

Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Jquitiba – Estado de São Paulo – Brasil

Isolation of flavivirus Iguape from mosquitoes *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in Jquitiba – São Paulo State – Brazil

Esther Luiza BOCATO-CHAMELET^{1*}
Terezinha Lisieux Moraes COIMBRA¹
Elza da Silva NASSAR¹
Luiz Eloy PEREIRA¹
Ivani Bisordi FERREIRA¹
Luiza Terezinha Madia de SOUZA¹
Akemi SUZUKI¹

RIALA6/893

Bocato-Chamelet, E.L. et al. Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Jquitiba – Estado de São Paulo – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):65-69,2001.

RESUMO. O flavivírus Iguape foi isolado pela primeira vez em 1979, a partir de camundongo sentinela, exposto em floresta no Município de Iguape, Estado de São Paulo, Brasil. Anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o vírus Iguape, foram detectados em animais domésticos e silvestres na Região do Vale do Ribeira, SP. Anticorpos monotípicos têm sido também detectados em soros humanos, embora não haja evidência de doença clínica. O estudo foi realizado em maio de 1994, no Município de Jquitiba, SP, em área de floresta. Mosquitos foram capturados com armadilhas luminosas. Após identificação sistemática, lotes de cerca de 30 mosquitos da mesma espécie foram processados para isolamento de vírus, empregando-se camundongos. A identificação foi realizada por testes de Hemaglutinação, Inibição de Hemaglutinação, Fixação de Complemento, Neutralização em camundongos e sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio. Uma cepa de vírus (SPAr-158482) foi obtida a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. O agente isolado apresentou significativa sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio. A sorologia por Inibição de Hemaglutinação, Fixação de Complemento e Neutralização em camundongos, indicou que a cepa isolada é idêntica ao vírus Iguape. Esses achados sugerem que o *An. cruzii* pode desempenhar algum papel no ciclo de transmissão do vírus Iguape, em ambientes naturais.

PALAVRAS-CHAVE. Arbovírus; *Flavivirus*; Iguape; *Anopheles (Kerteszia) cruzii*; Mata Atlântica.

INTRODUÇÃO

O flavivírus Iguape (IGP) foi isolado pela primeira vez a partir de camundongos sentinelas, expostos em área de Mata Atlântica, no Município de Iguape, Estado de São Paulo².

Empregando-se a técnica clássica de inclusão, a microscopia eletrônica revelou imagens de partículas virais com dimensões aproximadas de 41nm, em tecido de cérebro de camundongo infectado. Nos testes de Fixação de Complemento (FC), Inibição de Hemaglutinação (IH) e Neutralização (N),

¹ Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil.

* Endereço para correspondência: Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 35 – 01246-902 – São Paulo, SP – Brasil – telefone: 11 3068.2901 – fax: 11 3088.3753

técnicas clássicas aplicáveis aos arbovírus, o vírus IGP apresenta reações sorológicas cruzadas com outros membros do gênero *Flavivirus* – Ilhéus (ILH), Encefalite São Luís (SLE), Rocio (ROC), Febre Amarela (YF), Dengue (DEN).

Figueiredo et al.⁴ estudaram o vírus IGP empregando técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para identificação do agente; entretanto, esses autores sugerem a necessidade de estudos adicionais de seqüenciamento do genoma para uma identificação precisa desse vírus.

Soros humanos e de animais, submetidos a testes de IH apresentaram anticorpos monotípicos para o vírus IGP, evidenciando a circulação do agente em pássaros, roedores silvestres, marsupiais, morcegos, aves domésticas e humanos².

As aves migratórias desempenham importante papel na epidemiologia, pois atuam na dispersão do vírus para outras regiões. Ferreira et al.³ relatam a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o IGP, em plasmas de 50 aves silvestres, capturadas em área de Mata Atlântica, na Região do Vale do Ribeira. Esses autores relatam ainda que, classificadas segundo os hábitos de residência, 2 aves apresentavam hábitos migratórios, 24 eram espécies residentes, outras 20 eram de hábitos residente-migratório e 4 cujas características de dispersão não foram ainda determinadas.

