

Caracterização e relacionamento antigênico de três novos *Bunyavirus* no grupo Anopheles A (*Bunyaviridae*) dos arbovirus*

Characterization and antigenic relationship of three new Bunyavirus in the Anopheles A serogroup (Bunyaviridae) of arboviruses

Jorge Fernando Soares Travassos da Rosa**, Amélia Paes de Andrade Travassos da Rosa**, Nicolas Dégallier***, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos***

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. et al. Caracterização e relacionamento antigênico de três novos *Bunyavirus* no grupo Anopheles A (*Bunyaviridae*) dos arbovirus. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 26: 173-8, 1992. São descritos o isolamento e a caracterização de três novos arbovirus isolados na região da Usina Hidro-Elétrica de Tucuruí (UHE-TUC). Os três novos arbovirus pertencem ao grupo Anopheles A (ANA), gênero *Bunyavirus* (família *Bunyaviridae*). Os vírus Tucuruí (TUC), Caraiapé (CPE) e Arumateua (ART) são relacionados entre si e com o vírus Trombetas (TBT), formando dentro do grupo ANA um complexo chamado Trombetas. Os arbovirus TUC, CPE e ART foram obtidos a partir de lotes de mosquitos *Anopheles (Nyssorhynchus)* sp capturados em Tucuruí, nas proximidades da usina hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará, nos meses de fevereiro, agosto e outubro de 1984, respectivamente. Até o final de 1990 os vírus TUC, CPE e ART foram isolados 12, 32 e 28 vezes respectivamente, sempre na região da UHE-TUC, exceção feita ao vírus TUC, do qual se obteve uma amostra procedente de Balbina, onde também foi construída uma hidroelétrica. Até o presente, esses vírus só foram isolados a partir de mosquitos do grupo *An. (Nys.)* principalmente, a partir das espécies *An. (Nys.) nuneztovari* e *An. (Nys.) triannulatus* também consideradas vetores secundários da malária na Amazônia Brasileira. Testes sorológicos executados com soros humanos e de diversas espécies de animais silvestres foram negativos, com exceção de um soro de um carnívoro de espécie *Nasua nasua* que neutralizou a amostra TUC em títulos de 2.6 índice logarítmico de neutralização (ILN).

Descritores: *Bunyaviridae*, isolamento. *Anopheles*, microbiologia

Introdução

O gênero *Bunyavirus* pertence à família *Bunyaviridae* que compreende mais de 200 vírus que infectam vertebrados e/ou invertebrados. Os *Bunyavirus* são vírus cujo ácido nucléico é o RNA. Este apresenta aspecto linear de fita única, negativo, com configuração circular. Esses vírus possuem uma enzima RNA transcriptase. A partícula viral apresenta-se sob a forma de nucleocapsídeo com simetria helicoidal ou circular, com diâmetro variando de 2 - 12 nm, e é envolta por um envelope lipoprotéico de 70

- 100 nm de dimensões no maior eixo. A partícula íntegra possui de 90 - 100 nm de tamanho³.

Os *Bunyavirus* incluem o supergrupo *Bunyamwera*, ao qual pertencem 18 grupos antigênicos, afora três vírus não grupados. Esses 18 sorogrupos têm sido grupados na base de reações sorológicas cruzadas³. Dentre esses, está o grupo *Anopheles A* (ANA).

Os vírus do grupo ANA são transmitidos predominantemente por mosquitos^{3,8}. Neste grupo foram descritos até o presente 6 membros⁸, sendo que 3 deles circulam há algum tempo na Amazônia Brasileira, a saber: Tacaiuma (TCM), Lukuni (LUK) e Trombetas (TBT), este último ainda não registrado. Com exceção do TCM, que causa uma síndrome febril aguda acompanhada de fortes dores musculares⁹ nos indivíduos acometidos, nenhum outro vírus tem sido incriminado como patógeno humano. O TCM, também se constitui no único tipo que possui hemaglutinina⁴.

No presente trabalho descreve-se o isolamento, caracterização e relacionamento antigênico

* Trabalho realizado com o apoio financeiro da Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM) e Centrais Elétricas do Norte do Brasil S.A. (ELETRO-NORTE).

** Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) em Arboviroses, Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional da Saúde/Ministério da Saúde - Belém, PA - Brasil.

*** ORSTOM, Instituto Evandro Chagas - Belém, PA - Brasil.

Separatas/Reprints: J.F.S. Travassos da Rosa - Av. Almirante Barroso, 492 - 66090-000 - Belém, PA - Brasil.

co de 3 novos membros do grupo ANA que foram isolados de mosquitos do grupo *Anopheles (Nyssorhynchus)*, na área de abrangência da usina hidrelétrica de Tucuruí (UHE-TUC), Estado do Pará.

Material e Método

Capturas

As capturas foram realizadas utilizando-se as técnicas de isca humana com sucção oral e isca luminosa. As capturas com isca humana foram feitas nos horários de 8-12h e 14-18h, enquanto que os com isca luminosa de 19h às 6h da manhã seguinte, utilizando a armadilha tipo "Miniature CDC Light Trap". As viagens, das quais obtiveram-se os isolamentos, foram realizadas no ano de 1984, nos meses de fevereiro, agosto e outubro.

Identificação e Inoculação dos Mosquitos

Uma vez capturados, os mosquitos eram colocados em tubos criogênicos, rotulados com data, hora e local de coleta, bem como tipo de captura empregada. A seguir, eram imersos em nitrogênio líquido permanecendo assim até a identificação no laboratório, realizada sob refrigeração. Os mosquitos, após serem identificados por data, eram agrupados de acordo com espécie e sexo e a seguir macerados em gral de porcelana. O macerado, suspenso em uma solução fosfato tamponada de albumina bovina (fração V) contendo 200 unidades de penicilina e 200 ug de estreptomicina, centrifugado a 2.000 RPM. O sobrenadante, era finalmente inoculado (0,02 ml) por via intra cerebral (ic) em camundongos albinos "swiss" recém nascidos (1 a 3 dias).

Isolamento e Caracterização das Amostras

Os camundongos inoculados eram observados diariamente, por 21 dias no biotério, fim dos quais eram eliminados se não apresentassem sinais de doença. Entretanto, se no decorrer desse período apresentavam-se doentes, eram colhidos para realização de passagem para estoque de vírus e realização de testes sorológicos para identificação. Os testes utilizados foram os de Fixação de Complemento (FC) em placas, de acordo com a técnica descrita por Fulton and Dumbell⁷, e Neutralização (N) em camundongos recém-nascidos¹⁰, nos quais utilizaram-se cérebros de camundongos infectados como fonte de antígeno

e vírus, respectivamente. Soros hiperimunes foram preparados em camundongos jovens, inoculados por via intra peritoneal a cada 7 dias com 0,2 ml de suspensão de cérebros de camundongos infectados, diluídos em solução salina a 0,85%, por 4 semanas. Sete dias após a quarta injeção, colheu-se sangue¹⁰.

Resultados

Em fevereiro de 1984 foi realizada viagem decorrente de convênio celebrado entre o Instituto Evandro Chagas (IEC) e a Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM), através do Programas de Polos (POLOAMAZÔNIA), para coleta de dípteros hematófagos nas proximidades da UHE-TUC que estava então sendo construída (Fig. 1), quando se isolou uma

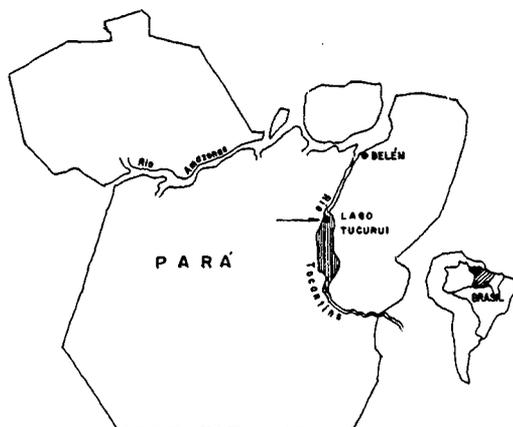


Figura 1. Mapa do local de isolamento original dos vírus Tucuruí, Caraipe e Arumateua.

