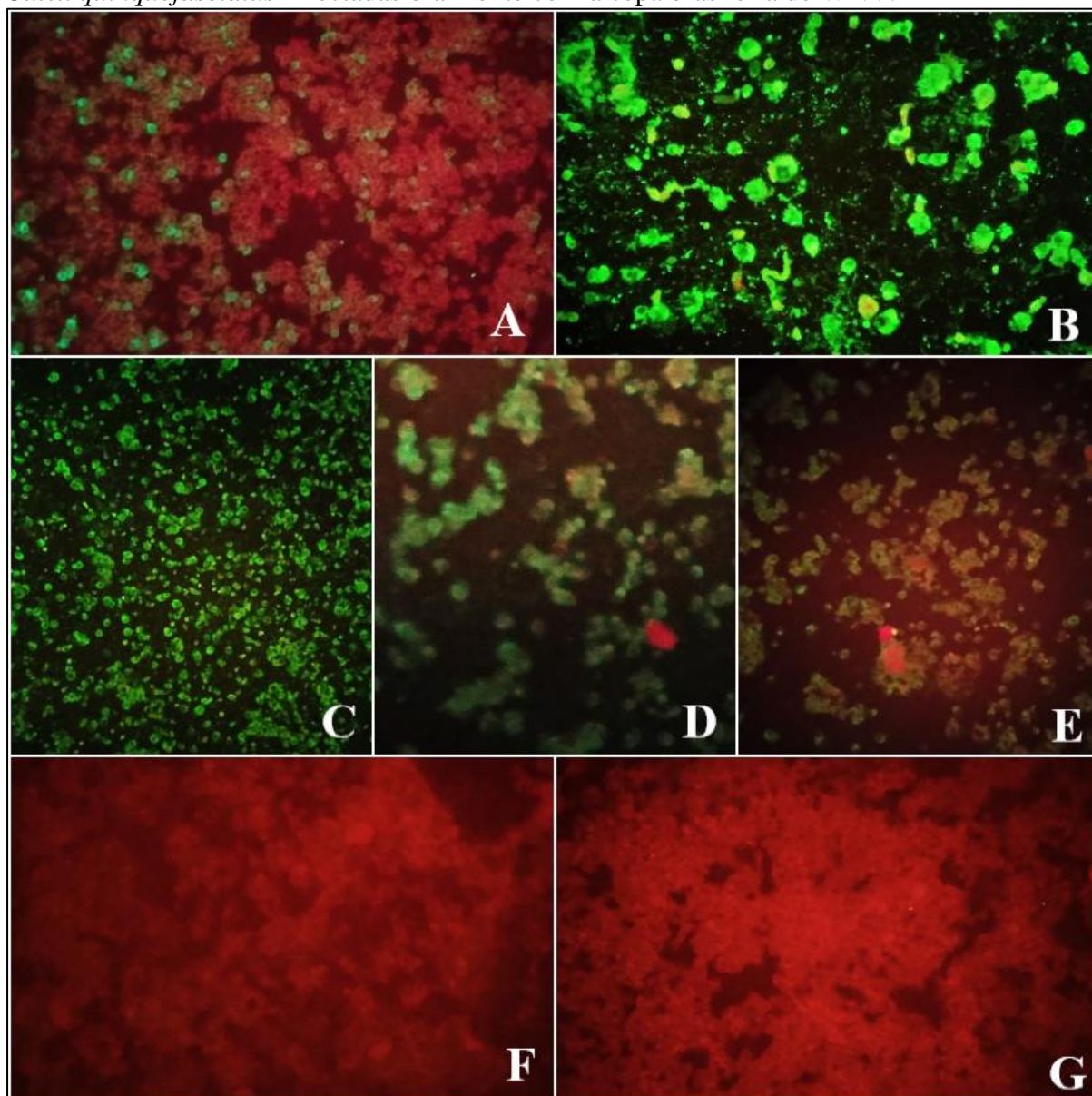
Tabela 1. Resultado do grau de fluorescência observado nas amostras de corpo, cabeça e saliva aos 7^o, 14^o e 21^o dpi de mosquitos fêmeas *Culex quinquefasciatus* expostos por via oral ao WNV.

Dia de Pós-Infecção (DPI)	Amostra	Imunofluorescência Indireta (IFI)		
		Corpo	Cabeça	Saliva
7 ^o	M1 ¹	3+	4+	-
	M2	3+	-	-
	M3	3+	4+	-
	M4	4+	-	-
	M5	3+	-	-
	M6	4+	-	-
	M7	3+	1+	-
	M8	3+	1+	-
	M9	3+	-	2+
	M10	3+	-	-
14 ^o	M1	3+	-	-
	M2	3+	-	-
	M3	3+	-	-
	M4	3+	-	-
	M5	3+	3+	-
	M6	3+	3+	-
	M7	3+	-	-
	M8	3+	3+	-
21 ^o	M1	3+	3+	3+
	M2	3+	3+	3+
	M3	3+	3+	3+
	M4	3+	3+	3+

¹ M: Mosquito

Legenda: 1+: indica mínima fluorescência; 4+: indica fluorescência intensa.

Figura 19 - Imunofluorescência Indireta de amostras de corpo, cabeça e saliva de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* infectadas oralmente com a cepa brasileira de WNV.



Legenda: Teste de Imunofluorescência Indireta utilizando anticorpos policlonais de *West Nile virus* (*in house*) para identificar WNV em células C6/36 inoculadas com amostras de corpo, cabeça e saliva. Evans Blue foi utilizado como corante no teste de IFI. **A.** amostra positiva de saliva do 7^o dpi. **B.** amostra positiva de cabeça do 7^o dpi. **C.** amostra positiva de corpo do 7^o dpi. **D.** amostra positiva de saliva do 21^o dpi. **E.** amostra positiva de cabeça do 21^o dpi. **F.** controle negativo de saliva. **G.** controle negativo de células C6/36. Imagens em magnificação de 200x.

5.2 TITULAÇÃO VIRAL

Todas as amostras foram submetidas ao teste de titulação viral em placa (**Tabela 2**).

Tabela 2. Título viral de amostras de corpo, cabeça e saliva de 7^o, 14^o e 21^o dpi de mosquitos fêmeas *Culex quinquefasciatus* expostos por via oral ao WNV.

