

# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE FLEBOVÍRUS (Vírus Toscana)

FÁTIMA AMARO, M<sup>a</sup> GRAZIA CIUFOLINI, GIULIETTA VENTURI, CRISTIANO FIORENTINI,  
MARIA JOÃO ALVES

Centro de Estudos de Vectors e Doenças Infecciosas. Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge. Lisboa. Portugal.  
Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Disease. Istituto Superiore di Sanità. Rome. Italy

## RESUMO

Os *Phlebovirus* (família *Bunyaviridae*) são arbovírus que podem ser transmitidos ao Homem por mosquitos (vírus do Vale do Rift) ou por flebótomos. Nos *Phlebovirus* encontram-se os agentes etiológicos da Febre por Flebótomos (FF) que surge na bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Paquistão e Índia. Em Portugal, a importância dos flebovírus para a Saúde Pública é reconhecida uma vez que já foram detectados e confirmados laboratorialmente casos de infecção por vírus Toscana, responsável pelos casos mais graves de FF e que incluem encefalites/meningites. Por outro lado, *Phlebotomus perniciosus*, um dos vectores do vírus Toscana, é uma espécie amplamente distribuída Portugal.

## SUMMARY

### PHLEBOVIRUSES LABORATORIAL DIAGNOSIS (Toscana virus)

Viruses from the *Phlebovirus* genus (family *Bunyaviridae*) are arboviruses that can be transmitted to humans by mosquitoes (Rift Valley virus) or by sandflies. In phleboviruses group we can find the etiological agents for Sandfly Fever (SF) that is spread in the Mediterranean basin, Middle East, Pakistan and India. In Portugal, the importance of phleboviruses to the Public Health is recognized because there have been detected cases of Toscana virus infection which is responsible for severe cases of SF that involve encephalitis/meningitis. On the other hand, *Phlebotomus perniciosus*, one of Toscana virus vectors, is widespread in Portugal.

## INTRODUÇÃO

O género *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*, é constituído por mais de 60 vírus diferentes. Oito destes flebovírus (Alenquer, Candiru, Chagres, Punta Toro, Rift Valley, Nápoles, Sicília e Toscana) estão relacionados com patologias em humanos<sup>1</sup>.

Os vírus Nápoles e Sicília são transmitidos pela picada de flebotomos infectados e têm sido reconhecidos como agentes etiológicos de doença humana, a Febre por Flebotomos (FF), também conhecida por Febre Pappataci ou por *febre dos três dias*, em países do Mediterrâneo, Médio Oriente, Paquistão e Índia. Os maiores surtos da FF têm ocorrido quando grandes populações de indivíduos não imunes, como os militares, ocupam áreas endémicas. Surtos de doenças compatíveis com a descrição actual para a FF datam do tempo das guerras Napoleónicas tendo sido a sua associação aos vectores sugerida em 1905<sup>2</sup>.

Em 1910 foi notificada a FF em Malta e em Creta<sup>3</sup>, e em 1934 foram publicadas algumas notas de investigação laboratorial sobre a doença na fronteira indiana<sup>4</sup>. Finalmente, durante a Segunda Guerra Mundial, em Itália, os vírus Nápoles e Sicília foram isolados por Sabin a partir de amostras de sangue colhidas durante uma epidemia naquelas duas regiões<sup>5</sup>.

O serótipo Toscana deve o seu nome à região da Toscana, onde foi isolado pela primeira vez no Verão de 1971. O vírus foi isolado a partir de *Phlebotomus perniciosus*, no Monte Argentario, durante um estudo sobre os arbovírus em Itália. Mais tarde, entre 1980 e 1985, num estudo conduzido na mesma região com o fim de determinar os possíveis vectores e focos de vírus Toscana e a sua importância para a Saúde Pública, o vírus foi também isolado a partir de *Ph. perfiliewi*<sup>6</sup>.

