

HELENA BALDEZ VASCONCELOS

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS OROPOUCHE
(*BUNYAVIRIDAE: ORTHOBUNYAVIRUS*) NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes

Belém-Pará

2009

HELENA BALDEZ VASCONCELOS

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS OROPOUCHE
(*BUNYAVIRIDAE: ORTHOBUNYAVIRUS*) NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Instituto Evandro Chagas

Banca Examinadora: Prof. Dr. Francisco de Paula Pinheiro
Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Ricardo Ishak
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a Conceição de M. Almeida Vieira (suplente)
Universidade Federal Rural da Amazônia

Belém, 29 de Outubro de 2009.

EPÍGRAFE

“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você.”

Mário Quintana

Dedico essa dissertação a virgem Maria minha fonte de inspiração, sabedoria, perseverança, ninguém chega ao pai se não for por seu intermédio; ao meu avô Anibal Alvão (*in memoriam*); aos meus pais Anibal e Constância; aos meus filhos Pedro Fernando, Beatriz Helena e Barbara Cristina pelo amor, carinho, tolerância, compreensão; e ao meu esposo Pedro Vasconcelos pelo seu amor, apoio, incentivo, ensinamentos científicos, e confiança de que eu seria capaz de realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Barbara que tanto me ajudou com os programas de informática, muito obrigado filha.

À Dr^a Amélia Travassos da Rosa e ao Dr. Francisco de Paula Pinheiro, pesquisadores que há várias décadas têm se dedicado ao estudo do vírus Oropouche, em especial o Dr. Pinheiro que, através das suas descobertas científicas ficou mais fácil entender diversos aspectos desta arbovirose.

À Dr^a Elizabeth Conceição de Oliveira Santos, Diretora do Instituto Evandro Chagas e sua equipe técnico-administrativa pelo suporte e apoio institucional.

Ao meu orientador Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, por seus ensinamentos e companheirismo, paciência, tolerância e por acreditar na minha capacidade profissional.

Aos professores do BAIP (Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) em especial o Dr. Habib Fraiha Neto pelos seus ensinamentos.

À família Casseb: Alexandre pelas aulas de imunologia, Lívia que resolveu fazer disciplina comigo para podermos estudar juntas, e Samir que me ensinava tudo de Bioinformática pelo menos tentou! Obrigado.

Agradeço a virgem Maria e ao Divino Espírito Santo que me iluminam em todos os momentos da minha vida.

A todos os meus colegas da seção de Arbovírus que tanto colaboraram para que este trabalho fosse realizado, provando que, o trabalho em equipe rende bons frutos (*Somos fortes quando unidos, Platão*).

O meu muito obrigado a todos.

À Dr^a Elizabeth Salbe Travassos da Rosa, MSc. Taciana Barbosa, MSc. Lívia Casseb, Bacharel em Ciências Ambientais Armado Pereira e o técnico Mário Ferro.

À MSc. Daniele Medeiros, mestranda Darlene Smith, as estagiárias Daniele Guerreiro, Maria dos Prazeres e Ivy Prazeres.

À MSc. Lívia Carício Martins, MSc. Jannifer Chiang, MSc Daniele Henriques, Biomédica Milene Silveira; aos técnicos Basílio Buna, Assis dos Prazeres, Eliana Gama, Elpidia Costa, o mestrando Maxwell Furtado e o doutorando Euzébio Oliveira; aos estagiários Landerson Barros e Liliane Chagas.

Aos técnicos Osvaldo Vaz, Maria das Dores, Cleber Baldez, Jefferson Buna, Jonas Moraes que tanto me ajudaram na localização dos registros dos isolamentos do vírus Oropouche.

Aos técnicos; Luiz Roberto Oliveira Costa, Alcione e Iveraldo Ferreira da Silva.

À MSc. Eliana Pinto, MSc. Valéria Carvalho; aos técnicos Creuza Carvalho e Ercília Gonçalves, e aos estagiários Gregório, Roseane e Maissa.

Às Dras. Ana Cecília e Dr^a Sueli Guerreiro, MSc. Cleiton; às minhas colegas de mestrado e do Laboratório de Biologia Molecular Adriana e Mayra; à minha fiel escudeira Nati e o nosso eterno “quebra galho” mestrando Samir Casseb.

À Dr^a Nazaré Segura, MSc. Joaquim Neto, o mestrando Hamilton Monteiro aos técnicos; Orlando Vaz, Hélio Saraiva e Francisco Castro.

Às minhas colegas e amigas: Dr^a Socorro Azevedo, Dr^a Maria dos Remédios, Dr^a Consuelo Silva, Dr^a. Gilberta Bensabath e Dr^a Vera Barros.

O técnico Raimundo Lopes e dona Mary pela esterilização dos meus materiais.

Aos amigos Rosemary Miranda, Américo Lopes, Vera Cezário, Goreth, Simone, João Batista e Paulinha.

À Denise, Pedro, Thiago, Keiler, Jane e Isaac pela ajuda no biotério e na limpeza.