DPI ²	Amostra	Título Viral (PFU/mL) ¹		
		Corpo	Cabeça	Saliva
7 ^o	M1 ³	2.7 x 10 ⁸	6 x 10 ⁵	-
	M2	2 x 10 ⁵	-	-
	M3	1.7 x 10 ⁶	5 x 10 ³	-
	M4	1.4 x 10 ⁴	-	-
	M5	1.4 x 10 ⁵	-	-
	M6	3.2 x 10 ⁵	-	-
	M7	7 x 10 ⁵	-	-
	M8	1.1 x 10 ⁴	-	-
	M9	3 x 10 ⁵	-	-
	M10	1.4 x 10 ⁵	-	-
14 ^o	M1	2.1 x 10 ⁵	-	-
	M2	2 x 10 ³	-	-
	M3	4 x 10 ³	-	-
	M4	1.3 x 10 ⁴	-	-
	M5	3.8 x 10 ⁷	2.7 x 10 ⁶	-
	M6	4.3 x 10 ⁴	3 x 10 ²	-
	M7	2.9 x 10 ³	-	-
	M8	3.8 x 10 ⁴	1 x 10 ²	-
21 ^o	M1	5.1 x 10 ⁸	2.1 x 10 ⁶	4 x 10 ²
	M2	2.9 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁵	2 x 10 ²
	M3	1.9 x 10 ⁸	4.2 x 10 ⁸	3.2 x 10 ⁴
	M4	1.9 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁴
<i>p</i>		<i>p</i> =0.0057	<i>p</i> =0.0172	<i>p</i> =0.0091

¹ PFU/mL: Unidade Formadora de Placa/mililitro

² DPI: Dia de Pós-Infecção

³ M: Mosquito

A respeito das amostras de cabeça, o teste de KW demonstrou a ocorrência de variação nos valores dos títulos virais, com $p < \alpha$ ($p = 0.0172$), porém os grupos amostrais que apresentaram maior variação nos títulos, pelo teste de Dunn, pertencem ao 7^o e 21^o dpi, com $p < \alpha$ (< 0.05), evidenciando um aumento significativo do título viral na região da cabeça entre o 7^o e o 21^o dpi.

Ao analisar os títulos virais das amostras de corpo referentes ao 7^o, 14^o e 21^o dpi pelo teste KW, observou-se significância estatística entre os títulos ($p = 0.0057$) e o teste de Dunn revelou que a diferença entre os escores médios das amostras pertencentes ao 14^o e ao 21^o dpi apresentaram $p < \alpha$ (< 0.05) demonstrando alta significância estatística e evidenciando que há um aumento significativo do título viral nas amostras de corpo entre o 14^o e o 21^o dpi.

Em relação às amostras de saliva, o teste KW também identificou diferença estatística ($p = 0.0091$) entre os grupos amostrais, com variação nos valores dos títulos virais entre eles. O teste de Dunn, por outro lado, mostrou diferença nos escores médios dos títulos entre os grupos de 7^o e 21^o dpi e entre 14^o e 21^o dpi, ambos com $p < \alpha$ (< 0.05), demonstrando aumento significativo do título viral na saliva entre o 7^o e o 21^o dpi e entre o 14^o e o 21^o dpi.

6 DISCUSSÃO

No Brasil, a circulação do WNV foi primeiramente identificada por métodos sorológicos em amostras de vários animais como equinos e galinhas domésticas até o ano de 2013 e, em 2014 foi detectado em humanos. Contudo, foi apenas no ano de 2018 que ocorreu o primeiro isolamento do WNV em uma amostra de equino adulto proveniente do estado do Espírito Santo e, em 2021, o Instituto Evandro Chagas (IEC) confirmou, por meio de um Boletim Informativo, o segundo isolamento do WNV, nesta ocasião em um *pool* de mosquitos do gênero *Culex spp.* capturados da região de Carajás (Pará) (dados não publicados) (Martins *et al.*, 2019; Melandri *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Brasil, 2019; Ometto *et al.*, 2013).

Considerando a circulação do WNV no território brasileiro, nosso estudo teve o objetivo de avaliar a competência vetorial de fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus* da Região Amazônica ao novo vírus potencialmente emergente. Desse modo, considerando que a análise da competência vetorial é de extrema importância para o estudo de sua participação no ciclo de transmissão do arbovirus, em especial a do WNV, foram utilizados mosquitos pertencentes à geração F1 por ser a geração mais próxima àquela coletada no campo, assemelhando-se aos mosquitos presentes em um ambiente natural.

O estoque viral utilizado no presente estudo possuía um título de 1.4×10^8 PFU/mL, após a mistura de células infectadas e o sangue de carneiro utilizado no processo de infecção a amostra final do sangue infeccioso possuía um título de 7×10^7 PFU/mL. O título do estoque utilizado assemelha-se a outros estudos de competência vetorial, Goddard *et al.* (2002) utilizaram um estoque de WNV com um título variando de $10^{4,9}$ a $10^{7,1}$ PFU/mL em conjunto com 1mL de sangue de coelho, demonstrando em seu estudo que quanto maior a carga viral da refeição de sangue infeccioso oferecido aos mosquitos, maior a taxa de transmissão viral. Richards, Anderson e Lord (2014) usaram um estoque com titulação de $10^{9,2}$ PFU/mL e Romo *et al.* (2018) após misturar sobrenadante viral e sangue de bezerro, obtiveram uma alimentação infecciosa com título de 10^7 e 10^8 PFU/mL. Rochlin *et al.* (2019) em sua revisão, enfatizaram que mosquitos do gênero *Culex* são capazes de transmitir o WNV quando alimentados com sangue infectado contendo um título viral superior a 10^5 PFU/mL.

Observou-se que a população estudada possui alta susceptibilidade à cepa de WNV utilizada, uma vez que o vírus foi identificado em todas as amostras de corpo referentes ao 7^o, 14^o e 21^o dpi, assim como foi possível quantificar o título viral dessas amostras, corroborando com dados apresentados por Bakhshi *et al.* (2020) os quais demonstram que a espécie de

mosquitos *Culex pipiens* também apresenta alta suscetibilidade à cepa WNV pertencente à linhagem 1A isolada no Irã, com taxas de infecção que variaram de 70% a 88% no 7^o e 21^o dpi.

Sudeep *et al.* (2015) avaliou uma população de *Culex quinquefasciatus* proveniente da Índia, para a transmissão de três cepas distintas do WNV e conseguiram demonstrar a suscetibilidade da espécie ao vírus. Os estudos realizados por Jiang *et al.* (2010) acerca do potencial de competência vetorial de quatro diferentes espécies de mosquitos do gênero *Culex* para a transmissão da cepa Eg101 de WNV, revelaram que a espécie *Culex quinquefasciatus* teve uma taxa de infecção de 40,5% quando infectada pelo vírus.

Em estudo realizado por Romo *et al.* (2018) observou-se que mosquitos *Culex quinquefasciatus* provenientes do estado da Flórida (EUA) quando infectados por via oral com diferentes cepas de WNV pertencentes à linhagem 2, apresentavam taxa de infecção de 100%, assim como em pesquisa realizada por Micieli *et al.* (2013) no qual a mesma espécie de mosquitos, proveniente da cidade de La Plata (Argentina), apresentaram taxa de infecção de 95,5% quando alimentados com a cepa NY99-3356 de WNV, dado semelhante ao encontrado em nosso estudo.

No que concerne à análise dos títulos virais das amostras de corpo avaliadas, nossos dados mostraram um elevado aumento do título viral quando comparadas as amostras do 14^o e 21^o dpi, demonstrando que a população de *Culex quinquefasciatus* estudada manteve a replicação do WNV por um período prolongado bem como em títulos elevados, o que favorece uma possível transmissão viral.

No entanto, Richards, Anderson e Lord (2014) destacam que apesar dos altos títulos virais em amostras de corpos e pernas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* infectados por via oral com diferentes isolados de WNV, a alta taxa de infecção não está necessariamente relacionada a um igual aumento na taxa de transmissão e Bakhshi *et al.* (2020) afirmam que, embora as taxas de infecção encontradas em seu estudo não tenham mostrado diferenças estatísticas, o título viral das amostras de corpo também exibiu um crescimento significativo à medida que os dias pós-infecção aumentaram, achado semelhante ao observado em nosso estudo.

