

Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*)*

Ilheus arbovirus in wild birds (*Sporophila caerulescens* and *Molothrus bonariensis*)

Luiz Eloy Pereira, Akemi Suzuki, Terezinha Lisieux Moraes Coimbra, Renato Pereira de Souza e Esther Luiza Bocato Chamelet

Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Arbovírus, isolamento e purificação.[#]
Aves, virologia.[#] Infecção por arbovírus, transmissão.[#] Mamíferos, virologia. Reservas naturais. Vetores de doenças. Ecologia de vetores. Testes de inibição de hemaglutinação. Testes de fixação do complemento. Testes de neutralização. Zoonose. – Arbovírus Ilheus, isolamento. *Sporophila caerulescens*. *Molothrus bonariensis*.

Keywords

Arboviruses, isolation and purification.[#] Birds, virology.[#] Arbovirus infection, transmission.[#] Mammals, virology. Natural reservations. Disease vectors. Ecology, vectors. Hemagglutination inhibition tests. Complement fixation

Correspondência para/Correspondence to:

Luiz Eloy Pereira
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246-902 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: lupereira@ial.sp.gov.br

Resumo

Objetivo

Relatar o isolamento do vírus Ilheus no Estado de São Paulo e avaliar o seu impacto para a saúde pública.

Métodos

O isolamento de vírus foi realizado em camundongos albinos *Swiss*, a partir de sangue de aves silvestres, capturadas com redes de espera tipo *mist net*, armadas no nível do solo, no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo. A identificação das cepas isoladas foi feita pelos testes de inibição da hemaglutinação, fixação de complemento e neutralização em camundongos. Amostras de plasma de aves e de mamíferos silvestres foram submetidas à pesquisa sorológica para detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação.

Resultados

Foram isoladas duas cepas do vírus Ilheus em sangue de aves das espécies *Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis* e detectados anticorpos em aves das espécies *Columbina talpacoti*, *Geopelia cuneata*, *Molothrus bonariensis* e *Sicalis flaveola*, em sagüis das espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* e no quati *Nasua nasua*.

Conclusões

O isolamento do vírus Ilheus e a detecção de anticorpos específicos em aves residentes, migratórias e de cativeiro, em sagüis e quatis, comprovam a presença desse agente no Parque Ecológico do Tietê. O comportamento migratório de aves silvestres pode determinar a introdução do vírus em outras regiões. Considerando-se a patogenicidade para o homem e a confirmação da circulação desse agente viral em área urbana, freqüentada para atividade de lazer e de educação, o risco de ocorrência de infecção na população humana não pode ser descartado.

Abstract

Objective

To report the first Ilheus arboviruses isolated from wild birds and analyze its public health impact.

Methods

Wild birds and mammals were captured using mist nets and Tomahawk traps, respectively. Blood samples were drawn from these animals and inoculated

*Pesquisa financiada pela Fapesp (Processo n° 95/9087-1)
Edição subvencionada pela Fapesp (Processo n. 01/01661-3).
Recebido em 10/2/2000. Reapresentado em 30/11/2000. Aprovado em 14/12/2000.

tests. Neutralization tests. Zoonoses. – *Ilheus virus isolation, wild birds. Sporophila caerulescens. Molothrus bonariensis.*

intracerebrally in Swiss suckling mice found in the Parque Ecológico do Tietê, Brazil. The isolates were identified by serological tests, such as hemagglutination, hemagglutination inhibition, complement fixation and neutralization. Besides virus isolation, serum samples were also tested for the presence of hemagglutination inhibition antibodies.

Results

Two strains of Ilheus virus were isolated from the bird species Sporophila caerulescens and Molothrus bonariensis. Specific antibodies to Ilheus virus were detected in serum samples of some birds (Columbina talpacoti, Geopelia cuneata, Sicalis flaveola and Molothrus bonariensis), marmosets (Callithrix jacchus and Callithrix penicillata) and coati (Nasua nasua).