À Keley Nunes pela ajuda, amizade e carinho.

Aos meus colegas de mestrado que fizeram parte deste desafio Hamilton Monteiro, Cândida, Talita Furtado, Joana Favacho, Luciana Maradei, Olinda Monteiro e Marluce.

Ao Laboratório de Geoprocessamento, aos profissionais Dr. Nelson, Douglas e João que tanto me ajudaram na confecção dos mapas.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ARBOVÍRUS	20
1.2 FAMÍLIA BUNYAVIRIDAE.....	25
1.3 GÊNERO <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>	26
1.4 O <i>VÍRUS OROPOUCHE</i> (VORO).....	30
1.4.1 Histórico.....	30
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS.....	32
1.6 PATOGENIA.....	32
1.7 ESTRUTURA VIRAL.....	33
1.7.1 Morfologia.....	33
1.7.2 Ácido Nucléico.....	35
1.7.3 Organização Genômica.....	36
1.8 EPIDEMIOLOGIA.....	37
1.8.1 Distribuição Geográfica.....	37
1.8.2 Dispersão Epidêmica.....	41
1.8.3 Distribuição Sazonal.....	42

1.8.4	Ciclos de Transmissão	43
1.8.5	Período de Incubação	45
1.8.6	Período de Transmissão	46
1.8.7	Incidência	46
1.9	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	47
1.9.1	Mecanismo de Evolução: Rearranjo Genético	48
1.10	OBJETIVOS.....	51
1.10.1	Objetivo Geral	51
1.10.2	Objetivos específicos	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	CEPAS DO VÍRUS OROPOUCHE UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS CIRCULANTES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	52
2.2	PROPAGAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS.....	56
2.3	PROPAGAÇÃO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS VERO (CÉLULAS RENAIIS DE MACACO VERDE AFRICANO- <i>Cercopithecus aethiops</i>).....	56
2.4	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	57
2.5	REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).....	59
2.6	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE RT – PCR.....	61
2.7.	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	62
2.7.1	Reação de Sequenciamento	63

2.7.2	Precipitação da Reação de Sequenciamento	63
2.7.3	Eletroforese em Sequenciador Automático	64
2.8	ANÁLISE E IDENTIFICAÇÕES DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	64
2.9	ANÁLISE FILOGENÉTICA E EVOLUÇÃO	65
2.10	EVIDÊNCIA DE REARRANJO GENÉTICO	66
2.11	RELÓGIO MOLECULAR	66
3	RESULTADOS	72
3.1	RECONSTITUIÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CULTURA DE CÉLULAS VERO	72
3.2	VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA RT-PCR PARA OS SEGMENTOS N (PRNA) E GN (MRNA)	72
3.3	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	74
3.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA	77
3.5	ANÁLISE DE REARRANJO GENÉTICO	80
3.6	RELÓGIO MOLECULAR	82
3.7	DISPERSÃO GEOGRÁFICA DOS GENÓTIPOS DO VORO	85
4	DISCUSSÃO	87
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXOS	117
	ANEXO A – CÓPIA DA AUTORIZAÇÃO DA DIRETORIA DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS PARA PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	118

ANEXO B – CÓPIA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS/IEC/SVS/MS.....	119
ANEXO C – CÓPIA DE ARTIGO: A FEBRE DO OROPOUCHE – UMA REVISÃO DOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	120
ANEXO D- CÓPIA DE ARTIGO: OROPOUCHE FEVER EPIDEMIC IN NORTHERN BRAZIL: EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATES.....	136

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Distribuição dos 196 tipos diferentes arbovírus e outros vírus de vertebrados isolados na Amazônia Brasileira, segundo a família viral e vírus não grupados..... 22
- Figura 2** Mapa da região Amazônica brasileira mostrando os locais prováveis de isolamento original dos 196 tipos diferentes de arbovírus, a maioria no do Pará, onde foram isolados e caracterizados 176 tipos diferentes de arbovírus..... 24
- Figura 3** Representação esquemática da partícula de Orthobunyavirus evidenciando os três segmentos de RNA (PRNA, MRNA e GRNA) associados à proteína L. Circundando cada molécula de RNA, observa-se a proteína N, e as duas glicoproteínas Gn e Gc emergindo do envelope (E)..... 34
- Figura 4** Organização genômica do VORO. Os RNAs genômicos estão representados pelas linhas finas, sobre as quais se encontra o número de nucleotídeos de cada segmento. Os mRNAs são mostrados como setas (as setas indicam a origem do iniciador da sequência 3' para a extremidade 5'). Os produtos dos gene, com seus tamanhos, em KDa..... 36