Em relação à taxa de disseminação, nosso estudo mostrou uma variação no percentual de disseminação viral, porém tal variação não se mostrou diretamente relacionada a uma continuidade de crescimento viral, fato que pode ser explicado pelo baixo número de amostras do 14^o e 21^o dpi, indicando a necessidade de realização novos testes de competência vetorial com um maior N amostral, possibilitando estabelecer com maior precisão a cinética viral da cepa brasileira do WNV. Contudo, apesar do baixo número de amostras, ao se avaliar o título

viral das amostras de cabeça, observou-se a ocorrência de uma variação entre os títulos das amostras de 7^o e 21^o dpi, com aumento significativo do título.

Brackney *et al.* (2011) em seu trabalho observaram que a disseminação do WNV em amostras de corpo de mosquitos *Culex quinquefasciatus* ocorreu de forma semelhante ao nosso estudo, no qual a taxa de disseminação no 7^o dpi foi de 58%, seguida por uma diminuição dessa taxa para apenas 36% no 14^o dpi e por um novo crescimento no 21^o dpi (55%), dados esses semelhantes aos encontrados nos referidos dias de pós-infecção de nosso estudo, onde além do aumento na taxa de disseminação também observamos um crescimento do título viral, seguido de uma queda e um novo aumento sequencial no 21^o dpi. Já em estudo realizado por Bakhshi *et al.* (2020) com mosquitos da espécie *Culex pipiens*, foi possível observar uma taxa de disseminação de 92.3% no 21^o dpi, mas sem diferenças estatísticas na análise dos títulos virais. Porém devido tratar-se de espécies distintas de mosquitos, sugere-se que uma espécie possa ser mais eficaz que outra no processo de disseminação viral do WNV.

Em nosso estudo, verificou-se a detecção do WNV em uma amostra de saliva referente ao 7^o dpi, porém não foi possível determinar o título. Essa observação pode indicar uma rápida disseminação do vírus no organismo do mosquito, atingindo a região da saliva, porém com baixa carga viral, não sendo possível sua transmissão por hematofagia, assim como demonstra a necessidade da utilização de técnicas de detecção mais sensíveis, a exemplo, técnicas de Biologia Molecular capazes de quantificar a carga viral mesmo em baixas concentrações.

Em uma pesquisa de competência vetorial, Brackney *et al.* (2011) verificaram a presença de WNV em amostras de saliva de mosquitos *Culex quinquefasciatus* a partir do 7^o dpi, com taxa de transmissão de 25%. Em nosso estudo, 100% das amostras de saliva foram positivas no 21^o dpi, enquanto os autores obtiveram 35% de positividade no 21^o dpi. A diferença na quantidade de amostras positivas de saliva identificadas no 7^o dpi em nosso estudo e no trabalho de Brackney *et al.* (2011) pode ser justificada devido a utilização de diferentes metodologias de identificação viral, posto que Brackney *et al.* empregou a técnica de RT-PCR para a detecção das amostras positivas e em nosso trabalho utilizamos as técnicas de isolamento viral e titulação por placa a partir de uma diluição inicial de 1:10, novamente demonstrando a importância da utilização em estudos de análise de competência vetorial de técnicas de detecção viral mais sensíveis.

De acordo com trabalho realizado por Sudeep *et al.* (2015), o WNV pode ser identificado em amostras de saliva de *Culex quinquefasciatus* já no 5^o dpi com um título variando de 1,4 a 1,17 PFU/mL. Os autores ressaltam ainda que o maior título viral detectado

em seu estudo foi em uma amostra referente ao 11^o dpi com título acima de 2.4 PFU/mL, valor semelhante à carga viral identificada em nosso estudo em amostras do 21^o dpi.

Richards *et al.* (2007) ressaltam ainda, que diversos aspectos ambientais podem estar envolvidos no processo de incubação extrínseca dos arbovirus, incluindo a temperatura, uma vez que, em ambientes com altas temperaturas os arbovirus tendem a ter um período de incubação extrínseco mais curto, ou seja, apresentam um período de disseminação viral mais rápido. Lima-Camara (2016) e Lopes, Nozawa e Linhares (2014) também apontam que países tropicais, como o Brasil, possuem condições ambientais extremamente favoráveis para a ocorrência do ciclo de transmissão de arbovirus, incluindo o WNV, uma vez que o clima reduz o período de incubação dos arbovirus, além de reduzir o tempo de desenvolvimento larval de várias espécies de mosquitos, aumentando a densidade populacional e assim favorecendo a transmissão dos arbovirus.

Outro aspecto que deve ser considerado em estudos de análise de competência vetorial é a ação do sistema imune inato do mosquito, aspecto essencial para a determinação da competência vetorial de um artrópode no ambiente natural, haja vista que vias de resposta imune inata, como o RNAi e a via JAK-STAT, atuam inibindo a replicação viral reduzindo assim a disseminação e transmissão de arbovirus.

Em nosso estudo, as amostras de saliva do 14^o dpi não foram positivas em nenhum dos testes realizados (isolamento viral e titulação viral), sendo possível identificar e quantificar a carga viral apenas nas amostras referentes ao 21^o dpi, com títulos que variaram de 2×10^2 a 3.2×10^4 PFU/mL, valores considerados elevados ao se analisar a saliva isoladamente, porém quando se avalia as amostras de saliva juntamente com as amostras de cabeça e corpo pertencentes ao mesmo dpi, nota-se uma redução da carga viral na saliva, sendo o título maior no corpo, cabeça e saliva, respectivamente. Esses dados assemelham-se aos identificados por Bakhshi *et al.* (2020) em pesquisa com mosquitos da espécie *Culex pipiens*, onde observou-se que apesar da presença do WNV na saliva após 21 dias da infecção, o título viral é inferior ao observado em amostras de corpo e cabeça pertencentes ao mesmo grupo.

Desse modo, ressalta-se que o baixo número de amostras presentes neste estudo revelam a necessidade de novas pesquisas para analisar a competência vetorial de mosquitos *Culex quinquefasciatus* pertencentes à Região Amazônica, para a transmissão da cepa brasileira do WNV, utilizando métodos de análise mais sensíveis como de Biologia Molecular, visto que embora a cepa viral utilizada tenha sido isolada de uma amostra proveniente da região sudeste do Brasil, vários casos humanos foram relatados no estado do Piauí (região Nordeste), mostrando a grande circulação do vírus e o risco de novos surtos de casos humanos e animais

de Febre do Nilo Ocidental em todo o território brasileiro, visto que este estudo demonstrou que mosquitos *Culex quinquefasciatus* se apresentam como importantes potenciais vetores do *West Nile virus* no Brasil, por serem uma espécie de ampla distribuição em todo o país e seu ciclo reprodutivo estar altamente adaptado aos ambientes urbanos.

