

Novos flebovírus isolados em Portugal: importância e desafios para o diagnóstico clínico

New phleboviruses isolated in Portugal: importance and challenges for clinical diagnosis

Fátima Amaro, Líbia Zé-Zé, Maria João Alves

fatima.amaro@insa.min-saude.pt

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal.

_Resumo

Os flebovírus (género *Phlebovirus*, família *Phenuiviridae*) são arbovírus transmitidos por flebótomos que na Eurásia e África se encontram agrupados em três serocomplexos - Naples, Salehabad e Sicilian - podendo ser responsáveis por síndromes febris ou doença do sistema nervoso central, como no caso de infeção pelo vírus Toscana (TOSV). Em Portugal o diagnóstico laboratorial de flebovírus é realizado no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) desde 2007. Dados obtidos em estudos retrospectivos demonstraram que os flebovírus são agentes patogénicos negligenciados no nosso país. Estudos entomológicos realizados no CEVDI resultaram no isolamento e na sequenciação completa de dois novos flebovírus: os vírus Arrabida e Alcube. Estes vírus pertencem a complexos diferentes, respetivamente Naples e Salehabad, e a sua patogenia está em estudo num projeto de investigação no CEVDI. O maior desafio perante uma suspeita clínica de infeção por flebovírus será atingir um grau significativo de perceção por parte da comunidade médica uma vez que o diagnóstico laboratorial confirmatório apenas muito raramente é solicitado ao laboratório de referência.

_Abstract

Phleboviruses (genus Phlebovirus, family Phenuiviridae) are arboviruses transmitted by sandflies, which, in the Old World, are grouped in three serocomplexes - Naples, Salehabad and Sicily. They are responsible for febrile syndromes or, in the case of Toscana virus (TOSV), for central nervous system disease. In Portugal, the laboratory diagnosis of phleboviruses is carried out at the Center for Vectors and Infectious Diseases Research Doutor Francisco Cambournac of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) since 2007. Entomological studies resulted in the isolation and whole genome sequencing of two new phleboviruses: Arrabida and Alcube viruses. These viruses belong to different serocomplexes, Naples and Salehabad, respectively and their pathogenesis is under study in a research project at CEVDI. The greatest challenge for the diagnosis of phleboviruses in our country will be to reach a significant degree of perception from the part of the medical community since a confirmatory laboratory diagnosis is not often requested to the reference laboratory.

_Introdução

Os flebovírus são arbovírus transmitidos por flebótomos que se encontram organizados, na Eurásia e África, em três espécies ou grupos antigénicos, nomeadamente os serocomplexos Naples, Salehabad e Sicilian (1). Os vírus Naples e Sicilian podem causar a chamada febre dos três dias ou de pappataci, com sintomatologia associada a dores retro-orbitais e mialgias ou um quadro clínico de infeção assintomática (2).

O vírus Toscana (TOSV, serocomplexo Naples) é reconhecido como uma das mais importantes causas de meningite asséptica que ocorre preferencialmente nos meses de verão e nos países mediterrânicos (3).

Os flebovírus possuem genoma trisegmentado de RNA (segmentos L [*Large*], M [*Medium*] e S [*Small*]). Estão reconhecidos vírus recombinantes dentro deste grupo, uma vez que em situação de co-infeção (no reservatório ou hospedeiro) os segmentos L e S costumam segregar em conjunto, podendo o segmento M ter uma origem distinta (4). Este fenómeno causa desafios ao diagnóstico molecular, uma vez que a maioria dos alvos usados localizam-se no segmento S, mais conservado geneticamente (5).

Clinicamente não existe um marcador que distinga o TOSV de outros arbovírus neurotrópicos. De igual forma não existem manifestações clínicas específicas da febre por flebótomos causadas pelos vírus Naples e Sicilian. O diagnóstico laboratorial baseado em métodos diretos ou indiretos é a única forma de identificar as infeções causadas por flebovírus. O diagnóstico laboratorial destes agentes patogénicos é realizado, desde 2007, no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA). Atualmente, o diagnóstico

é realizado por RT-PCR em tempo real para o TOSV, RT-PCR convencional para o género flebovírus e serologia para os vírus TOS, Sicilian, Cyprus (serocomplexo Sicilian) e Naples. Estudos retrospectivos demonstraram que o vírus TOSV e os flebovírus em geral são vírus cuja importância como agentes patogénicos requerem investigação clínica e laboratorial reforçada no nosso país (6-8).

_Objetivo

O trabalho de investigação no CEVDI tem resultado no estudo de casos de infeção por TOSV e na identificação de novos flebovírus. O objetivo deste trabalho foi dar a conhecer a existência de dois novos flebovírus em Portugal, alertando a comunidade científica para a sua importância clínica e desafios para a saúde pública

_Material e métodos

Em estudos entomológicos realizados pelo CEVDI/INSA em 2007 e 2008 no distrito de Setúbal procedeu-se à deteção de RNA viral de 3875 flebótomos organizados em 141 *pools*, à qual se seguiram tentativas de isolamento e sequenciação do genoma completo usando tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) como descrito anteriormente (9,10).

_Resultados

Detetou-se pela primeira vez em Portugal o flebovírus Massilia, serocomplexo Naples, e foram isolados dois novos flebovírus: vírus Arrabida e vírus Alcube (9,10).

Com base na análise filogenética das sequências do genoma completo dos três segmentos obtidos com sequenciação de nova geração, podemos concluir que o vírus Arrabida pertence ao serocomplexo Naples e está relacionado com os vírus Massilia (11), Granada (12) e Punique (13). A análise genética indica que o vírus Arrabida resultou de eventos de recombinação (9).