amostra de vírus, BE AR 422535, identificada como pertencente ao grupo ANA a qual foi dada a denominação de Tucuruí (TUC). Em agosto do mesmo ano, outra viagem decorrente do convênio firmado entre o IEC e as Centrais Elétricas do Norte do Brasil S.A. (ELETRONORTE), foi realizada na área supracitada, no decorrer da qual foi isolada a amostra BE AR 428793. Ainda no mesmo ano, em outubro, se isolou de espécimes colhidos de uma terceira viagem ao mesmo local, o vírus BE AR 437811. Ambos foram identificados também como pertencentes ao grupo ANA e receberam os nomes de Caraipe (CPE) e Arumateua (ART), respectivamente. Todos os três vírus foram isolados a partir de lotes de mosquitos *Anopheles (Nyssorhynchus) sp* capturados através isca humana com sucção oral, em horários de 8 - 12h e 14 - 18h. As três

Tabela 1. Resultados dos testes de fixação de complemento cruzada entre os vírus do grupo Anopheles A.

Antígenos	Soros Imunes					
	Tucuruí	Caraipé	Arumateua	Trombetas	Lukuni	Tacaiuma
Tucuruí	64	256	0	256	8	0
Caraipé	64	256	0	256	64	0
Arumateua	0	8	32	8	0	0
Trombetas	32	256	0	64	0	0
Lukuni	0	32	0	8	16	0
Tacaiuma	0	0	0	0	0	64

Tabela 2. Resultados dos testes de neutralização cruzada* em camundongos entre os vírus do grupo Anopheles A.

Vírus	Soros Imunes					
	Tucuruí	Caraipé	Arumateua	Trombetas	Lukuni	Tacaiuma
Tucuruí	4,5*	<0,8	<0,8	0	0,9	<1,1
Caraipé	<0,5	>3,8	0,4	0	<0,6	0
Arumateua	<0,2	<0,3	3,7	<0,2	<0,8	<1,1
Trombetas	0	0	0	>2,9	0	0
Lukuni	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	>4,1	NT
Tacaiuma	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	7,2

*: Expressos em índice logarítmico de neutralização
 NT: Não testado

amostras isoladas por FC não reagiram com soros imunes de 160 arbovírus previamente isolados pelo IEC na região Amazônica Brasileira, bem como com soros hiperimunes de grupos e polivalentes de arbovírus adquiridos no National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA). Mas reagiram entre si e com o tipo TBT (BE AN 306770), isolado a partir das vísceras de um ungulata da espécie *Tayassu pecari*, capturado em Porto Trombetas, Município de Oriximiná, Pará, em fevereiro de 1976 (Tabela 1). Seus antígenos extraídos por sucrose-acetona não produziram hemaglutinina. Por N (Tabela 2), utilizando camundongos recém-nascidos como sistema¹⁰ e realizado em duplo sentido com as novas amostras e outros membros do grupo ANA, os resultados mostraram que os três vírus constituem novos tipos. Submetidos a teste de sensibilidade pelo desoxicolato de sódio (DCA)¹¹, os resultados mostraram que os mesmos são sensíveis, embora um deles (TUC) tenha ficado no limiar do mínimo preconizado (Tabela 3).

Os tipos TUC, CPE e ART foram isolados sistematicamente nos anos subsequentes sendo que, até 1990, foram obtidos 12, 32 e 28 vezes, respectivamente, a partir de mosquitos *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* e *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari*, bem como de lotes mistos de *An. (Nys.) oswaldoi* e *An. (Nys.) nuneztovari* (Fig. 2).

Tabela 3. Resultados dos testes de resistência ao DCA, realizados em camundongos, com vírus do grupo Anopheles A.

Vírus	Titulação	
	DCA	Controle
Tucuruí	1,5	3,3
Caraipé	0,5	3,0
Arumateua	1,2	3,5

Discussão

Os vírus do grupo ANA têm sido isolados somente nas Américas do Sul (Argentina, Brasil e Colômbia) e Central (Trinidad e Panamá)^{3,4,5,8}.