O estudo da patogenia do IGP, a partir de infecções naturais, não foi descrito até o momento em virtude de não ter sido encontrado na espécie humana e/ou animal quadro clínico de doença determinado por esse agente. Embora falem evidências de doença clínica, não se pode descartar a possibilidade de que infecções humanas tenham ocorrido de forma

assintomática, leve ou branda. Todavia, esse fato pode ser comprovado em laboratório, pela presença de anticorpos para o vírus IGP, em soros humanos.

A quase totalidade dos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* utiliza-se de bromeliáceas como criadouros⁵. Estudos realizados em ecossistema de Mata Atlântica demonstram a alta frequência de *An. cruzii* em ambientes com cobertura florestal primitiva^{6,10}, onde são encontradas grande diversidade de bromeliáceas.

Embora tenham hábitos predominantemente silvestres, são encontrados com frequência em áreas peri-domiciliares, principalmente quando o domicílio situa-se dentro ou próximo de área de floresta; buscam repasto sanguíneo nessas áreas, mas logo procuram abrigo nos ambientes naturais^{8,7}. Esse comportamento proporciona a essa espécie a possibilidade de servir como vetora de agentes de ocorrência silvestre para ambientes frequentados pelo homem.

Este trabalho relata o isolamento do vírus IGP a partir de mosquitos *An. cruzii*, naturalmente infectados, capturados no Município de Jujutiba, SP, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de estudo

Os trabalhos de campo foram realizados em área florestal da Serra do Mar, a 20km a sudoeste da cidade de Jujutiba (24° 03'S 47° 00'W) e cerca de 70km do Município de São Paulo, na região Sul do Estado (Figura 1). A área estudada faz parte do ecossistema da Mata Atlântica e está inserida nos 9%

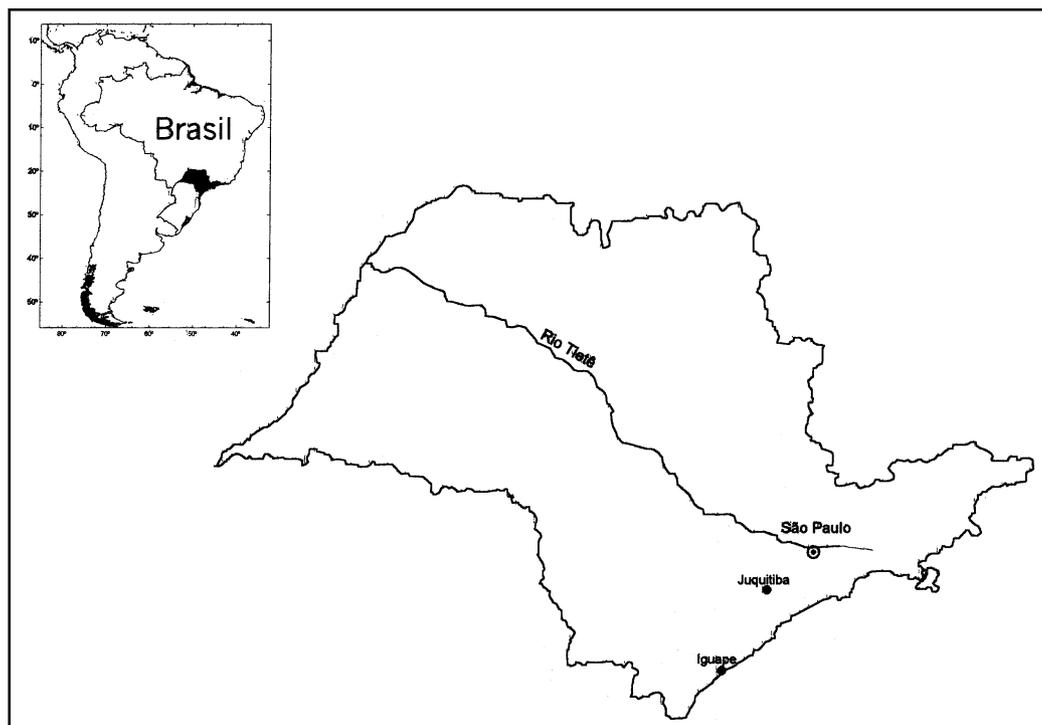


Figura 1. Localização dos Municípios de Jujutiba e Iguape, onde a presença do vírus Iguape foi detectada

remanescentes, preservados da mata original, que se estendia desde o Norte até o Sul do Brasil, ao longo da Costa Atlântica. Trata-se, tipicamente, de floresta densa umbrófila, com altos índices pluviométricos e temperatura média de 18°C. Os vários rios, riachos e lagoas presentes na área justificam o nome Juititaba, que significa “terra de muitas águas”.