O vírus Toscana é actualmente reconhecido como um dos mais importantes agentes etiológicos de meningites, meningoencefalites ou encefalites nos países endémicos, nomeadamente Itália (26,6 % dos pacientes com doença no Sistema Nervoso Central na região da Toscana apresentam anticorpos contra o vírus, outro estudo em Siena mostrou que 52 % dos casos de meningite asséptica em adultos estava relacionada com o vírus Toscana)<sup>7</sup>, Chipre (20 % da população saudável apresenta anticorpos)<sup>8</sup> e Espanha (num estudo retrospectivo, nove por cento dos pacientes com meningites assépticas de etiologia desconhecida tinham anticorpos contra o vírus Toscana)<sup>9</sup>. Em França os dados colhidos confirmam a circulação do vírus no Sudeste<sup>10</sup>. Na Alemanha, apesar de os estudos apontarem para uma baixa seroprevalência (entre 1 e 1,6 %), a infecção é considerada em pacientes que apresen-

tem sintomas de meningite e que regressem de países onde o vírus Toscana é endémico<sup>11</sup>. Na Grécia existe seroprevalência nas populações estudadas (60% nas ilhas e 35% no oeste continental) mas até à data não foram notificados casos de meningite ou encefalite causados por este vírus<sup>10</sup>.

### O Vírus Toscana

Como em todos os vírus da família *Bunyaviridae*, o genoma do vírus Toscana é constituído por uma cadeia simples de RNA dividida em três segmentos de tamanhos diferentes denominados L (*large*), M (*medium*) e S (*small*). Nos flebovírus o segmento L codifica a polimerase viral. O segmento M codifica as glicoproteínas do envelope, G1 e G2, e possivelmente uma ou duas proteínas não estruturais. Finalmente, o segmento S codifica a proteína N da nucleocápside e a NSs, uma proteína não estrutural<sup>12-14</sup>.

A nucleoproteína N é o principal antigénio reconhecido na resposta do sistema imunitário humano a uma infecção pelo vírus Toscana<sup>15</sup>.

### Vector

Os flebotomos são insectos que pertencem à família *Psychodidae*. As espécies do Novo Mundo estão agrupadas nos géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warrileya*, e as Velho Mundo nos géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*<sup>16</sup>.

O facto de serem hematófagos faz com que estes insectos desempenhem um papel vectorial na transmissão de vários agentes patogénicos para o Homem, entre eles, os flebovírus.

Os vírus Sicília e Nápoles, estão associados à espécie *Phlebotomus papatasi*<sup>17</sup>. Actualmente existem dados que indicam uma alta prevalência dos vírus Nápoles e Sicília e que os confirmam como uma causa de doença febril em muitos países com condições sanitárias deficientes, em determinados ambientes e condições climáticas propícias à proliferação dos seus vectores<sup>18</sup>.

Recentemente, foi sugerido, que nos países que realizaram desinfestações contra o mosquito vector de malária nos anos 40, houve uma redução dramática nas populações deste insecto e as infecções pelos vírus por este transmitidas diminuíram ou desapareceram<sup>5</sup>. No entanto é difícil, no presente, afirmar se estes resultados são devido à eficiência dos insecticidas ou devido a um aumento da exposição a estes vírus com a idade. Esta hipótese foi levantada porque a seroprevalência era mais baixa nas populações que nasceram nos anos após as desinfestações<sup>18</sup>.

Como referido anteriormente, o vírus Toscana é transmitido por *Ph. perniciosus* e por *Ph. perfiliewi*. Em Portugal está confirmada a existência de cinco espécies de

flebótomos, nomeadamente: *Ph. papatasi*, *Ph. ariasi*, *Ph. sergenti*, *Ph. perniciosus* e *Sergentomyia minuta* e o seu pico de actividade no nosso país é de Maio a Outubro. *Ph. perniciosus*, um dos vectores do vírus Toscana, é uma espécie amplamente distribuída em Portugal<sup>19</sup>.

### Reservatório

A forma como os flebovírus se mantêm na natureza ainda não está totalmente esclarecida nomeadamente, se existe, para além da transmissão transovárica e venérea nos vectores, um ciclo vertebrado-insecto e, neste caso, qual ou quais o/os vertebrado/os reservatório/os<sup>20</sup>. O vírus Toscana foi isolado do cérebro de um morcego da espécie *Pipistrellus kuhlii*, indicando um possível envolvimento desta espécie na ecologia deste vírus<sup>6</sup>. Já foram também detectados ratos (*Neotoma micropus*) no Texas<sup>21</sup> e gerbilhos (*Rhombomys opimus*) no Irão seropositivos para vários flebovírus e constatou-se que os flebótomos, para além de picarem alguns mamíferos, podem ser ornitofílicos<sup>6,22</sup>, o que torna os roedores e as aves hospedeiros reservatórios suspeitos na transmissão deste grupo de vírus.