O isolamento de três novos tipos dentro do grupo ANA, em um mesmo local e em um mesmo ano, em meses diferentes, é relevante, pois esses vírus desde então têm-se mantido altamente prevalentes, revelando um caráter enzootico na região da UHE-TUC. Esses três arbovírus parecem ter distribuição focal, tendo sido encontrados somente em Tucuruí, à exceção do vírus TUC que foi uma única vez isolado em Balbina, onde também existe lago formado pela barragem do rio Uatumã, no norte do Estado do Amazonas, em decorrência da construção de usina hidrelétrica.

Todos os isolamentos têm sido obtidos uni-

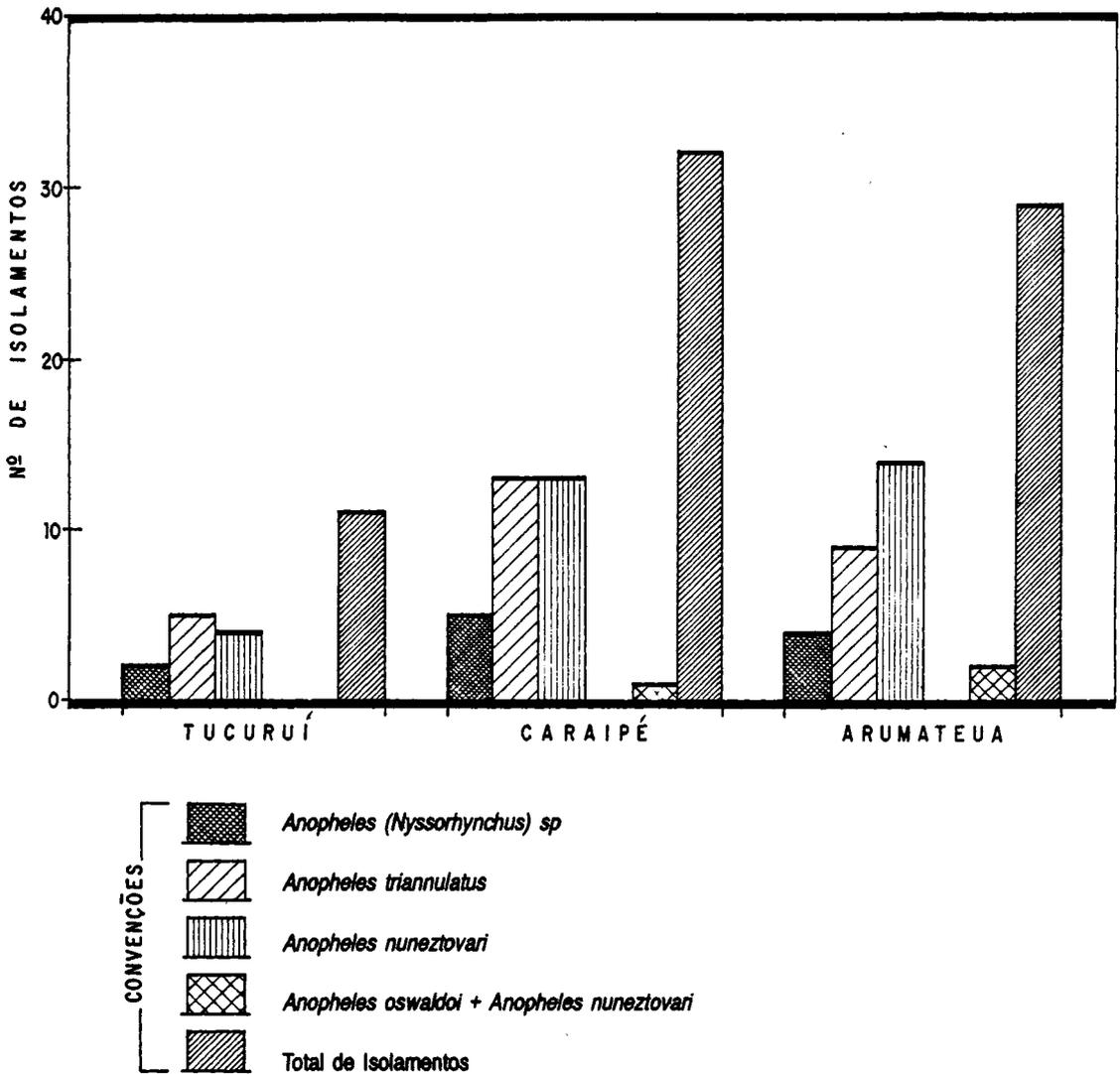


Figura 2. Distribuição dos isolamentos dos vírus Tucuruí, Caraiapé, Arumateua de acordo com a espécie de mosquito do grupo *Anopheles (Nyssorhynchus)*.

camente de mosquitos do grupo *Anopheles (Nyssorhynchus)*, principalmente das espécies *An. (Nys.) triannulatus* e *An. (Nys.) nuneztovari* (Fig. 2). Tais artrópodes, que já eram prevalentes antes da formação do lago na UHE-TUC, proliferaram significativamente após o fechamento das comportas em 1 de setembro de 1984. Esses anophelinos são amplamente distribuídos e tidos como vetores secundários da malária na Região Amazônica¹. Por outro lado, a despeito de até o momento nenhum caso de doença humana atribuído aos vírus TUC, CPE e ART ter sido registrado, esses vírus podem se tornar importantes patógenos humanos, se considerarmos a elevada densidade populacional de

mosquitos do grupo *Anopheles (Nyssorhynchus)*, seus transmissores, em áreas próximas ao reservatório de Tucuruí.