Através da análise filogenética do genoma completo do vírus Alcube (10) foi possível verificar que faz parte do serocomplexo Salehabad (14) e que forma uma linhagem monofilética com

este e ainda os vírus Arbia (15) e Adana (16), partilhando um ancestral comum (10). A análise dos três segmentos permitiu confirmar a ausência de inconsistências nos ramos sugerindo que não existem fenómenos de recombinação entre estes vírus.

_Discussão e conclusões

No serocomplexo Naples, até ao presente não existem provas que os vírus Massilia, Granada, Punique ou Arrabida sejam patogénicos para os seres humanos embora existam estudos de seroprevalência que demonstram que os vírus Granada e Punique podem ser infecciosos, em baixa prevalência, levando a casos assintomáticos (17,18).

No serocomplexo Salehabad não existem também provas de associação dos vírus Salehabad e Arbia a doença humana. Apesar de altas taxas de seroprevalência de vírus Adana, pertencente ao mesmo serocomplexo, terem sido encontradas em animais, como cabras, ovelhas e cães, na população humana foram identificadas taxas de seroprevalência baixas o que sugere que este não constituirá um problema de saúde pública (16). No entanto, já foi detetado RNA genómico de outro flebovírus, nomeadamente Adria, pertencente ao mesmo serocomplexo, numa criança com síndrome febril e convulsões, o que sugere a sua patogenia (19).

O acesso a tecnologias de sequenciação de nova geração, permitiu, nos últimos anos, a descrição de novos vírus. A somar aos flebovírus com capacidade patogénica reconhecida, identificaram-se agora novos flebovírus cuja capacidade de causar doença não pode ser excluída uma vez que não existem estudos suficientes sobre essa possibilidade. Como exemplos do passado temos os vírus TOS e Adria isolados inicialmente em flebótomos que aparentemente não eram patogénicos e cuja patogenia foi provada mais tarde.

Apesar do papel importante do TOSV em infeções do sistema nervoso central e da emergência de novos flebovírus, estes permanecem negligenciados e raramente são considerados pelos clínicos nos algoritmos de diagnóstico no nosso país.

A importância em termos de saúde pública dos vírus Arrabida e Alcube é, neste momento, objeto de um projeto de investi-

artigos breves_ n. 2

gação que decorre no CEVD/INSA e que irá contribuir para clarificar a importância e desafios do diagnóstico clínico e laboratorial dos flebovírus em Portugal.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto Flebovírus em Portugal: vetores, patogénese e co-infecções (PTDC/DTP-SAP/0859/2014). Agradece-se à Doutora Cristina Furtado a revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Alwassouf S, Christodoulou V, Bichaud L, et al. Seroprevalence of Sandfly-Borne Phleboviruses Belonging to Three Serocomplexes (Sandfly fever Naples, Sandfly fever Sicilian and Salehabad) in Dogs from Greece and Cyprus Using Neutralization Test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(10):e0005063. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081206/>
- (2) Sabin AB, Philip CB, Paul JR. Phlebotomus (pappataci or sandfly) fever: a disease of military importance; summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA.* 1944; 125(9): 603-6 and 693-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01330.x>
- (3) Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005 Nov;11(11):1657-63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367371/>
- (4) Briese T, Calisher CH, Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology.* 2013;446(1-2):207-16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.030>
- (5) Collao X, Palacios G, Sanbonmatsu-Gámez S, et al. Genetic diversity of Toscana virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):574-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671431/>
- (6) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Vírus Toscana na população portuguesa. Vigilância sero-epidemiológica e casos clínicos. *Acta Med Port* 2011; 24(S2): 503-8. <https://actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/1443/1031>
- (7) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Serological evidence of Toscana virus infection in Portuguese patients. *Epidemiol Infect.* 2012;140(6):1147-50. Epub 2011 Jul 29.
- (8) Amaro F, Líbia Zê-Zê, Luz MT, et al. Vírus Toscana: um vírus emergente transmitido por flebotomos negligenciado em Portugal. V Congresso Nacional de Virologia/IX Encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia, Porto, Portugal, 27-28 out. 2018 (R10). https://spv.pt/5CNVirologia/wp-content/uploads/2018/10/livroresumos_5CNV.pdf
- (9) Amaro F, Hanke D, Zê-Zê L, et al. Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. *Virus Res.* 2016;214:19-25.
- (10) Amaro F, Zê-Zê L, Alves MJ, et al. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. *Virol J.* 2015;12:174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619550/>
- (11) Charrel RN, Moureau G, Temmam S, et al. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9(5):519-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976643/>
- (12) Collao X, Palacios G, de Ory F, et al. Granada virus: a natural phlebovirus reassortant of the sandfly fever Naples serocomplex with low seroprevalence in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):760-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946739/>
- (13) Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 5):1275-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496376/>
- (14) Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, et al. Characterization of the Salehabad virus species complex of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae). *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 4):837-42. Epub 2012 Dec 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709685/>
- (15) Verani P, Ciufolini MG, Cacioli S, et al. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterized of a new Phlebovirus (Arabia virus). *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):433-9.
- (16) Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, et al. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J Virol.* 2015 Apr;89(8):4080-91. doi: 10.1128/JVI.03027-14. Epub 2015 Feb 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442372/>
- (17) Navarro-Marí JM, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ruiz M, et al. Clinic-epidemiologic study of human infection by Granada virus, a new phlebovirus within the sandfly fever Naples serocomplex. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(5):1003-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752739/>
- (18) Sakhria S, Bichaud L, Mensi M, et al. Co-circulation of Toscana virus and Punique virus in northern Tunisia: a microneutralisation-based seroprevalence study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9):e2429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772032/>
- (19) Anagnostou V, Pardalos G, Athanasiou-Metaxa M, et al. Novel phlebovirus in febrile child, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):940-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321796/>