7 CONCLUSÃO

- O *Culex quinquefasciatus* da Região Amazônica mostrou-se ser suscetível à infecção por via oral pela cepa brasileira de *West Nile virus*, comportando-se como um potencial vetor do WNV no Brasil devido apresentar alta susceptibilidade a infecção, com taxas de infecção de 100% nos três dpi's analisados e estar amplamente distribuído em todo o território brasileiro e apresentar-se altamente adaptado aos ambientes urbanos.
- A cepa brasileira do WNV foi capaz de superar as barreiras anatômicas, disseminando-se para todas as regiões do corpo do mosquito, sendo possível detectá-lo em todas as amostras de corpo provenientes 7^o, 14^o e 21^o dpi pela técnica de isolamento viral (padrão ouro) e titulação viral.
- Os títulos virais identificados na região do corpo no 7^o dpi variaram de 1.1×10^4 PFU/mL a 2.7×10^8 PFU/mL, no 14^o dpi de 2×10^3 PFU/mL a 2.1×10^5 PFU/mL e no 21^o dpi de 2.9×10^7 PFU/mL a 5.1×10^8 PFU/mL.
- Na região da cabeça no 7^o dpi identificou-se títulos com variação de 5×10^3 PFU/mL a 6×10^5 PFU/mL, no 14^o dpi de 1×10^2 PFU/mL a 4.2×10^6 PFU/mL e no 21^o dpi de 2×10^5 PFU/mL a 4.2×10^8 PFU/mL.
- Em relação aos títulos virais das amostras de saliva, foi possível a quantificação apenas nas amostras referentes ao 21^o dpi, que demonstraram uma variação de 2×10^2 PFU/mL a 3.2×10^4 PFU/mL.
- O presente estudo demonstrou que os títulos virais encontrados foram mais representativos nas amostras da região da cabeça, seguido da saliva e corpo dos mosquitos. No entanto, embora ocorra a disseminação viral, os títulos presentes na saliva foram muito inferiores aos encontrados nas regiões do corpo e da cabeça dos mosquitos avaliados no 21^o dpi, fato que pode indicar que as barreiras anatômicas de escape apesar de não serem capazes de inibir a disseminação, atuam minimizando-a.
- No que concerne a taxa de infecção do *Culex quinquefasciatus* oralmente infectado com a cepa brasileira de WNV, observou-se uma taxa de infecção 100% em todos os dpi's avaliados. Contudo, verificou-se uma variação na taxa de disseminação dos três dpi's analisados, com taxa de disseminação de 40% no 7^o dpi, de 37,5% no 14^o dpi e de 100% no 21^o dpi.
- O presente estudo também demonstrou que todas as amostras de saliva referentes ao 21^o dpi foram positivas, com taxa de transmissão de 100% e apenas uma amostra de

saliva, referente ao 7^o dpi, foi positiva pelo teste de isolamento viral, demonstrando uma baixa carga viral, haja vista que não foi possível realizar a titulação a uma diluição de 1:10, demonstrando a alta sensibilidade do teste de isolamento viral em cultivo de células C6/36. Não foram detectadas amostras de saliva positivas no 14^o dpi.

- Estudos futuros de análise de competência vetorial voltados para uma investigação mais aprofundada da ação de barreiras anatômicas em diversos estágios da infecção nesses artrópodes, bem como a ação do sistema imune inato nos mosquitos serão aspectos essenciais para a determinação da competência vetorial de um artrópode no ambiente natural.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M J. *et al.* West Nile virus (*Flavivirus*) infection in Portugal: Considerations about a clinical case with febrile syndrome and rash. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**, v. 8, n. 1, p.46-51, jan. 2012. Disponível em: <<http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/989/1/RPDI-VOL-8-N-1west%20nile.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- AMARAL, R.J.V., DANSA-PETRETSKI, M. Interação Patógeno-Vetor: Dengue. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (Rio de Janeiro). Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. Rio de Janeiro: Itabajara da Silva Vaz Junior, 2012. Cap. 14. P. 1-35. Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_14_Interacao_Patogeno_Vetor_-_Dengue.pdf>. Acesso em: 26 set. 2019.
- ANDREADIS, T.G. The Contribution of *Culex pipiens* Complex Mosquitoes to Transmission and Persistence of *West Nile virus* in North America. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 4, p.137-151, dez. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.2987/8756-971x-28.4s.137>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- ARJONA, A. *et al.* Innate immune control of *West Nile virus* infection. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p.1648-1658, set. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01649.x>>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- BAKHSI, H, *et al.* High Transmission Potential of *West Nile virus* Lineage 1 for *Culex pipiens* s.l. of Iran. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 397, abr. 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/v12040397>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- BARRERA, R. *et al.* Mosquito Vectors of *West Nile virus* During ver Epizootic Outbreak in Puerto Rico. **Journal Of Medical Entomology**, v. 47, n. 6, p.1185-1195, nov. 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1603/me10038>>. Acesso em: 07 set. 2019.
- BEATY, B. J, CALISHER C.H, SHOPE R.E. Arboviruses. In: Lennette E.H, Lunette D. A Lennette ET (ed.). **Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections**, 7th ed. American Public Health Association, Washington, 1995 P.189-212.
- BECKER, N., JÖST, A., WEITZEL, T. The *Culex pipiens* Complex in Europe. **Journal Of The American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 4, p.53-67, dez. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.2987/8756-971x-28.4s.53>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- BOLOGNESI, R., TERRA, C.F. **Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos**. 2005. 172 f. Tese (Doutorado) – Curso de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/T.46.2005.tde-23072007-111911>>. Acesso em: 18 jun. 2019.
- BRACKNEY, D.E. *et al.* West Nile Virus Genetic Diversity is Maintained during Transmission by *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquitoes. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 24466-24466, set. 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024466>. Acesso em: 11 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 fev. 2016. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html> Acesso em: 14 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Francisco Anilton Alves Araújo, Marcelo Santalucia. – 3ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 76 p.: il. – (Série A. Normas e manuais técnicos). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_culex_quinquefasciatus.pdf>. Acesso em: 30 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental no Brasil, 2014 a 2019**. Brasília, 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/08/informe-febre-nilo-ocidental-n1-8jul19b.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2021.

CARDOSO, B.F. *et al.* Detection of *Oropouche virus* segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p.745-754, set. 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/0074-02760150123>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

CASTRO, M.G. *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 809-814, dez. 2004. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/s0074-02762004000800005>. Acesso em: 09 out. 2020.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **West Nile virus**: Mosquito Control. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/westnile/vectorcontrol/index.html>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. 2002. Laboratory-acquired *West Nile virus* infections—United States, 2002. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 51:1133–1135. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5150a2.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

CHARLWOOD, J.D. Estudos sobre a biologia e hábitos alimentares de *Culex quinquefasciatus* Say de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 2, p.271-278, jun. 1979. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/1809-43921979092271>>. Acesso em: 05 ago. 2019.

CIOTA, A.T. *West Nile virus* and its vectors. **Current Opinion in Insect Science**, v. 22, p.28-36, ago. 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.002>>. Acesso em: 17 maio 2019.

CIOTA, A., KRAMER, L. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of *West Nile virus*. **Viruses**, v. 5, n. 12, p.3021-3047, dez. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/v5123021>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

COLPITTS, T. M. *et al.* *West Nile virus: Biology, Transmission, and Human Infection*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p.635-648, out. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1128/cmr.00045-12>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

CONSOLI, R., OLIVEIRA, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5.