Conclusions

Virus isolation and detection of specific antibodies in serum samples of local, migratory and captive birds, captive marmosets and wild coati corroborate the circulation of Ilheus virus in the Parque Ecológico do Tietê. The migrating behavior of some species of wild birds, like Sporophila caerulescens, enables the virus spread to other regions. Taking into consideration its human pathogenicity and the presence of the virus in this area, local authorities should be aware of the risk of infecting the local community.

INTRODUÇÃO

O Parque Ecológico do Tietê, objeto do presente estudo, apresenta ampla complexidade ecológica, resultante de condições naturais e impostas pelo homem. Nesse ambiente, são constantemente admitidos e mantidos diversos grupos de vertebrados provenientes de diversas regiões do Brasil, que juntamente com a presença de culicídeos potencialmente vetores, podem ser considerados fatores de risco para introdução e manutenção de arbovírus, como o vírus Ilheus, em uma área dentro do ecossistema urbano da Grande São Paulo.

No Estado de São Paulo, anticorpos inibidores de hemaglutinação, monotípicos e heterotípicos, foram detectados em aves silvestres, capturadas na região do Vale do Ribeira (Ferreira et al,² 1994).

Desde sua criação em 1977, o Parque Ecológico do Tietê tem uma área destinada à recepção e à manutenção de animais silvestres, provenientes, em grande parte, de apreensões realizadas por órgãos governamentais de proteção à fauna brasileira. Dada a disponibilidade de alimento e abrigo, a área é utilizada também por aves migratórias, oriundas de diversas regiões do Brasil ou de outros países. Fatos como estes possibilitam a introdução de arbovírus no local, os quais, associados à alta densidade de mosquitos, observada em todas as estações do ano, podem propiciar a transmissão enzoótica de agentes patogênicos ao homem, como o vírus Ilheus.

Durante a realização de um programa de vigilância ecoepidemiológica de arbovírus, isolou-se o vírus Ilheus (ILH) de aves silvestres capturadas na área pre-

servada do parque. O presente trabalho relata o isolamento do vírus ILH a partir de aves silvestres e a detecção de anticorpos específicos em hospedeiros vertebrados, capturados no Parque Ecológico do Tietê, Estado de São Paulo, Brasil; e avalia os eventuais impactos para a saúde pública desses achados, considerando a proximidade do parque à área urbana e sua utilização como opção de lazer.

MÉTODOS

O Parque Ecológico do Tietê (23°29'S, 46°30'W) está situado na região da planície de inundação do rio Tietê, na divisa dos municípios de São Paulo e Guarulhos, SP. Está inserido numa zona urbanizada e é atravessado por uma importante rodovia. Possui 14 mil hectares de área, coberta, na sua maior parte, por reflorestamento de eucaliptos e dispersas manchas de matas nativas residuais. A existência de várias coleções aquáticas, representadas, principalmente, pelas lagoas, distribuídas pelo parque, favorece a intensa proliferação de diversas espécies de mosquitos, vetores suspeitos, potenciais ou comprovados de arbovírus.

A captura das aves silvestres foi realizada mensalmente, com auxílio de redes de espera tipo "mist-net", armadas no nível do solo, de julho de 1996 a julho de 1998. Cada ave foi retirada cuidadosamente das malhas da rede e acondicionada em sacos de tecido de algodão até o momento de ser processada. As aves foram identificadas até espécie e receberam uma anilha fornecida pelo Centro de Estudo de Migração de Aves (Cemave/Ibama). A seguir, punccionou-se, via jugular, 0,2 ml ou 0,3 ml de sangue, dependendo do porte de cada ave. Nesse procedimento, foram empregadas seringas estéreis, contendo 0,8 ml ou 1,2 ml de solu-

ção de albumina bovina a 0,75%, com anticoagulante, resultando na diluição final de 1:5. Após a punção, as aves foram libertadas para o meio-ambiente.