### Clínica

Clinicamente, a FF causada pelos vírus Sicília e Nápoles é caracterizada por um período de incubação que vai de três a seis dias seguidos de febres altas (39-40°C) que duram entre seis e 74 horas. Os sintomas mais comuns incluem cefaleias, anorexia, mialgias, fotofobia e dores retro-orbitais. Marcada leucopénia caracterizada por linfopénia seguida por neutropénia também podem estar presentes. Os doentes recuperam no decurso de uma a duas semanas<sup>5,18</sup>.

A infecção pelo vírus Toscana apresenta um maior neurotropismo podendo estar associada a doença neurológica aguda<sup>23</sup>. Aos sintomas típicos da FF somam-se vômitos, dores oculares e rigidez na nuca associada a meningite asséptica, confusão mental e letargia seguidos de um período médio a longo de convalescença. O decurso clínico é geralmente benigno, com envolvimento encefálico pouco frequente mas resultando, por vezes, em casos de meningo-encefalites ou encefalites, algumas vezes sem meningites<sup>5,18</sup>. Normalmente a doença evolui sem sequelas neurológicas<sup>24</sup> mas as infecções no sistema nervoso podem ser graves em alguns pacientes que necessitam assim de cuidados intensivos e que têm longos períodos de inactividade. Foram descritos dois casos, relacionados, de meningo-encefalite severa com sequelas neurológicas e envolvimento sistémico (hepático, renal, linfoglandular e testicular)<sup>24</sup>.

Apesar de por vezes a infecção por vírus Toscana não necessitar de hospitalização, o que poderá conduzir a uma subestimativa das taxas de infecção, este vírus pode não só causar doença nos residentes dos países endémicos mas também em turistas que os visitam durante o Verão<sup>25</sup>.

Em 1983 o vírus Toscana foi isolado, na Suécia, a partir do fluido cefalo-raquidiano de um turista que, com a família, visitou o Algarve (Albufeira) nas últimas duas semanas de Agosto. Segundo Ehrnst et al<sup>26</sup>, o doente teve cefaleias severas e febre tendo sido internado quatro dias depois com possível diagnóstico de encefalite. Apresentava fotofobia mas não rigidez na nuca. A temperatura era de 38,4°C. Os glóbulos brancos periféricos apresentavam valores normais. A velocidade de sedimentação dos leucócitos era de 35 mm/h. O líquido cefalo-raquidiano mostrou sinais de meningite asséptica com 134 células predominantemente mononucleares. O doente recuperou espontaneamente, sem complicações. A partir do líquido cefalo-raquidiano foi isolado um vírus em células de rim de macaco verde africano (GMK-AH1). Por IFA foi confirmada a presença de flebovírus tendo este sido identificado como uma estirpe de vírus Toscana por testes de placas de neutralização. Outro caso descrito foi o de um cidadão alemão que adoeceu no seu país de origem, após ter regressado de Coimbra, com febres que duraram cerca de quatro semanas, cefaleias severas e fotofobia<sup>11</sup>.

### Diagnóstico Laboratorial

A detecção de anticorpos específicos (diagnóstico indirecto) é realizada com técnicas serológicas, nomeadamente IFA e ELISA, que como reportado anteriormente, são mais sensíveis que a técnica de Inibição da Hemaglutinação<sup>27</sup>. A confirmação do agente específico é feita por testes de Neutralização em Placas (PRNT)<sup>28</sup>.

A detecção da presença do agente etiológico (diagnóstico directo) nos laboratórios de referência, é feita a partir do LCR nos primeiros dias de virémia por *nested-PCR* usando como alvo o gene *N*. O isolamento do vírus normalmente é feito por inoculação em culturas celulares de células Vero E6 apesar de este se replicar e provocar efeito citopático também em células BHK-21, CV1 e SW13.

Para a detecção de anticorpos IgG anti-Toscana por ELISA o antigénio é extraído de cérebros de murganhos recém-nascidos em sucrose-acetona tal como descrito por Clarke e Casals<sup>29</sup>, diluído 100 vezes, e capturado por anticorpos anti Toscana preparados em murganhos, purificados, e adsorvidos em placas de poliestireno. A amostra é diluída 50 vezes e a ligação aos anticorpos específicos é revelada com um conjugado de fosfatase alcalina IgG anti-humano. A leitura da densidade óptica é feita a um compri-

mento de onda de 405 nm. Como controlo todas as amostras são testadas à mesma diluição contra antígenos heterólogos, por exemplo outros arbovírus e vírus Bhanja, que não fazem reacção cruzada com o vírus Toscana.