COOK, S. *et al.* Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. **Journal Of General Virology**, v. 93, n. 2, p. 223-234, fev. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/vir.0.036525-0>. Acesso em: 11 jun. 2021.

CORDEIRO, F. **Piauí registra primeira morte no Brasil por febre do Nilo Ocidental**. 2019. O Estado de S. Paulo. Disponível em: <https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,piawai-registra-primeira-morte-no-brasil-por-febre-do-nilo-ocidental,70002936236>. Acesso em: 03 set. 2019.

COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of *Yellow Fever virus* in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-12, jul. 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>>. Acesso em: 11 out. 2019.

CROCKETT, R.K. *et al.* *Culex Flavivirus* and *West Nile virus* in *Culex quinquefasciatus* Populations in the Southeastern United States. **Journal Of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p.165-174, jan. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1603/me11080>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

CRUZ, A.C. *et al.* *Ilheus Virus (Flaviviridae, Flavivirus)* Is Closely Related to *Japanese Encephalitis Virus* Complex. **Intervirolgy**, v. 40, n. 4, p. 220-225, 1997. Disponível em: <http://doi.org/10.1159/000150550>. Acesso em: 11 jun. 2021.

DONALISIO, M.R., FREITAS, A.R.R., VON ZUBEN, A.P.B. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, p.1-6, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Some Problems of Animal Virology as Studied By The Plaque Technique. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 273-279, jan. 1953. Disponível em: <http://doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.039>. Acesso em: 09 ago. 2019.

FALL, G. *et al.* Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of *West Nile virus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p.747-754, abr. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0405>>. Acesso em: 02 set. 2019.

FALL, G. *et al.* Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of *West Nile virus*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 0006078, nov. 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006078>. Acesso em: 11 jun. 2021.

FIGUEIREDO, L.T.M. Uso de células de *Aedes albopictus* C_{6/36} na propagação e classificação de arbovirus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p.13-18, mar. 1990. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0037-86821990000100003>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

FORATTINI, O.P. Biologia Geral das Formas Adultas. In: FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 2002. Cap. 3. P. 97-130.

GAUNT, M.W. *et al.* Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal Of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1867-1876, ago. 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>. Acesso em: 11 jun. 2021.

GODDARD, L.B. *et al.* Vector Competence of California Mosquitoes for *West Nile virus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1385-1391, dec. 2002. Disponível em: <<http://doi.org/10.3201/eid0812.020536>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

GOENAGA, S. *et al.* Potential for Co-Infection of a Mosquito-Specific *Flavivirus*, *Nhumirim Virus*, to Block *West Nile virus* Transmission in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 11, p.5801-5812, nov. 2015. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/v7112911>>. Acesso em: 01 mar. 2019.

GUBLER, F. Immunofluorescence localisation of microtubules in plant root tips embedded in butyl-methyl methacrylate. **Cell Biology International Reports**, v. 13, n. 1, p.137-145, jan. 1989. Disponível em: <[http://doi.org/10.1016/s0309-1651\(89\)80015-3](http://doi.org/10.1016/s0309-1651(89)80015-3)>. Acesso em: 13 ago. 2019.

GUEDES, D.R.D. **Análise Da Competência Vetorial Para O Vírus Dengue Em Populações Naturais De *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* de Pernambuco**. 2012. 102 f. Tese (Doutorado) – Curso de Curso de Doutorado em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–cpqam, Fundação Oswaldo Cruz-fiocruz/ms, Recife, 2012. Cap. 54. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2012guedes-drd.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GUERRA, A.F. **Microbiologia de Alimentos: Métodos de contagem microbiana**. Valença: Editora Valença, 2016. 28 p. Disponível em: <www.microbiologia-de-alimentos.com>. Acesso em: 13 ago. 2019.

HANNON, E. R. *et al.* Bloodmeal Host Selection of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Las Vegas, Nevada, United States. **Journal Of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p.603-608, jan. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/jme/tjy237>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

HARBACH, R.E. *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 4, p. 10-23, dez. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.2987/8756-971x-28.4.10>. Acesso em: 03 mar. 2021.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. **Journal Of General Virology**, v. 40, n. 3, p. 531-544, 1 set. 1978. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-40-3-531>. Acesso em: 04 ago. 2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. Microbiology Society. **Taxonomic Information**. 2019. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 27 set. 2019.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. Microbiology Society. **Genus: Flavivirus**. 2021. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus. Acesso em: 27 mar. 2021.

JIANG, S.F *et al.* Experimental Studies on Comparison of the Potential Vector Competence of Four Species of *Culex* Mosquitoes in China to Transmit *West Nile Virus*. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 788-790, set. 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1603/me08292>. Acesso em: 02 mar. 2021.

KAUFMANN, B. *et al.* Neutralization of *West Nile virus* by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p.18950-18955, out. 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1073/pnas.1011036107>. Acesso em: 13 jul. 2019

KINGSOLVER, M. B.; HARDY, R. W. Making connections in insect innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p.18639-18640, out. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1073/pnas.1216736109>. Acesso em: 09 jul. 2019.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066-4071, nov. 2000. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4066-4071.2000>. Acesso em: 04 ago. 2021.

LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for Rapid Detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4506-4513, dez. 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4506-4513.2001>. Acesso em: 04 ago. 2021.

LAPORTA, G. Z.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p.125-127, mar. 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/s0085-56262006000100019>. Acesso em: 30 set. 2019.

- LEE, W. *et al.* Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p.1-12, abr. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- LIMA-CAMARA, T.N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 50, p.1-7, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s1518-8787.2016050006791>>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p.55-64, set. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.5123/s2176-62232014000300007>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- MAHARAJ, P. D. *et al.* Genetic Determinants of Differential Oral Infection Phenotypes of *West Nile* and *St. Louis Encephalitis Viruses* in *Culex spp.* Mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p.1066-1072, nov. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0289>>. Acesso em: 17 maio 2019.
- MARTÍN-ACEBES, M.A. *West Nile virus*: A re-emerging pathogen revisited. **World Journal of Virology**, v. 1, n. 2, p.51-70, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.5501/wjv.v1.i2.51>>. Acesso em: 09 set. 2019.
- MARTINS, L.C. *et al.* First isolation of *West Nile virus* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p.1-7, dez. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/0074-02760180332>>. Acesso em: 05 set. 2019.
- MELANDRI, V. *et al.* Serological detection of *West Nile virus* in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p.1073-1075, dez. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0074-02762012000800020>>. Acesso em: 05 set. 2019.
- MICIELI, M.V. *et al.* Vector Competence of Argentine Mosquitoes (Diptera: culicidae) for *West Nile Virus (Flaviviridae: Flavivirus)*. **Journal Of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 853-862, jul. 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1603/me12226>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- NEVES, D.P. *et al.* Artrópodes. In: NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Básica**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. Cap. 36.
- NITATPATTANA, N. *et al.* First Isolation Of *Japanese Encephalitis* From *Culex quinquefasciatus* In Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 36, n. 4, p.875-878, jul. 2005. Disponível em: <https://www.tn.mahidol.ac.th/seameo/2005_36_4/10-3604.pdf>. Acesso em: 15 out. 2019.
- NUÑEZ, A.I. *et al.* Evidence of *Zika virus* horizontal and vertical transmission in *Aedes albopictus* from Spain but not infectious virus in saliva of the progeny. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2236-2244, jan. 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1080/22221751.2020.1830718>. Acesso em: 09 out. 2020.