Figura 5	Distribuição geográfica do VORO, mostrando as áreas onde ocorreram epidemias de febre do Oropouche entre os anos de 1960 a 2009.....	40
Figura 6	Ciclos de manutenção do <i>Vírus Oropouche</i>	44
Figura 7	Representação esquemática da técnica de extração de RNA pelo método do TRIZOL LS. Etapas: I - Adição de Trizol LS + Clorofórmio; II - Remoção da fase aquosa, sendo o RNA transferido para outro microtubo; III - Adição de isopropanol absoluto; IV - Remoção do isopropanol; V - Adição de etanol a 75%; VI - Remoção do etanol e reconstituição do <i>pellet</i>	59
Figura 8	Visualização dos produtos de RT-PCR para os genes Gn (1) e N (2) em gel de agarose a 1,2% para as diferentes cepas do VORO. CN: controle negativo (amostra do sobrenadante de células VERO não infectadas); PPTM: padrão de peso e tamanho molecular <i>Low DNA mass</i> (Invitrogen); pb: pares de bases.....	73

Figura 9 (a) análise filogenética comparativa entre o VORO e diferentes vírus pertencentes ao grupo Simbu (VAINO: *vírus Aino*; VAKA: *vírus Akabane*; VTIN: *vírus Tinaroo*; VBUT: *vírus Buttonwillow*; VFP: *virus Facey's Paddock*; VMER: *vírus Mermet*; VING: *vírus Ingwavuma*). (b) Filogenia comparativa para o gene N de 96 cepas do VORO. Valores indicados acima de cada nó principal da árvore correspondem aos valores Bayesianos de suporte aos grupos filogenéticos. O valor da barra corresponde a 10% de divergência genética entre as cepas virais..... 79

Figura 10 Filogenia dos segmentos **N** (PRNA) (a) e **GN** (MRNA) (b). Valores de *bootstraps* obtidos para os métodos de **MP** e **NJ**. Os números exibidos nas barras em **a** e **b** representam 10% de divergência nucleotídicas, respectivamente. Para **N** (PRNA) (a) .isolados do genótipo I aparecem em vermelho, os do genótipo II estão em azul escuro, do genótipo III em verde e do genótipo IV em azul claro. Para o **GN** .(MRNA) (b).os isolados que representam rearranjo genético aparecem agrupados em genótipos diferentes..... 81

- Figura 11** Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa do gene **N** (693 nt) de 96 cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros, localidades e períodos. Os grupos filogenéticos principais encontram-se representados pelos genótipos (I, II, III e IV). Valores acima dos nós principais representam as datas de emergência dos ancestrais comuns expressos em anos em relação à data atual (ano de 2009). As setas indicam a data provável para emergência dos genótipos I, II, III e IV. ACMR: ancestral comum mais recente. Os valores numéricos existentes na barra representam a escala temporal de datação molecular..... 84
- Figura 12** Dispersão geográfica dos genótipos do VORO nas Américas entre os anos de 1955 e 2009. AC : Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, MA: Maranhão, MG: Minas Gerais, PA: Pará, RO: Rondônia, TO: Tocantins..... 86

RESUMO

O *Virus Oropouche* (VORO; *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) é um dos mais importantes arbovírus que infecta humanos na Amazônia brasileira, e é causador da febre do Oropouche. Entre 1961 e 2009, um grande número de epidemias foi registrado em diferentes centros urbanos dos Estados Brasileiros do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins, e também no Panamá, Peru e Trinidad & Tobago. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um estudo retrospectivo dos aspectos epidemiológicos e moleculares do VORO enfatizando sua distribuição, a dinâmica das epidemias ocorridas no período, bem como a dispersão de diferentes genótipos na América Latina e no Brasil como contribuição à epidemiologia molecular do VORO. Para tanto 66 isolamentos do VORO pertencentes ao acervo do Instituto Evandro Chagas foram propagados em camundongos e em cultura de células VERO, seguida da extração do RNA viral e obtenção do cDNA por RT-PCR; os amplicons foram purificados e submetidos ao sequenciamento nucleotídico para análises moleculares e evolução, incluindo o rearranjo genético, estudo de relógio molecular e análise de dispersão viral. Foi demonstrada a presença de quatro linhagens distintas do VORO na Amazônia brasileira (genótipos I, II, III e IV), sendo os genótipos I e II, respectivamente os mais frequentemente encontrados em áreas da Amazônia ocidental e oriental. Esses e o genótipo III estão constantemente evoluindo, mediante o mecanismo “*boom and boost*” que resulta na emergência seguida de substituição das sublinhagens (subgenótipos) circulantes por outras mais recentes. O genótipo

III do VORO, previamente encontrado somente no Panamá, foi descrito na Amazônia e Sudeste do Brasil. Os dados obtidos pela análise filogenética comparativa das topologias para os segmentos PRNA e MRNA sugerem que o VORO utiliza o rearranjo genético como mecanismo de geração de biodiversidade viral, sendo o genótipo I o mais estável e o II o mais instável e, portanto, mais sensível às pressões evolutivas; foi reconhecido um novo genótipo do VORO neste estudo em amostras isoladas em Manaus no ano de 1980, que foi denominado de genótipo IV. O estudo do relógio molecular mostrou que a emergência do VORO se deu no Estado do Pará provavelmente há 223 anos e daí ao longo dos anos se dispersou pela PanAmazônia bem como para o Caribe, sendo que o genótipo I foi o que originou os demais genótipos do VORO.