Para a detecção de anticorpos IgM é usada uma técnica de ELISA de captura<sup>24</sup>. Usam-se placas de poliestireno revestidas com soro IgM – cadeias específicas  $\mu$  – anti-humano produzido em cabra (Cappel Laboratories, ICN, Costa Mesa, Califórnia) durante 12 horas a 4°C. Seguidamente as placas são incubadas com as amostras de soro (diluídas 50 vezes), antígeno de Toscana (diluído 100 vezes) e anticorpos purificados anti-Toscana produzidos em ratos e conjugado IgG de fosfatase alcalina anti-rato produzido em cabra. O antígeno heterólogo é maior que a média de 30 soros negativos mais dois desvios padrão. As amostras são consideradas positivas quando a diferença entre a densidade óptica entre o antígeno de Toscana e as amostras negativas (com antígeno heterólogo) é maior que a média do background mais dois desvios padrão. A presença de anticorpos anti IgM identifica uma infecção recente por vírus Toscana.

A detecção directa do vírus é feita por RT-PCR seguido de *nested PCR*, no RNA extraído das amostras de LCR, com o kit QIAmp Viral RNA Mini kit (Quiagen) segundo instruções do fabricante. Os pares de primers utilizados são o TosN123-TosN829 e o TosN234-TosN749<sup>30</sup>

O Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI) tem como uma das principais competências o estudo das doenças transmitidas por artrópodes vectores, onde se inclui o diagnóstico e a investigação sobre a prevalência e incidência de algumas etiologias, a avaliação de factores de risco e a epizootologia dos reservatórios e vectores.

O diagnóstico serológico humano deste vírus por IFA e ELISA está agora em fase de padronização no CEVDI. Até à presente data os pedidos de diagnóstico para vírus Toscana, onze nos últimos dois anos, provenientes sobretudo do Algarve, foram enviados pelo CEVDI para o laboratório de referência do *Istituto Superiore di Sanita* em Roma. Os principais sintomas dos pacientes referidos no pedido de diagnóstico são: síndrome febril, cefaleias intensas, fotofobia, artralgias e meningoencefalites. Não foi detectada a presença de antígeno viral nos LCR por RT-PCR. Nos soros não foram detectados anticorpos IgM por ELISA de captura, no entanto três soros revelaram a presença de anticorpos IgG.

Actualmente está a decorrer um projecto no CEVDI para identificação do vector e do reservatório de flebovírus no sul de Portugal. As capturas decorrem de Maio a Outu-

bro, com uma periodicidade mensal, durante três noites, e são feitas com armadilhas CDC com luz UV (Miniature Blacklight Traps da BioQuip) às quais se adiciona um recipiente com gelo seco para atrair os flebotomos. No laboratório os flebotomos machos de cada amostra são montados em lâmina definitiva para se proceder à identificação da espécie e as fêmeas são separadas em *pools* para a extracção de RNA viral total e posterior realização de *nested RT-PCR* para a detecção de ácidos nucleicos de flebovírus. Até agora os espécimes capturados pertencem à espécie *Phlebotomus perniciosus*.

O facto de existirem provas que o vírus Toscana já circulou em Portugal e a sua recente emergência na Europa, torna urgente o esclarecimento da importância dos flebovírus em termos de Saúde Pública no nosso País.

## BIBLIOGRAFIA

1. DONG-YING L, TESH RB, TRAVASSOS DA ROSA et al: Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. *J Gen Virol* 2003;84:465-473
2. NICHOL ST: Bunyaviruses. In Knipe DM, Howley PM eds. *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. vol 2. Lippincott Williams & Wilkins. 2001;49:1603-33
3. BLIRT C: Phlebotomus fever in Malta and Crete. *J R Army Med Corps* 1910;14:236-258
4. SHORTT HE, POOLE LT, STEPHENS ED: Sandfly fever in the Indian frontier. A preliminary note on some laboratory investigations. *Indian J Med Res* 1935;21:775-788
5. NICOLETTI L, CIUFOLINI MG, VERANI P: Sandfly fever viruses in Italy. *Arch Virol* 1996;11:41-7
6. VERANI P, CIUFOLINI MG, CACIOLLI S et al: Ecology of viruses isolated from sandflies in Italy and characterization of a new *Phlebovirus* (Arbia virus). *Am J of Trop Med Hyg* 1988;38:433-9
7. NICOLETTI L, VERANI P, CACIOLLI S et al: Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus* Toscana of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:429-434
8. EITREM R, STYLIANAU M, NIKLASSON B: High prevalence rates of antibody to three sandfly viruses (Sicilian, Naples and Toscana) among Cypriots. *Epidemiol Infect* 1991;107:685-691
9. ECHEVARRÍA JM, ORY F, GUIASOLA MARIA-EULALIA, TENORIO A, LOZANO A CÓRDOBA J, GOBERNADO M: Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 2003;26:79-84
10. CHARREL RN, GALLIAN P, NAVARRO-MARÍA JM et al: Emergence of Toscana Virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1657-1663
11. SWARZ TF, GILCH S, JAGER G: Travel-related Toscana virus Infection. (Letter.) *Lancet* 1995;342:803-4
12. ACCARDI L, GRÓ MC, DI BONITO P, GIORGI C: Toscana virus genomic L segment: molecular cloning, coding strategy and