OCHSENREITER, R., HOFACKER, I., WOLFINGER, M. Functional RNA Structures in the 3'UTR of Tick-Borne, Insect-Specific and No-Known-Vector Flaviviruses. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 298, mar. 2019. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/v11030298>. Acesso em: 11 jun. 2021.

OMETTO, T. *et al.* West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723-730, set. 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/trstmh/trt081>. Acesso em: 22 maio 2019.

PARADKAR, P.N. *et al.* Dicer-2-Dependent Activation of *Culex Vago* Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p.2823-2835, abr. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002823>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Neutralising antibodies for *West Nile virus* in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p.467-474, jun. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0074-02762011000400014>>. Acesso em: 05 set. 2019.

PESKO, K., MORES, C.N. Effect of Sequential Exposure on Infection and Dissemination Rates for *West Nile* and *St. Louis Encephalitis Viruses* in *Culex quinquefasciatus*. **Vector-borne And Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 3, p.281-286, jun. 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1089/vbz.2007.0281>>. Acesso em: 03 set. 2019.

PIMENTEL, V. *et al.* Geographic dispersal and genetic diversity of tick-borne phleboviruses (*Phenuiviridae*, Phlebovirus) as revealed by the analysis of L segment sequences. **Ticks And Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p.942-948, jun. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.001>>. Acesso em: 23 out. 2019.

RIBEIRO, P.B. *et al.* Exigências térmicas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 94, n. 2, p.177-180, jun. 2004. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0073-47212004000200010>>. Acesso em: 17 set. 2019.

RICHARDS, S.L., ANDERSON, S.L., LORD, C.C. Vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for *West Nile virus* isolates from Florida. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 5, p.610-617, fev. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/tmi.12277>>. Acesso em: 02 set. 2019.

ROCHA, T.C., GOMES, E.C., SVOBODA, W.K. **Investigação de Arbovirus (Gênero *Flavivirus*) de Interesse à Saúde Pública em Primatas Não Humanos nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/35348/R%20-%20D%20-%20TATIANA%20CARNEIRO%20DA%20ROCHA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

ROCHLIN, I. *et al.* *West Nile virus* vectors in North America. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1475-1490, set. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/jme/tjz146>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

ROMERO, M. **Exames confirmam morte por Febre do Nilo Ocidental no Piauí**: terceiro caso da doença no Brasil. terceiro caso da doença no Brasil. 2019. G1 - Piauí. Disponível em: <https://g1.globo.com/pi/piaui/noticia/2019/07/24/piaui-registra-morte-por-febre-do-nilo-ocidental-caso-e-o-terceiro-da-doenca-no-brasil.ghtml>. Acesso em: 03 set. 2019.

ROMO, H. *et al.* Comparative Vector Competence of North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* for African and European Lineage 2 *West Nile Viruses*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1863-1869, jun. 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0935>. Acesso em: 04 mar. 2021.

SALAZAR, M.Isabel *et al.* *Dengue virus* type 2: replication and tropisms in orally infected *aedes aegypti* mosquitoes. **Bmc Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 9-22, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>. Acesso em: 08 out. 2019.

SANTOS, L. **Secretaria de Saúde confirma 2º caso de Febre do Nilo no Piauí e faz alerta**. 2019. Cidade Verde. Disponível em: <https://cidadeverde.com/noticias/293085/secretaria-de-saude-confirma-2-caso-de-febre-do-nilo-no-piaui-e-faz-alerta>. Acesso em: 03 set. 2019.

SAWABE, K. *et al.* Host-Feeding Habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 3, p. 442-450, maio 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1603/me09256>. Acesso em: 11 jun. 2021.

SERRÃO, M.L.C. **Competência Vetorial de *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) Proveniente do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Railliet & Henry 1911**. 2004. 100 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://www.adivaldofonseca.vet.br/Teses%20e%20dissertacoes/Serrao%202004%20doutorado.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2019.

SILVA, C.P., LEMOS, F.J.A., SILVA, J.R. Digestão em Insetos. In: SILVA NETO, M. A. C (Rio de Janeiro). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012. Cap. 5. P. 1-32. Disponível em: http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_5_Digestao_em_Insetos.pdf. Acesso em: 18 jun. 2019.

SILVA, H.H.G., SILVA, I.G., LIRA, K.S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 27, n. 1, p. 53-63, jan./jun. 1998. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/17196/10368>

SILVA, J.R. *et al.* Serologic survey of *West Nile virus* in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p.921-923, nov. 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/0074-0276130052>. Acesso em: 05 set. 2019.

SILVA, L.J., ANGERAMI, R.N. **Viroses Emergentes no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. 134 p.

SILVA, R.C., LANGONI, H. Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p.1615-1624, abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0103-84782009005000062>>. Acesso em: 01 out. 2019.

SMITHBURN, K.C. *et al.* A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1-20, n. 4, p. 471-492, jul. 1940. Disponível em: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>. Acesso em: 11 jun. 2021.

SOARES, C.N. *et al.* Is *West Nile virus* a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 68, n. 5, p.761-763, out. 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s0004-282x2010000500016>>. Acesso em: 09 set. 2019.

SOJKA, D. *et al.* New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends In Parasitology**, v. 29, n. 6, p.276-285, jun. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002>>. Acesso em: 26 set. 2019.

SOUZA-NETO, J.A., POWELL, J.R., BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p.191-209, jan. 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>>. Acesso em: 06 mar. 2019.

SUDEEP, A.B. *et al.* Vector competence of two Indian populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to three *West Nile virus* strains. **J Vector Borne Dis.**, v. 3, n. 52, p. 185-192, set. 2015. Disponível em: <http://www.mrcindia.org/journal/issues/523185.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2021.

TESH, R.B. A Method for the Isolation and Identification of *Dengue Viruses*, using Mosquito Cell Cultures*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 6, p. 1053-1059, nov. 1979. Disponível em: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1979.28.1053>. Acesso em: 11 jun. 2021.

VASILAKIS, N. *et al.* Exploiting the Legacy of the Arbovirus Hunters. **Viruses**, v. 11, n. 5, p.471-509, maio 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/v11050471>>. Acesso em: 15 out. 2019.

VAZEILLE, M. *et al.* Orally Co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, Can Deliver Both Dengue and Chikungunya Infectious Viral Particles in Their Saliva. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 706, jun. 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706>. Acesso em: 04 mar. 2021.

VIANA, L.R.C. *et al.* Arboviroses reemergentes: perfil clínico-epidemiológico de idosos hospitalizados. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 52, p.1-7, nov. 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/s1980-220x2017052103403>>. Acesso em: 05 set. 2019.

VOGELS, C.B.F. *et al.* Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for *West Nile virus* is differentially affected by temperature. **Parasites & Vectors**, v.

9, n. 1, p.1-7, jul. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s13071-016-1677-0>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

WELLER, T.H., COONS, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. **Experimental Biology and Medicine**, v. 86, n. 4, p. 789-794, 1954. Disponível em: <http://doi.org/10.3181/00379727-86-21235>. Acesso em: 01 jul. 2021.