Palavras Chave: *Vírus Oropouche*. Epidemiologia molecular. Genótipos. Rearranjo genético. Dispersão viral.

ABSTRACT

Oropouche Virus (OROV; Bunyaviridae, Orthobunyavirus) is one of most important arbovirus which infects humans in the Brazilian Amazon, and is also the causal agent of Oropouche fever. Between 1961 and 2009, dozens of epidemics were registered in several urban centers of the Brazilian states of Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia and Tocantins, and also in Panama, Peru and Trinidad & Tobago. This work aimed to develop a retrospective epidemiologic and molecular study of *OROV* emphasizing its distribution, epidemic dynamics in the period, as well as the dispersion of the *OROV* genotypes in Brazil and other Latin American countries as a contribution to understanding of the molecular epidemiology of it. A total of 66 *OROV* isolates of the Instituto Evandro Chagas collection were growth into VERO cells and suckling mice; then, RNA was extracted and cDNA prepared by RT-PCR; the amplicons were purified and submitted to nucleotide sequencing to further molecular and evolution analyzes including genetic reassortment, molecular clock and viral dispersion. It was demonstrated the circulation of four different genetic lineages of *OROV* in the Brazilian Amazon (genotypes I, II, III, and IV); the genotypes I and II were respectively the most distributed *OROV* genotypes in Occidental and Oriental Amazon areas. These and the genotype III have been continuously under evolution pressure and changing by the mechanism “boom and boost” which result in an emergence of new *OROV* sub-genotypes that replace the older circulating sub-lineages in an area. The genotype III which was previously recognized in Panama it was identified in the Amazon

and Southeast regions. The results obtained by the comparative phylogenetic analyses of the SRNA and MRNA topologies suggest that *OROV* uses the genetic reassortment as mechanism to further generate its viral biodiversity, and the genotype I is the most stable, while the genotype II is the most unstable, and therefore under higher evolutionary pressure; it was recognized a new *OROV* genotype in this study, the genotype IV. The molecular clock analysis showed that *OROV* emerged in Pará State approximately 223 years ago, and along of the years did its dispersal and evolution through the Pan-Amazon as well as to the Caribbean and Central America regions, and the genotype I was responsible by the emergence of all other *OROV* genotypes.

Keywords: *Oropouche Virus*. Molecular epidemiology. Genotypes. Genetic reassortment. Viral dispersion.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ARBOVÍRUS

A região Amazônica, dentro de sua vasta abrangência territorial, é contemplada com uma enorme biodiversidade ainda pouco conhecida. De modo geral, apresenta clima tropical úmido, muito embora existam variações climáticas em áreas específicas determinadas por fatores meteorológicos e geográficos (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Essa região compreende uma das maiores bacias hidrográfica do mundo onde coabitam inúmeras espécies de vertebrados silvestres e de dípteros hematófagos que servem, respectivamente, como hospedeiros e vetores para muitos agentes patogênicos, dentre os quais os arbovírus (Causey *et al.*, 1961). Os arbovírus, termo derivado da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, são agentes virais ecologicamente distintos com uma característica comum que é a transmissão biológica por artrópodes hematófagos; esses vírus apresentam uma distribuição cosmopolita, mas com maior prevalência nas regiões tropicais (Pinheiro *et al.*, 1997).

Os arbovírus apresentam um ciclo complexo em natureza, envolvendo a transmissão biológica entre hospedeiro vertebrado susceptível e artrópode hematófago, ou entre hospedeiros artrópodes pela via transovariana, e, possivelmente, pela via venérea. Multiplicam-se e produzem viremia em hospedeiros vertebrados e, ainda, multiplicam-se em tecidos de artrópodes, sendo transmitidos a novos vertebrados susceptíveis através da picada do

artrópode infectado, após um período de incubação extrínseco (WHO, 1985). Os arbovírus possuem genomas constituídos por ácido ribonucléico (RNA), exceto pelo vírus da febre suína africana que apresenta ácido desoxirribonucléico (DNA) como material genético. O genoma de RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não, bem como apresentar-se com uma ou duas fitas, e polaridade positiva, negativa ou ambisense (Fauquet *et al.*, 2005).

Atualmente 537 arbovírus encontram-se registrados no Catálogo Internacional de Arbovirus e certos outros vírus isolados de vertebrados (Karabatsos *et al.*, 2002), dos quais 135 foram isolados originalmente na África, 78 na Ásia, 35 na Europa, 229 nas Américas, e 60 na Oceania (Fauquet *et al.*, 2005).

Na Amazônia brasileira, durante o período de 1954 a 2006 foi possível o isolamento de pelo menos 196 tipos diferentes de arbovírus, distribuídos em diversas famílias de vírus e outros vírus de vertebrados (Figura 1). Desse total, 160 foram isolados pela primeira vez no Brasil, com pelo menos 100 tipos novos para o mundo (Travassos *et al.*, 1986; Martins *et al.*, 2007; P.F.C. Vasconcelos, comunicação pessoal). Trinta e quatro arbovírus já foram associados com infecção em humanos, alguns inclusive ocasionando quadros graves que podem levar a morte (Vasconcelos *et al.*, 1992; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Pinheiro *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2001).