Testes de N realizados em camundongos com soros humanos e de diversas espécies de animais procedentes da região da UHE-TUC - desafiando esses novos arbovírus -, foram negativos, exceto para o soro de um carnívoro *Nasua nasua* que neutralizou a amostra TUC, em título de 2.6 ILN. Os resultados obtidos por N e a ausência de isolamentos a partir de animais silvestres da área estudada impossibilitou até o presente conhecer a ecoepidemiologia desses agentes virais, bem como seus ciclos de manutenção.

Esses três tipos, TUC, CPE e ART, formam

juntamente com o vírus TBT um complexo dentro do grupo ANA, o qual propõe-se chamar de complexo Trombetas, devido o vírus TBT ter sido o primeiro tipo isolado. A formação de complexos dentro desse grupo antigênico parece ser uma característica marcante, haja vista que outros tipos, quais sejam, Tacaiuma e Anopheles A, formam com outros vírus a eles relacionados os complexos Tacaiuma e Anopheles A, respectivamente^{3,4}. Nesse complexo Trombetas, o tipo mais afastado é o ART, que por FC (Tabela 1) reage fracamente com soros imunes do TBT e CPE e não reage com o TUC. Os outros três vírus TBT, CPE e TUC, ainda por FC, não reagem com o soro do ART, mas reagem fortemente entre si nos dois sentidos, porém são completamente distintos por N (Tabela 2).

Estudos posteriores são necessários para tentar elucidar o ciclo biológico de manutenção desses agentes, principalmente no que diz respeito aos seus hospedeiros silvestres e sua possibilidade de causar doença no homem e em animais de importância em saúde veterinária. Devemos ter em conta que o Município de Tucuruí possui aproximadamente 100.000 habitantes, cuja população tem, nas atividades agropecuárias, as principais fontes de trabalho e arrecadação. Assim, medidas de controle e combate aos vetores, também responsáveis pela transmissão da malária na região, fazem-se necessárias com o intuito de impedir a disseminação daqueles mosquitos e dos vírus na região.