2. Captura de mosquitos

Os mosquitos foram capturados em área florestada do Município de Juititaba, no mês de maio de 1994. Armadilhas luminosas do tipo CDC-miniatura, tendo como isca CO₂ de gelo seco, foram colocadas a 1,5m da superfície do solo, durante um pernoite. Os mosquitos foram transportados em nitrogênio líquido até o laboratório, onde foram mantidos em congelador a -70°C. A identificação taxonômica foi realizada sobre mesa fria, constituindo-se lotes de 30 espécimes de mesma espécie. Os espécimes ingurgitados foram descartados do experimento.

3. Isolamento de vírus e identificação

Os lotes de mosquitos foram triturados e suspensos em solução de albumina bovina a 1,8% e submetidos a 10.000 rpm em centrífuga refrigerada, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram inoculados em camundongos *swiss* albinos recém-nascidos, 0,02ml por via intracerebral, em famílias constituídas por mãe e 6 filhotes. Realizou-se observação diária desses camundongos, por período de 14 dias, para detecção de sinais característicos de infecções por arbovírus. Foram processadas passagens seriadas de cérebro dos camundongos com sinais clínicos característicos de infecção, até a obtenção do isolamento de cepas virais.

Na identificação dos isolados foram empregados testes clássicos para os arbovírus, ou seja: Hemaglutinação (HA)¹, Inibição da Hemaglutinação (IH)¹, Fixação de Complemento (FC)⁹, Neutralização em camundongos (N)¹¹ e teste de sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio (DCA)¹².

As técnicas de preparo de antígenos e soros imunes empregados nos procedimentos de identificação da cepa viral foram descritas por Clarke e Casals¹ e Tikasingh et al.¹³, respectivamente.

Nos testes sorológicos (IH, FC e N) foram utilizados antígenos de vírus do gênero *Flavivirus*, num total de 8 protótipos distintos: Febre Amarela (YF - SPH 144990), Ilhéus (ILH - BeAn 7445), Encefalite São Luís (SLE - SPAn 11916), Iguape (IGP - SPAn 71686), Rocio (ROC - SPH 34675), Dengue 1 (DEN1 - Hawaii), Dengue 2 (DEN2 - Tr 1051) e Dengue 4 (DEN4 - BeH 402276). A sigla SP indica que a cepa foi isolada originalmente no Estado de São Paulo; as outras cepas foram isoladas e/ou cedidas pelo Instituto Evandro Chagas e pelo Centers for Disease Control and Prevention - CDC, EUA.

RESULTADOS

Mosquitos *An. cruzi* foram os mais abundantes nessa coleta (Tabela 1). Em seguida, compareceram mosquitos *Anopheles* sp. Pode-se afirmar que a quase totalidade desses

Tabela 1. Frequência de mosquitos capturados com armadilhas luminosas tipo CDC-miniatura, iscadas com CO₂. Juititaba-SP, maio de 1994

Espécie	Número de mosquitos	%
<i>Anopheles cruzi</i>	1.295	67,65
<i>Anopheles</i> sp	591	30,87
<i>Culex (Culex) spp.</i>	7	0,37
<i>Cx. (Melanoconion) sp.</i>	6	0,31
<i>Aedes scapularis</i>	4	0,21
<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	3	0,16
<i>Phoniomyia davisii</i>	3	0,16
<i>Rhunchomyia sp.</i>	3	0,16
<i>Limatus</i>	1	0,05
<i>Wyeomyia confusa</i>	1	0,05
Total	1.914	99,99

espécimes eram *An. cruzi*, os quais foram assim identificados devido ao fato de estarem danificados. Outros gêneros também foram identificados na captura, embora com frequência nitidamente menor, inclusive mosquitos de hábito essencialmente diurno, como *Limatus*, *Phoniomyia*, *Wyeomyia* e *Rhunchomyia*.