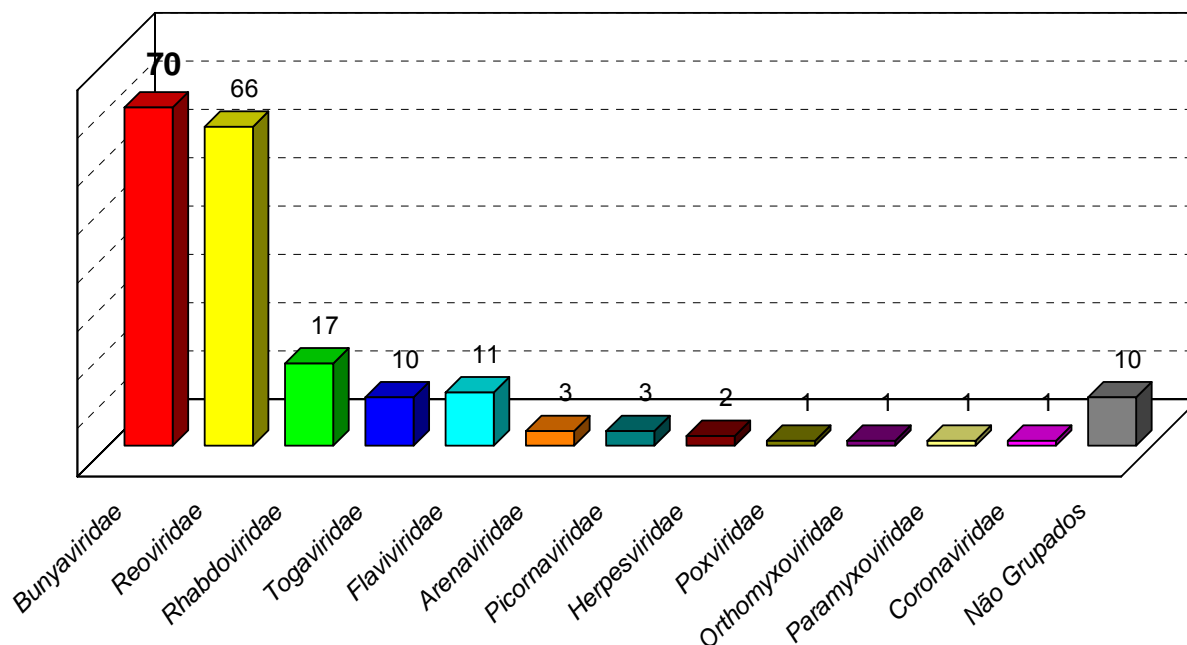


Figura 1 - Distribuição dos 196 tipos diferentes arbovírus e outros vírus de vertebrados isolados na Amazônia Brasileira, segundo a família viral e vírus não grupados.

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC.

A maioria dos arbovírus é encontrada em ambientes silvestres, no entanto a presença desses agentes virais tem sido notada periodicamente em ambientes urbanos como podemos constatar na Amazônia brasileira, pelas epidemias causadas pelos *Vírus dengue* (VDEN) e *Vírus Oropouche* (VORO). Em geral os arbovírus causam doença de evolução autolimitada sem morte ou incapacitação; no entanto, alguns arbovírus podem causar sérios quadros clínicos que podem inclusive ocasionar a morte ou a incapacitação permanente do paciente (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Os arbovírus podem ocorrer de forma endêmica ou epidêmica e alguns como, por exemplo, O VORO, o *Vírus Mayaro* (VMAY), o VDEN e o *Vírus da febre amarela* (VFA), que circulam na Amazônia, são capazes de causar sérios problemas de saúde pública, pois, além de estarem associados às epidemias, são também responsáveis por considerável morbidade e/ou letalidade (VDEN e VFA) em seres humanos no Brasil e também no exterior (Vasconcelos *et al.*, 1992; 1998).

A distribuição geográfica dos arbovírus é ampla, tanto nas regiões tropicais como nas temperadas. Entretanto, observa-se predominância dos arbovírus nas regiões tropicais, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Na Amazônia, os arbovírus têm sido isolados em praticamente todos os Estados da região, porém com maior ocorrência no Estado do Pará (Figura 2), provavelmente devido aos estudos terem sido realizados principalmente nesse, do que uma maior prevalência dos arbovírus (Travassos da Rosa *et al.*, 1988).