WESTAWAY, E.G. *et al.* *Flaviviridae*. **Intervirolgy**, v. 24, n. 4, p. 183-192, 1985. Disponível em: <http://doi.org/10.1159/000149642>. Acesso em: 11 jun. 2021.

WORK, T.H., HURLBUT, H.S., TAYLOR, R.M. Indigenous Wild Birds of the Nile Delta as Potential *West Nile Virus* Circulating Reservoirs 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, n. 5, p. 872-888, 1955. Disponível em: <http://doi.org/10.4269/ajtmh.1955.4.872>. Acesso em: 11 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *West Nile virus*. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>>. Acesso em: 06 mar. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Infección por el virus del Nilo Occidental**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>>. Acesso em: 06 mar. 2019.

ZITTRA, C. *et al.* Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p.1-9, abr. 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s13071-016-1495-4>>. Acesso em: 15 out. 2019.

ANEXO A

Espécies de pássaros mortos em que foi detectado *West Nile virus* nos Estados Unidos, 1999 a 2016.



Species of dead birds in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2016

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive	Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Abyssinian Ground-Hornbill	Exotic-Captive	Boat-tailed Grackle	Native
Acorn Woodpecker	Native	Bobolink	Native
African Grey Parrot	Exotic-Captive	Boreal Owl	Native-Captive
African Penguin	Exotic-Captive	Brewer's Blackbird	Native
American Coot	Native	Broad-winged Hawk	Native
American Crow	Native	Bronzed Cowbird	Native
American Dipper	Native	Bronze-winged Duck	Exotic-Captive
American Goldfinch	Native	Brown Thrasher	Native
American Kestrel	Native	Brown-headed Cowbird	Native
American Robin	Native	Budgerigar	Exotic-Captive
American White Pelican	Native	Bufflehead	Native-Captive
Anna's Hummingbird	Native	Bullock's Oriole	Native
Ash-throated Flycatcher	Native	Burrowing Owl	Native
Bald Eagle	Native	Bushitit	Native
Baltimore Oriole	Native	Cackling Goose	Native
Band-tailed Pigeon	Native	Cactus Wren	Native
Bank Swallow	Native	California Condor	Native
Barn Owl	Native	California Gull	Native
Barn Swallow	Native	California Quail	Native
Barred Owl	Native	California Towhee	Native
Belted Kingfisher	Native	Canada Goose	Native
Black Phoebe	Native	Canada Warbler	Native
Black Skimmer	Native	Canary-winged Parakeet	Exotic-Captive
Black Vulture	Native	Canvasback	Native-Captive
Black-billed Magpie	Native	Carolina Chickadee	Native
Black-capped Chickadee	Native	Carolina Wren	Native
Black-capped Lory	Exotic-Captive	Caspian Tern	Native
Black-chinned Hummingbird	Native	Cassin's Finch	Native
Black-chinned Sparrow	Native	Cattle Egret	Native
Black-crowned Night Heron	Native	Cedar Waxwing	Native
Black-headed Grosbeak	Native	Chestnut-backed Chickadee	Native
Blackpoll Warbler	Native	Chihuahuan Raven	Native
Black-throated Blue Warbler	Native	Chilean Flamingo	Exotic-Captive
Black-throated Gray Warbler	Native	Chimney Swift	Native
Black-whiskered Vireo	Native	Chinese Goose	Exotic-Captive
Blue Jay	Native	Chipping Sparrow	Native
Blue-crowned Conure	Exotic-Captive	Chukar	Introduced
Blue-eared Pheasant	Exotic-Captive	Cinereus Vulture	Exotic-Captive
Blue-streaked Lory	Exotic-Captive	Cinnamon Teal	Native
Blythe's Tragopan	Exotic-Captive	Clapper Rail	Native

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive	Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Clark's Grebe	Native	Glaucous-winged Gull	Native
Clark's Nutcracker	Native	Golden Eagle	Native
Cliff Swallow	Native	Golden-crowned Sparrow	Native
Cockatiel	Exotic-Captive	Gouldian Finch	Exotic-Captive
Cockatoo	Exotic-Captive	Gray Catbird	Native
Common Black-Hawk	Native	Gray-cheeked Thrush	Native
Common Canary	Exotic-Captive	Great Black-backed Gull	Native
Common Goldeneye	Native-Captive	Great Blue Heron	Native
Common Grackle	Native	Great Crested Flycatcher	Native
Common Ground-Dove	Native	Great Egret	Native
Common Loon	Native	Great Gray Owl	Native-Captive
Common Merganser	Native-Captive	Great Horned Owl	Native
Common Moorhen	Native	Greater Flamingo	Exotic-Captive
Common Murre	Native	Greater Prairie-Chicken	Native
Common Nighthawk	Native	Greater Roadrunner	Native
Common Peafowl	Exotic-Captive	Greater Sage-Grouse	Native
Common Raven	Native	Greater Scaup	Native
Common Yellowthroat	Native	Greater White-fronted Goose	Native
Cooper's Hawk	Native	Great-tailed Grackle	Native
Costa's Hummingbird	Native	Green Heron	Native
Crimson-fronted Parakeet	Exotic-Captive	Green-winged Teal	Native-Captive
Crimson Rosella	Exotic-Captive	Guanay Cormorant	Exotic-Captive
Dark-eyed Junco	Native	Gyr Falcon	Native-Captive
Dickcissel	Native	Hairy Woodpecker	Native
Domestic Chicken	Exotic-Captive	Hammond's Flycatcher	Native
Double-crested Cormorant	Native	Harris' Hawk	Native
Downy Woodpecker	Native	Hawaiian Goose (Nene)	Exotic-Captive
Dusky Lory	Exotic-Captive	Hermit Thrush	Native
Eastern Bluebird	Native	Herring Gull	Native
Eastern Kingbird	Native	Hooded Crow	Exotic-Captive
Eastern Phoebe	Native	Hooded Merganser	Native
Eastern Screech-Owl	Native	Hooded Oriole	Native
Eastern Towhee	Native	Hooded Warbler	Native
Elegant Crested Tinamou	Exotic-Captive	House Finch	Native
Elf Owl	Native	House Sparrow	Introduced
Emperor Goose	Native-Captive	House Wren	Native
Emu	Exotic-Captive	Humboldt Penguin	Exotic-Captive
Eurasian Collared-Dove	Introduced	Impeyan Pheasant	Exotic-Captive
Eurasian Jay	Exotic-Captive	Inca Dove	Native
Eurasian Wigeon	Native	Inca Tern	Exotic-Captive
European Goldfinch	Exotic-Captive	Kentucky Warbler	Native
European Starling	Introduced	Killdeer	Native
Evening Grosbeak	Native	Lark Sparrow	Native
Ferruginous Hawk	Native	Laughing Gull	Native
Field Sparrow	Native	Lazuli Bunting	Native
Fish Crow	Native	Least Bittern	Native
Flammulated Owl	Native	Least Tern	Native
Fox Sparrow	Native	LeConte's Thrasher	Native
Gila Woodpecker	Native	Lesser Goldfinch	Native