Agradecimentos

À ELETRONORTE, pelo apoio logístico e financeiro; à SUDAM pelo auxílio financeiro; e aos funcionários da Seção de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas, especialmente os do Laboratório de Entomologia.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. et al.
[Characterization and antigenic relationship of three new *Bunyavirus* in the *Anopheles A* serogroup (*Bunyaviridae*) of arboviruses]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 26: 173-8, 1992. The isolation and characterization of three new viruses obtained from the Tucuruí hydroelectric dam region is reported. These three agents belong to the *Anopheles A* serogroup, genus *Bunyavirus*, *Bunyaviridae*. The Tucuruí (TUC), Caraipé (CPE) and Arumateua (ART) viruses have close relationships with each other and with Trombetas (TBT) virus, an *Anopheles A* virus previously isolated in the Amazon Region of Brazil. These viruses form the "Trombetas complex". TUC, CPE and ART viruses were obtained from pools of *Anopheles (Nyssorhynchus)* sp captured in Tucuruí, Pará State,

in February, August and October of 1984, respectively. Until 1990 TUC, CPE and ART were isolated 12, 32 and 28 times respectively, in the Tucuruí hydroelectric dam region. At the moment, these viruses have only been obtained from mosquitoes of the *Anopheles (Nyssorhynchus)* complex, especially from *An. (Nys.) nuneztovari* and *An. (Nys.) triannulatus*, that are considered to be secondary vectors of *Plasmodium* in Amazonia. Serological tests performed with human and wild animal sera were negative, except for one specimen *Nasua nasua* that had neutralization antibodies to TUC.

Keywords: *Bunyaviridae*, isolation. *Anopheles*, microbiology.

Referências Bibliográficas

- ARRUDA, M.; CARVALHO, M.B.; NUSSENZWEIR, R.S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A.W.; COCHRANE, A.H. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 35: 873-81, 1986.
- BISHOP, D.H.L.; CALISHER, C.H.; CASALS, J.; CHUMAKOV, M.P.; GAIDAMOVICH, S.Ya.; HANNOUN, C.; LVOV, D.K.; MARSHAL, I.D.; OKERBLUM, N.; PATTERSON, R.F.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K.; SHOPE, R.E.; WESTAWAY, E.G. *Bunyaviridae*. *Intervirology*, 14: 125-43, 1980.
- CALISHER, C.H.; SASSO, D.R.; MANESS, K.S.C.; GHEORGHIV, V.N.; SHOPE, R.E. Relationships of *Anopheles A* group arbovirus. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 143: 465-8, 1973.
- CALISHER, C.H.; LAZUICK, J.S.; MUTH, D.J.; LOPES, O.S.; CRANE, G.T.; ELBEL, R.E.; SHOPE, R.E. Antigenic relationships among Tacaiuma complex viruses of the *Anopheles A* Serogroup (*Bunyaviridae*). *Bull. Pan. Amer. Hlth Org.*, 14: 386-91, 1980.
- CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; MITCHELL, C.J.; SABATTINI, M.S.; CROPP, C.B.; KERSCHNER, J.; HUNT, A.R.; LAZUICK, J.S. Arbovirus Investigations in Argentina, 1977-1980. III - Identification and characterization of viruses isolated, including new subtypes of Western and Venezuelan Equine Encephalitis viruses and four new *Bunyaviruses* (Las Maloyas, Resistencia, Barranqueras and Antequera). *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 956-65, 1985.
- DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; HERVÉ, J. P.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SÁ FILHO, G.C.; PINHEIRO, F.P. Modifications of arbovirus eco-epidemiology in Tucuruí, Para, Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam. In: Uren, M.F.; Blok, J.; Manderson, K.H., ed. *Arbovirus research in Australia; Proceedings 5th Symposium*. Brisbane, Australia, Queensland Institute of Medical Research, 1989. p. 124-35.
- FULTON F. & DUMBELL, K.R. The serological comparison of strains of Influenza virus. *J. gen. Microbiol.*, 3: 97-111, 1949.

8. KARABATSOS, N., ed. *International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*. 3rd ed. San Antonio, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
9. PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: aspectos clínico-epidemiológicos. In: *Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e a medicina tropical*. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública. 1986. v. 1, p. 375-408.
10. SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. Arboviruses. In: Lennette, E.H. & Schimdt, N.J., ed. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, DC, American Public Health Association, 1979. p. 767-814.
11. THEILER, M. Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **96**: 380-2, 1957.

Recebido para publicação em 8/10/1991

Reapresentado em 25/2/1992

Aprovado para publicação em 27/2/1992