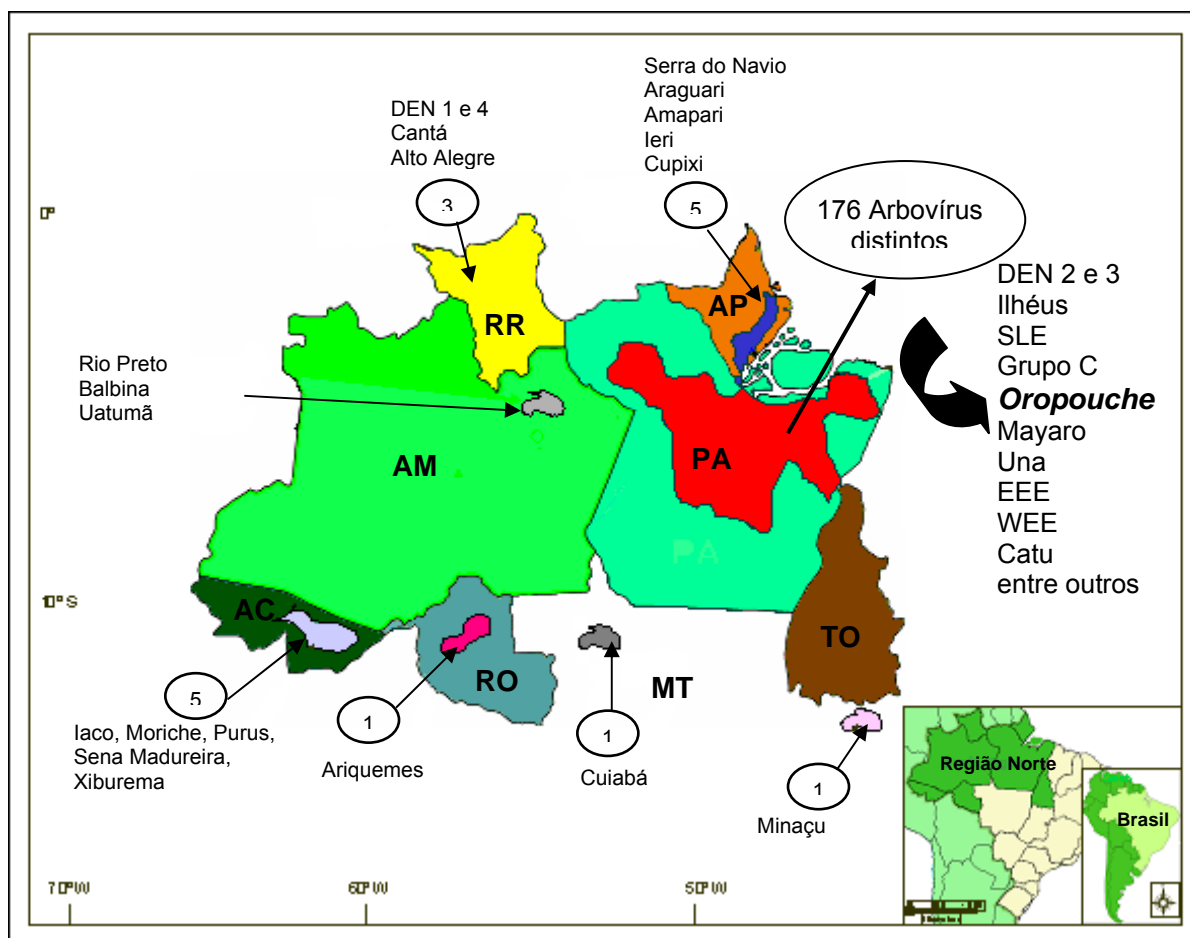


Figura 2 - Mapa da região Amazônica brasileira mostrando os locais prováveis de isolamento original dos 196 tipos diferentes de arbovírus, a maioria no Estado do Pará, onde foram isolados e caracterizados 176 tipos diferentes de arbovírus.

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas – IEC.

1.2 FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*

O *Virus Bunyamwera* (VBUN) foi originalmente isolado a partir de um lote de mosquitos do gênero *Aedes* em Uganda, África, durante estudos sobre febre amarela realizados em 1943 (Smithburn *et al.*, 1946). O isolamento do VBUN, aparentemente um evento insignificante, abriu as portas para o estabelecimento de uma das maiores famílias virais, a família *Bunyaviridae*. Após o isolamento do VBUN, reconhecido como o protótipo da família, outros arbovírus foram descritos e incluídos em um grupo sorológico distinto (grupo C) dos grupos clássicos até então descritos, os grupos A e B dos arbovírus que, hoje correspondem respectivamente, aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* (Casals, 1963; Karabatsos, 1985). Durante as décadas seguintes, estudos sorológicos detalhados, juntamente com análises bioquímicas e morfológicas, proporcionaram o estabelecimento do supergrupo Bunyamwera que incluía distintos grupos de vírus antigenicamente relacionados (Murphy *et al.*, 1973).

A família *Bunyaviridae* foi formalmente estabelecida em 1975 e atualmente é constituída por quatro gêneros cujos membros infectam animais, (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*) e um gênero (*Tospovirus*) cujos membros infectam plantas (Fauquet *et al.*, 2005). A maioria dos vírus desta família é transmitida por artrópodes, primariamente mosquitos, carrapatos, phlebotomíneos ou maruins. Os hantavírus por outro lado são transmitidos por aerossol das excretas de roedores contaminados com esses vírus.