Foram, também, incluídos na pesquisa, mamíferos mantidos em cativeiro e outros capturados na área do parque, com armadilhas "Tomahawk". Coletou-se 0,5 ml de sangue por punção femoral ou cardíaca, em seringa estéril contendo 0,5 ml de solução de albumina bovina a 0,75% e anticoagulante.

Parte do sangue coletado, destinado às provas de isolamento de vírus, foi colocada em nitrogênio líquido e, no laboratório, foi transferida para congeladores a -70°C. A outra parte, destinada à pesquisa sorológica, foi centrifugada (2.000 rpm, 5') para obtenção do plasma, que foi mantido em congeladores a -20°C.

Isolamento de vírus

Camundongos albinos *Swiss* de dois dias de idade foram inoculados via intracerebral, com 0,02 ml de sangue de aves ou de mamíferos. Durante os 14 dias subsequentes foram observados, diariamente, quanto ao aparecimento de sinais e/ou sintomas característicos das infecções por arbovírus. Cérebros de camundongos supostamente infectados foram colhidos e homogeneizados; suspensões a 10% em solução de albumina bovina (0,75%, acrescida de 100 unidades de penicilina e 100 mg de estreptomicina), clarificadas por centrifugação refrigerada - 10.000 rpm - 15 minutos, foram inoculadas, sucessivamente, em outros camundongos lactentes, até a obtenção de amostras de vírus adaptados ao modelo biológico empregado. Suspensões obtidas após a terceira passagem de cérebros foram submetidas à filtração com membranas de ésteres mistos de celulose de 45 µm, para confirmação da existência, no material em estudo, de agente filtrável com dimensão inferior àquela dos poros do filtro, que é uma das características dos flavivírus. A confirmação do isolamento do vírus foi feita mediante novo isolamento do vírus, a partir da amostra original.

Identificação das cepas isoladas

O processo de identificação dos isolados constou de provas clássicas em arbovirologia, quais sejam: teste de sensibilidade ao desoxicolato de sódio, hemaglutinação (Clarke & Casals,¹ 1958), inibição de hemaglutinação - IH (Clarke & Casals,¹ 1958), fixação de complemento (FC) (Fulton & Dumbell,³ 1949) e neutralização (N) em camundongos (Shope & Sather,⁷ 1979).

Tendo-se a suspeita de serem arbovírus, os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade ao desoxicolato de sódio (detergente de ação deslipinizante), para confirmação da natureza lipoprotéica do envelope do vírus, que é característica nesse grupo. O teste de HA possibilitou evidenciar a presença da fração aglutinadora das cepas isoladas. Pelo teste de IH foi possível classificar os isolados com relação ao grupo a que pertencem. A bateria de protótipos empregada incluiu vírus dos grupos alphavírus (encefalite equina leste - EEE, mucambo - MUC, encefalite equina venezuelana - VEE e encefalite equina oeste - WEE), flavivírus (Rocio - ROC, Ilheus - ILH, encefalite São Luiz - SLE e Iguape - IGP) e bunyavirus (Caraparu - CAR). O teste de FC, que classificou o agente no grupo antigênico específico, incluiu apenas protótipos do grupo flavivírus, triados pelo teste de IH: ROC, ILH, SLE e IGP. A prova de N em camundongos definiu a identidade dos agentes isolados.

RESULTADOS

A partir de amostras de sangue de duas aves das espécies *Sporophila caerulea* (papa-capim) e *Molothrus bonariensis* (chupim), obteve-se o isolamento das cepas de vírus SPAN 165952 e SPAN 165948, respectivamente.

Os resultados obtidos nos testes de IH, FC e N mostram que os isolados são idênticos ao protótipo do vírus Ilheus (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado dos testes de inibição da hemaglutinação, fixação de complemento e neutralização, realizados com as cepas SPAN 165948 e SPAN 165952.