De acordo com os testes sorológicos de IH, FC e N, observados no Quadro 1, o vírus SPAr-158482 é antigenicamente relacionado com o vírus IGP, ou seja, apresenta forte reação cruzada com o vírus IGP.

Empregando-se suspensão contendo vírus, testes preliminares revelaram um título de 10^{8,63} DL₅₀ (dose letal para 50% de camundongos lactentes inoculados) na suspensão-controlada não tratada. Após o tratamento da suspensão com Desoxicolato de Sódio, o título sofreu sensível redução para 10^{6,3} DL₅₀, sugerindo assim, tratar-se de um vírus envelopado. A prova de sensibilidade ao desoxicolato de sódio, que é um detergente de ação deslipinizante, é uma prova complementar utilizada na caracterização de arbovírus em geral.

DISCUSSÃO

Na identificação da cepa isolada, os ensaios sorológicos apresentaram reações cruzadas, com títulos variados, com protótipos do grupo *Flavivirus*. Esses dados definem o gênero ao qual pertence o agente. Com base na resposta exuberante, observada quando cruzada com o protótipo IGP-SPAn71686, definiu-se a sua identidade.

A ocorrência de isolamento do vírus IGP, em condições naturais, demonstra a continuidade, espacial e temporal, de sua circulação em áreas de floresta pertencentes ao mesmo ecossistema. Ressalta-se que entre o primeiro e o presente relato de isolamento são transcorridos cerca de 20 anos, período de quiescência comum para muitos arbovírus, os quais, sob condições favoráveis, voltam a circular.

Vale ressaltar que não foram observadas até o momento, infecções clínicas em animais e/ou humanos que pudessem incri-

Quadro 1. Resultados dos testes de HI, FC e N utilizados na identificação da cepa SPAr-158482, isolada a partir de *An. (Ker.) cruzii*

Antígenos	Inibição de Hemaglutinação								Fixação de Complemento								Neutralização				
	SPAr158482	IGP	SLE	ROC	ILH	YF	DEN1	DEN2	DEN4	SPAr158482	IGP	SLE	ROC	ILH	YF	DEN1	DEN2	DEN4	SPAr158482	IGP	ILH
SPAr158482	160	160	20	20	20	40	20	20	20	512	256	32	64	64	64	nr	32	64	5.1	5.0	1.1
IGP (SPAn71686)	160	160								256	256								5.0	5.0	0.0
SLE (SPAn11916)	80	640								32	256								3.3	1.8	0.7
ROC (SPH34675)	80	640								64	128								3.0	nr	0.9
ILH (BeAn7445)	80	320								8	64								2.9	1.6	4.8
YF (SPH144990)	4	640								16	256								1.9	nr	nr
DEN1 (Hawaii)	0	320								nr	nr								nr	nr	0.7
DEN2 (Tr1751)	40	160								0	64								nr	nr	0.6
DEN4 (BeH402275)	40	40								0	32								nr	nr	0.8

* recíproca do melhor título do soro/melhor diluição do antígeno.
 nr - não realizado; IH- <20 = negativo; FC- <8 = negativo; N- <1,0 = negativo
 IGP - Iguape; SLE - Encefalite São Luís; ROC - Rocio; ILH - Ilhéus; YF - Febre Amarela; DEN - Dengue

minar o vírus IGP como agente patogênico. Entretanto, anticorpos monotípicos e heterotípicos são observados em inquéritos sorológicos e em investigações de rotina, evidenciando assim, a ocorrência de infecções brandas ou assintomáticas.