1.3 GÊNERO *ORTHOBUNYAVIRUS*

Segundo o oitavo relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (Fauquet *et al.*, 2005) atualmente o gênero *Orthobunyavirus* compreende o total de 166 vírus, dentre tipos e subtipos, distribuídos em 48 espécies virais. Ademais, o gênero apresenta três vírus como espécies tentativas de inclusão, além de 22 vírus não classificados. A maioria desses vírus é transmitida por mosquitos e possui a habilidade de se replicar em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados. Baseado em testes sorológicos, os vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* têm sido classificados em pelo menos 18 sorogrupos distintos.

Quadro 1 – Distribuição dos principais membros do gênero *Orthobunyavirus* em grupos antigênicos de acordo com distribuição geográfica e tipo de vetor.

Grupo sorológico	Vírus	Distribuição geográfica	Principal vetor
Anopheles A		Predominantemente na América do Sul, mas também na América do Norte	Mosquitos
	<i>Tacaiuma</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Virgin River</i>	América do Norte	Mosquitos
Anopheles B		América do Sul	Mosquitos

Quadro 1 – Distribuição dos principais membros do gênero *Orthobunyavirus* em grupos antigênicos de acordo com distribuição geográfica e tipo de vetor

(continuação)

Grupo sorológico	Vírus	Distribuição geográfica	Principal vetor
Bakau	<i>Anopheles B</i>	América do Sul Predominantemente na Ásia, mas também na África	Mosquitos Mosquitos
	<i>Bakau</i>	Ásia	Mosquitos
Bunyamwera		Américas, África, Ásia e Europa	Predominantemente Mosquitos; também Culicoides
	<i>Bunyamwera</i>	África	Mosquitos
	<i>Cache Valley</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Fort Sherman</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Germiston</i>	África	Mosquitos
	<i>Ilesha</i>	África	Mosquitos
	<i>Kairi</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Main drain</i>	América do Norte	Mosquitos, Culicoides
	<i>Shokwe</i>	África	Mosquitos
	<i>Wyeomyia</i>	América do Sul	Mosquitos
<i>Xingu</i>	América do Sul	Mosquitos	
Bwamba		África	Mosquitos
	<i>Bwamba</i>	África	Mosquitos
	<i>Pongola</i>	África	Mosquitos
Gupo C		América do Sul e NA	Mosquitos
	<i>Apeu</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Caraparu</i>	América do Sul e América do Norte	Mosquitos
	<i>Itaqui</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Madrid</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Marituba</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Murutucu</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Nepuyo</i>	América do Sul e América do Norte	Mosquitos

Quadro 1 – Distribuição dos principais membros do gênero *Orthobunyavirus* em grupos antigênicos de acordo com distribuição geográfica e tipo de vetor.

(continuação)

Grupo sorológico	Vírus	Distribuição geográfica	Principal vetor
	<i>Oriboca</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Ossa</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Restan</i>	América do Sul	Mosquitos
California		Américas, Europa, África	Mosquitos
	<i>California encephalitis</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Guaroa</i>	América do Sul e América do Norte	Mosquitos
	<i>Inkoo</i>	Europa	Mosquitos
	<i>Jamestown Canyon</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>La Crosse</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Snowshoe hare</i>	América do Norte	Mosquitos
	<i>Tahyna (Lumbo)</i>	Europa (África)	Mosquitos
Capim		Américas	Mosquitos
	<i>Capim</i>	América do Sul	Mosquitos
Gamboa			Mosquitos
	<i>Gamboa</i>	América do Sul	Mosquitos
Guama		Américas	Mosquitos
	<i>Catu</i>	América do Sul	Mosquitos
	<i>Guama</i>	América do Sul e América do Norte	Mosquitos
Koongol		Austrália	Mosquitos
	<i>Koongal</i>	Austrália	Mosquitos
Minatitlan		Américas	Mosquitos
	<i>Minatitlan</i>	América do Norte	Mosquitos
Nyando		África	Mosquitos
	<i>Nyando</i>	África	Mosquitos

Quadro 1 – Distribuição dos principais membros do gênero *Orthobunyavirus* em grupos antigênicos de acordo com distribuição geográfica e tipo de vetor.

(continuação)

Grupo sorológico	Vírus	Distribuição geográfica	Principal vetor
Olifantsvlei	<i>Olifantsvlei</i>	África África	Mosquitos Mosquitos
Patois	<i>Patois</i> <i>Estero Real</i>	Américas América do Norte América do Norte	Predominantemente Mosquitos, carrapatos Mosquitos Carrapatos
Simbu	<i>Akabane</i> <i>Ingwavuma</i> <i>Oropouche</i>	Américas, Asia, Austrália, África	Culicoides, mosquitos
		África, Á Asia, Austrália	Culicoides, mosquitos
		África, Ásia	Mosquitos
		América do Sul	Culicoides, mosquitos
	<i>Buttomwillow</i>	América do Norte	Culicoides, varripennis
	<i>Face's</i> <i>Paddock</i>	Austrália	<i>Culex annulirostris</i>
Tete	<i>Bahig</i> <i>Weldona</i>	África, Europa, América do Norte África, Europa América do Norte	Predominantemente carrapatos, Culicoides Carrapatos Culicoides
Turlock		África, Américas, Ásia, Europa	Mosquitos
	<i>Turlock</i>	América do Sul América do Norte	Mosquitos