Antígenos Soros	Inibição da hemaglutinação			Fixação de complemento					Neutralização			
	SPAN 165948	SPAN 165952	ILH	SPAN 165948	SPAN 165952	ILH	ROC	SLE	IGP	SPAN 165948	SPAN 165952	ILH
SPAN 165948	160	320	320	128	128	64	64	16	0+	3,6	4,1	3,6
SPAN 165952	160	320	320	128	128	128	16			3,8	4,1	3,6
ILH (BeH 7445)	640	640	640	256	512	256				3,8	4,2	4,0
ROC (SPH 34657)	80	160	80	256	256		1.024			1,4	1,7	1,3
SLE (SPAN 11916)	160	320	160	64	128			512		1,0	0,8	0,6
IGP (SPAN 71686)	0	0	80	0	0				256	0,0	0,1	0,1
CPC (BeAN 3276000)	40	20	160	NR	NR	NR				1,0	0,0	NR
YF (SPH 144990)	NR	NR								1,0	0,0	1,4

(NR) - Não realizado

ILH - Ilheus, ROC - Rocio, SLE - Encefalite de São Luiz, IGP - Iguape, CPC - Cacipacore, YF - Febre Amarela.

Tabela 2 - Anticorpos inibidores da hemaglutinação detectados nos animais capturados no Parque Ecológico do Tietê.

Espécie	Monotípicos	Heterotípicos	Indivíduos estudados
Aves			
<i>Columbina talpacoti</i>	1 (0,28%)	-	357
<i>Geopelia cuneata</i>	1 (4,76%)	3 (14,28%)	21
<i>Molothrus bonariensis</i>	-	1 (0,68%)	146
<i>Sicalis flaveola</i>	1 (11,11%)	-	9
Outras espécies	-	-	116
Mamíferos			
<i>Nasua nasua</i>	1 (3,70%)	-	27
<i>Callithrix jacchus</i>	1 (16,66%)	-	6
<i>Callithrix penicillata</i>	1 (14,28%)	-	7
Outras espécies	-	-	12
Total	6 (0,85%)	4 (0,57%)	701

(-) Ausência de anticorpos HI.

Anticorpos inibidores de hemaglutinação, monotípicos para o vírus Ilheus, foram detectados nas aves rolinha caldo-de-feijão (*Columbina talpacoti*), pombinha (*Geopelia cuneata*), chupim (*Molothrus bonariensis*) e canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), nos sagüis *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* e no quati *Nasua nasua* (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A cepa SPAn 165952 foi isolada a partir do sangue de uma ave silvestre da espécie *Sporophila caerulea*, a qual havia sido apreendida pela Polícia Florestal. Segundo os registros de recepção da ave, o local de origem não foi definido; após sete dias de observação em cativeiro, a ave foi libertada nas dependências do parque. Passados cerca de 20 dias de vida livre, essa ave foi recapturada para a pesquisa de arbovírus. Baseando-se no fato de que o período de viremia dos arbovírus em aves é caracteristicamente curto, cerca de três dias (Monath et al,⁵ 1978), pode-se afirmar que a infecção ocorreu no próprio parque.

Höfling & Camargo⁴ (1993); e Sick⁸ (1988) mostram que, ao longo do ano, a *Sporophila caerulea* realiza deslocamentos por grandes extensões territoriais, em busca de alimentos. Esses deslocamentos são feitos principalmente em função da disponibilidade cíclica de sementes de determinadas gramíneas. De acordo com Sick⁸ (1988), essas aves podem freqüentar áreas localizadas em diferentes altitudes, desde o nível do mar até 3.000 m. Esse comportamento pode favorecer a introdução do vírus Ilheus em outras regiões, o que provavelmente contribui para a ampla distribuição desse agente nas Américas do Sul e Central. O fato desse exemplar não ter sido recapturado nos dois anos consecutivos de estudo sugere o deslocamento da ave para outras regiões.