O registro, pela primeira vez, de isolamento a partir de mosquitos capturados naturalmente infectados, acresce ao estudo da cadeia epidemiológica, a possível indicação da participação desse vetor, altamente antropofílico, na disseminação desse vírus. Entretanto, a detecção do agente em mosquitos *An. cruzii* não comprova seu papel como transmissor nem o peso dessa atuação na manutenção da cadeia de transmissão desse vírus nos ambientes naturais; são ainda necessárias observações adicionais, relativas à capacidade e competência vetora desse mosquito em relação ao vírus IGP para confirmação dessa tese.

Entretanto, o fato de ter sido recuperado em condições naturais indica que o vírus está intrinsecamente ligado a esse ecossistema.

AGRADECIMENTOS

À Pesquisadora Evelyn Oliver Sarmento, pela atenção e profissionalismo no fornecimento de animais de laboratório utilizados no experimento. À Técnica de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica Antonia Torres Marti, pela realização dos testes de Inibição de Hemaglutinação e à equipe de Apoio à Pesquisa da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz.

RIALA6/893

Bocato-Chamelet, E.L. et al. Isolation of flavivirus Iguape from mosquitoes *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in Juquitiba - São Paulo State - Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(1):65-69,2001.

ABSTRACT. The flavivirus Iguape was isolated for the first time in 1979, from a sentinel mouse exposed in a forested area in Iguape County - SP, Brazil. Monotypic hemagglutination inhibition antibodies for Iguape virus were detected in domestic and sylvan animals, in Ribeira Valley region, São Paulo State. Monotypic antibodies have also been detected in human sera, although there is no evidence of clinical disease. The authors report the isolation of a new strain of Iguape virus from naturally infected mosquitoes. The study was conducted in May, 1994 in Juquitiba County – São Paulo State, in a forested area. Mosquitoes were captured by light traps After systematics identification, pools of mosquitoes were processed for virus isolation in suckling mice. An isolate (SPAr-158482) was obtained from *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Tests of Hemagglutination, Hemagglutination Inhibition, Complement Fixation, Neutralization in suckling mice and sensitivity to Sodium Deoxycholate were employed for identification of the isolate.. According to tests of Complement Fixation, Hemagglutination Inhibition and Neutralization in mice, the virus was identified as the same as Iguape virus. This finding suggests that this species of mosquito may play a role in the transmission cycle of Iguape virus in natural environment.

KEY WORDS. Arbovirus; *Flavivirus*; Iguape; *Anopheles (Kerteszia) cruzii*; Atlantic Rain Forest.

REFERÊNCIAS

1. Clarke, D.H.; Casals, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 7: 561-573, 1958.
2. Coimbra, L.T.M. et al. Iguape: a newly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil. **Intervirolgy**, 36: 144-152, 1993.
3. Ferreira, I.B. et al. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Rev. Inst. Med. trop.**, 36: 265-274, 1994.
4. Figueiredo, L.T.M. et al. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 59: 357-362, 1998.
5. Forattini, O.P. **Entomologia Médica**. 1ª ed. São Paulo – SP: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962.
6. Forattini, O.P. et al. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 20: 178-203, 1986.
7. Forattini, O.P. et al. Freqüência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos culicidae em área adjacente à Mata Atlântica primitiva da planície. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 24: 101-107, 1990.
8. Forattini, O.P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1- Parity of blood seeking *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 27: 1-8, 1993.
9. Fulton, F.; Dumbell, K.R. The serological comparison of strains of influenza virus. **J. Gen. Microbiol.**, 3: 97-111, 1949.
10. Seto, M.I. **Ocorrência de mosquitos (Diptera-Culicidae) em bromélias da localidade de Aldeia dos Índios, área endêmica de malária, no Município de Peruibe (SP), no período de julho de 1985 a julho de 1987**. São Paulo, 1992. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
11. Shope, R.E.; Sather, G.E. Arboviruses In: Lennette, E.H.; Schmidt, N.J., eds. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**, 5th ed., Baltimore: American Public Health Association; 1979, p.767-814.
12. Theiler, M. Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 96: 380-382, 1957.
13. Tikasingh, E.S.; Spence, L.; Down, W.G. The use of adjuvant and sarcoma 180 cells in the production of mouse hyperimmune ascitic fluids for arboviruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 15: 219-226, 1967.

Recebido em 25/10/2000; Aprovado em 23/08/2001