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Lesser Nighthawk	Native
Lesser Scaup	Native
Lewis' Woodpecker	Native
Limpkin	Native
Lincoln's Sparrow	Native
Loggerhead Shrike	Native
Long-eared Owl	Native
Macaw	Exotic-Captive
MacGillivray's Warbler	Native
Mallard	Native
Merlin	Native
Mexican Jay	Native
Micronesian Kingfisher	Exotic-Captive
Mississippi Kite	Native
Monal Pheasant	Exotic-Captive
Mottled Duck	Native
Mountain Bluebird	Native
Mountain Chickadee	Native
Mountain Quail	Native
Mourning Dove	Native
Muscovy Duck	Native-Captive
Mute Swan	Introduced
Nashville Warbler	Native
Northern Bobwhite	Native
Northern Cardinal	Native
Northern Flicker	Native
Northern Goshawk	Native
Northern Harrier	Native
Northern Hawk-Owl	Native-Captive
Northern Mockingbird	Native
Northern Parula	Native
Northern Pintail	Native-Captive
Northern Saw-whet Owl	Native
Northern Waterthrush	Native
Nutmeg Mannikin	Exotic-Captive
Nuttall's Woodpecker	Native
Oak Titmouse	Native
Olive-sided Flycatcher	Native
Orange-crowned Warbler	Native
Orchard Oriole	Native
Osprey	Native
Ovenbird	Native
Pacific Parrotlet	Exotic-Captive
Pacific-slope Flycatcher	Native
Pale-headed Rosella	Exotic-Captive
Palm Tanager	Exotic-Captive
Pelagic Cormorant	Native
Peregrine Falcon	Native
Pied-billed Grebe	Native

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Pine Siskin	Native
Pinyon Jay	Native
Piping Plover	Native
Prairie Falcon	Native
Puna Teal	Exotic-Captive
Purple Finch	Native
Purple Gallinule	Native
Purple Martin	Native
Pygmy Nuthatch	Native
Rainbow Lorikeet	Exotic-Captive
Red Crossbill	Native
Red Lory	Exotic-Captive
Red-bellied Woodpecker	Native
Red-breasted Goose	Exotic-Captive
Red-breasted Nuthatch	Native
Red-breasted Sapsucker	Native
Red-crowned Parrot	Exotic-Captive
Red-eyed Vireo	Native
Red-headed Woodpecker	Native
Red-shouldered Hawk	Native
Red-tailed Hawk	Native
Red-winged Blackbird	Native
Ring-billed Gull	Native
Ringed Turtle-Dove	Introduced
Ring-necked Pheasant	Introduced
Rock Pigeon	Introduced
Rock Wren	Native
Rose-breasted Grosbeak	Native
Rough-legged Hawk	Native
Ruby-throated Hummingbird	Native
Ruddy Duck	Native
Ruddy Turnstone	Native
Ruffed Grouse	Native
Rufous Hummingbird	Native
Rusty Blackbird	Native
Sandhill Crane	Native
Satyr Tragopan	Exotic-Captive
Savannah Sparrow	Native
Scarlet Ibis	Exotic-Captive
Scarlet Tanager	Native
Scissor-tailed Flycatcher	Native
Sharp-shinned Hawk	Native
Short-eared Owl	Native
Smew	Exotic-Captive
Snow Goose	Native-Captive
Snowy Egret	Native
Snowy Owl	Native-Captive
Society Finch	Exotic-Captive
Song Sparrow	Native

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Sora	Native
Spotted Owl	Native-Captive
Spotted Towhee	Native
Steller's Jay	Native
Swainson's Hawk	Native
Swainson's Thrush	Native
Swallow-tailed Kite	Native
Swamp Sparrow	Native
Tawny Owl	Exotic-Captive
Tennessee Warbler	Native
Thayer's Gull	Native
Thick-billed Parrot	Exotic-Captive
Townsend's Warbler	Native
Tree Swallow	Native
Tricolored Blackbird	Native
Tufted Titmouse	Native
Tundra Swan	Native
Turkey Vulture	Native
Varied Thrush	Native
Varied Tit	Exotic-Captive
Veery	Native
Violet-necked Lorikeet	Exotic-Captive
Virginia Rail	Native
Warbling Vireo	Native
Wedge-tailed Eagle	Exotic-Captive
Western Bluebird	Native
Western Kingbird	Native
Western Meadowlark	Native
Western Sandpiper	Native
Western Screech-Owl	Native
Western Scrub-Jay	Native
Western Tanager	Native
Whip-poor-will	Native
White-breasted Nuthatch	Native
White-crowned Pigeon	Native
White-crowned Sparrow	Native
White-faced Ibis	Native
White-tailed Kite	Native
White-winged Dove	Native
Whooping Crane	Native-Captive
Wild Turkey	Native
Willow Flycatcher	Native
Wilson's Warbler	Native
Winter Wren	Native
Wood Duck	Native-Captive
Wood Thrush	Native
Yellow Warbler	Native
Yellow-bellied Sapsucker	Native
Yellow-billed Cuckoo	Native

Bird species/Common name	Native/Exotic/Captive
Yellow-billed Duck	Exotic-Captive
Yellow-billed Magpie	Native
Yellow-crowned Night-Heron	Native
Yellow-rumped Warbler	Native
Yellow-throated Warbler	Native
Zebra Finch	Exotic-Captive
Zenaida Dove	Exotic-Captive

ANEXO B

Espécies de mosquitos já identificadas com *West Nile virus* nos Estados Unidos, 1999 a 2016.



Mosquito species in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2016

Mosquito Species
Aedes aegypti
Aedes albopictus
Aedes atlanticus/tormentor
Aedes atropalpus
Aedes canadensis
Aedes cantator
Aedes cinereus
Aedes condolecens*
Aedes dorsalis
Aedes dupreei
Aedes epactius
Aedes fitchii
Aedes fulvus pallens
Aedes grossbecki
Aedes infirmatus
Aedes japonicus
Aedes melanimon
Aedes nigromaculis
Aedes provocans
Aedes sollicitans
Aedes squamiger
Aedes sticticus
Aedes stimulans
Aedes taeniorhynchus
Aedes triseriatus
Aedes trivittatus
Aedes vexans
Anopheles atropos
Anopheles barberi
Anopheles bradleyi/crucians
Anopheles franciscanus
Anopheles freeborni
Anopheles hermsi
Anopheles punctipennis
Anopheles quadrimaculatus
Anopheles walkeri
Coquillettidia perturbans
Culex apicalis
Culex bahamensis
Culex coronator

Mosquito Species
Culex erraticus
Culex erythrothorax
Culex nigripalpus
Culex pipiens
Culex quinquefasciatus
Culex restuans
Culex salinarius
Culex stigmatosoma
Culex tarsalis
Culex territans
Culex thriambus
Culiseta incidens
Culiseta impatiens
Culiseta inornata
Culiseta melanura
Culiseta morsitans
Culiseta particeps
Deinocerites cancer
Mansonia titillans
Orthopodomyia signifera
Psorophora ciliata
Psorophora columbiae
Psorophora ferox
Psorophora howardii
Psorophora signipennis
Uranotaenia sapphirina

* This species was detected in 2003 in Monroe County, FL; but was not reported to ArboNET