- amino acid sequence in comparison with other negative strand RNA viruses. *Virus Res* 1993;27:119-131
13. DI BONITO PS, MOCHI S, GRÓ MC, FORTINI D, GIORGI C: Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. *J Gen Virol* 1997;78:77-81
  14. GRÓ MC, DI BONITO P, FORTINI D, MOCHI S, GIORGI C: Completion of molecular characterization of Toscana phlebovirus genome: nucleotide sequence, coding strategy of M genomic segment and its amino acid sequence comparison to other phleboviruses. *Virus Res* 1997;51: 81-91
  15. SWARZ TF, GILCH S, SCHAÄTZL HM: A recombinant Toscana virus nucleoprotein in a diagnostic immunoblot test system. *Res Virol* 1998;149:413-8
  16. FERRO C, MORALES A: Flébotomos de Colombia: Estudios realizados por el laboratorio de Entomología 1965-1997. In: Toro G, Hernández CA, Raad J eds. Instituto Nacional de Salud 1917-1997. Una historia, un compromiso. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Salud 1998:219-33
  17. TESH RB, PERALTA PH, SHOPE RE, CHANIOTIS BN, JOHNSON KM: Antigenic relationships among phlebotomus group arboviruses and their implications for the epidemiology of sand fly fever. *Am J Trop Med Hyg* 1975;24:135-144
  18. DIONISIO D, ESPERTI F, VIVARELLI A, VALASSINA M: Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(5):383-8
  19. PIRES C: Os flebotomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa 2000. Tese de Doutorado
  20. MAROLI M, CIUFOLINI MG, VERANI P: Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Med and Vet Entomol* 1993;7:283-6
  21. CALISHER CH, MCLEAN RG, SMITH GC et al: Rio Grande-a new Phlebotomus fever group virus from South Texas. *Am J Trop Med Hyg* 1977;5:996-1001
  22. JAVADIAN E, TESH S, NADIM A: Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. Host –feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* in an endemic area of the disease. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26:294-298
  23. CIUFOLINI MG, FIORENTINI C, DI BONITO P, MOCHI S, GIORGI C: Detection of Toscana virus-specific immunoglobulins G and M by a Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on recombinant viral Nucleoprotein. *J Clin Microb* 1999;37:2010-12
  24. BALDELLI F, CIUFOLINI MG, FRANCISCI D et al: Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clinic Infect Dis* 2004;38:515-520
  25. SOLDATESCHI D, MASO GMD, VALLASSINA M, SANTINI L, BIANCHI S, CUSI, MG: Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. *J Clin Microb* 1999;37:649-652
  26. EHRNST A, PETERS CJ, NIKLASSON B, SVEDMIR A, HOLMGREN B: Neurovirulent Toscana virus (a sand fly fever virus) in swedish man after visit to Portugal. *Lancet* 1985;1:1212-3
  27. CIUFOLINI MG, FIORENTINI C, DI BONITO P, MOCHI S, GIORGIO C: Detection of toscana virus-specific immunoglobulins G and M by na enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant viral nuceoprotein. *J Clin Microbiol* 1999;37:2010-12
  28. VALASSINA M, VALENTINI M, PUGLIESE A, VELENSIN PE, CUSI MG: Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Imun* 2003;10:483-484
  29. CLARK DH, CASALS J: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-573
  30. SÁNCHEZ-SECO MP, ECHEVARRIA JM, HERNÁNDEZ L, ESTÉVEZ D, NAVARRO-MARÍ JM, TENORIO A: Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-Nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Vir* 2003;71:140-149