A cepa SPAn 165948 foi obtida a partir de sangue da ave silvestre *Molothrus bonariensis*. Sendo ave

residente no parque, o isolamento do vírus Ilheus indica, também nesse caso, que a infecção ocorreu no próprio parque, onde o vírus circulou pelo menos em parte do período em que foram realizadas as observações. Aves dessa espécie formam bandos e, dependendo da disponibilidade de alimentos, fixam residência numa mesma área. No Parque Ecológico do Tietê, esse bando encontrou condições adequadas para permanência; diariamente há oferta de alimento em comedouros, destinado aos animais silvestres mantidos em regime de semicativeiro. O espécime capturado pertence a esse bando residente, que foi observado durante os dois anos de estudo, período em que diversos membros foram capturados e recapturados.

A pesquisa sorológica mostrou outras evidências da circulação desse vírus na área estudada, uma vez que anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o vírus Ilheus, foram detectados no soro de alguns animais: nas aves silvestres *Columbina talpacoti*, *Sicalis flaveola* e *Molothrus bonariensis*; em sagüis mantidos em cativeiro durante vários anos e em um quati nascido e residente no parque. Também apresentou anticorpos uma ave exótica (*Geopelia cuneata*), proveniente de criação particular na região central da cidade de São Paulo, doada ao parque um ano após a obtenção dos vírus, indicando que o agente continuou circulando, embora não se tenha obtido mais isolamentos.

Outro fator que demonstra a continuidade da circulação do vírus Ilheus, para além do período em que foram obtidos os isolamentos, foi o encontro de anticorpos inibidores da hemaglutinação em aves e mamíferos. Inclusive, em um exemplar de *Molothrus bonariensis*, capturado pela primeira vez em 13/6/1997, quando se mostrou negativo no teste de IH, foi possível detectar, em 5/8/1997, quando foi recapturado, anticorpos heterotípicos para o vírus Ilheus, indicando que essa ave teve contato com o vírus que, possivelmente, circulava no parque naquele período.

Observa-se na Tabela 1 resultados da sorologia cruzada com outros flavivírus, principalmente com o vírus Rocio. A determinação do vírus Ilheus pode ser evidenciada somente pela neutralização, fato que dificulta a pesquisa desse vírus em inquéritos sorológicos. Por outro lado, a ausência de resposta nas infecções por Ilheus foi observada por Nassar et al⁶ (1997) e no presente estudo. Observa-se que o índice de resposta para anticorpos específicos foi baixo – 0,85% (Tabela 2), não havendo, no momento, explicação plausível para esse fato.

Considerando que o parque está inserido em uma

zona urbana densamente povoada e que tem suas instalações utilizadas com fins de lazer pela população local, os resultados do presente estudo são de importância para a saúde pública, pois indicam risco de infecção em humanos que freqüentam ou residem em áreas adjacentes ao parque.

Além do afluxo natural de aves migratórias para áreas como o parque, a recepção indiscriminada de animais silvestres, provenientes de outras regiões, geralmente não determinadas, possibilita a introdução, na área, de agentes como arbovírus, podendo gerar agravos à saúde da população.

REFERÊNCIAS

1. Clarke DH, Casals J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
2. Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, Souza LTM, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infection in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil – I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978-1990. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1994;36:265-75.
3. Fulton F, Dumbell KR. The serological comparison of strains of Influenza virus. *J Gen Microbiol* 1949;3:97-111.
4. Höfling E, Camargo HFA. *Aves no Campus*. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 1993.
5. Monath T, Kemp GE, Cropp CB, Bowen S. Experimental infection of House Sparrows (*Passer domesticus*) with Rocio virus. *Am J Trop Med Hyg* 1978;27:1251-4.
6. Nassar ES, Coimbra TLM, Rocco IM, Pereira LE, Ferreira IB, Souza LTM et al. Human disease caused by an arbovirus closely related to Ilheus virus: report of five cases. *Intervirology* 1997;40:247-52.
7. Shope RE, Sather GE. Arboviruses. In: Lennette EH, Schimidt NJ, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Baltimore: American Public Health Association; 1979. p. 767-814.
8. Sick H. *Ornitologia brasileira*. 3^a ed. Brasília (DF): Editora da Universidade de Brasília; 1988.