Fonte: Fauquet *et al.*, 2005

Um dos maiores grupos sorológicos desse gênero é o grupo Simbu,

cujo nome corresponde ao protótipo, *Virus Simbu* (SAAr 53) arbovírus isolado em 1955 na África do Sul a partir de um lote de mosquitos *Aedes circumluteolus* (Karabatsos, 1985). Este grupo, inicialmente descrito por Casals (1957), atualmente inclui 25 vírus antigenicamente relacionados, que tem sido isolado em todos os continentes, exceto Europa (Calisher, 1996). A classificação dos vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu tem sido realizada com base no relacionamento antigênico mediante aplicação de testes de inibição da hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (N). Segundo Kinney & Calisher (1981), o sorogrupo Simbu encontra-se subdividido em cinco complexos antigênicos denominados: Simbu, Manzanilla, Oropouche, Thimiri e Nola. O VORO está incluído no complexo Oropouche juntamente com *vírus Utinga*, *vírus Jatobal*, *vírus Utive*, *vírus Buttomwillow* e *vírus Face's Paddock* (Fauquet *et al.*, 2005).

1.4 O VIRUS OROPOUCHE (VORO)

1.4.1 Histórico

O VORO é um dos mais importantes arbovírus que infectam o homem na Amazônia brasileira, sendo superado em número de casos somente pelo vírus da dengue e, é o agente causador da febre do Oropouche (Pinheiro *et al.*, 1994). O primeiro caso de febre do Oropouche foi descrito em Trinidad & Tobago no ano de 1955; o vírus foi isolado do sangue de um paciente febril residente no vilarejo denominado Vega de Oropouche, bem como de um lote

de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (Anderson *et al.*, 1961). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1960 a partir do sangue de uma preguiça da espécie *Bradypus trydactylus* capturada em uma área silvestre, durante a construção da rodovia Belém-Brasília e, também, a partir de um lote de mosquitos *Ochlerotatus serratus* capturados próximo a mesma área (Pinheiro *et al.*, 1962).

No ano seguinte, o vírus foi detectado na capital paraense, ocasião em que uma grande epidemia de febre do Oropouche foi registrada, tendo sido estimado que cerca de 11.000 pessoas fosse afetada pela doença (Pinheiro *et al.*, 1962). A partir desse episódio, o VORO demonstrou seu potencial epidêmico e muitas outras epidemias foram registradas em diferentes centros urbanos dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (Pinheiro *et al.*, 2004). Fora do Brasil, epidemias causadas pelo VORO foram descritas no Panamá em 1989 (Evelia Quiroz *et al.*, 1989 - dados não publicados; Pinheiro *et al.*, 2004), bem como na Região Amazônica Peruana nos anos de 1992 e 1994 (Chávez *et al.*, 1992; Watts *et al.*, 1997). Recentemente, o VORO foi detectado nos municípios paraenses de Parauapebas, Porto de Moz, Igarapé Açu, Magalhães Barata e Maracanã, estas três últimas localidades pertencente à Zona Bragantina, região em que o vírus foi detectado pela primeira vez na década de 1970 (Azevedo *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009), bem como em Mazagão no Amapá, Altamira, Santa Bárbara e outros municípios no Estado do Pará (Vasconcelos *et al.*, dados não publicados)

1.5 ASPECTOS CLÍNICOS

A febre do Oropouche clinicamente se manifesta sob a forma de um quadro febril agudo, que costuma ser acompanhado por cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tontura, calafrios e fotofobia. Alguns pacientes apresentam exantema morbiliforme que lembra o da rubéola, sendo também descritos em alguns pacientes náuseas, vômitos, diarréia, congestão conjuntival, dor epigástrica e dor retro ocular e outras manifestações sistêmicas (Pinheiro *et al.*, 1981a).

Alguns dias após o término do episódio febril inicial, comumente se observa a recorrência dos sintomas, porém, em geral, com menor intensidade. Alguns pacientes podem exibir um quadro de meningite asséptica (Pinheiro *et al.*, 1982 b). A recuperação dos enfermos é completa, sem sequelas aparentes, mesmo nos casos mais graves. Não existe registro de letalidade comprovadamente determinada pela febre do Oropouche (Pinheiro *et al.*, 1982b; Pinheiro *et al.*, 2004).

1.6 PATOGENIA

Pouco se conhece a respeito da patogênese do VORO. Não são conhecidas fatalidades causadas por esse agente e, portanto, não há dados de

autópsia disponíveis sobre lesões causadas em tecidos humanos, desconhecendo-se a patogenia da febre do Oropouche (Pinheiro *et al.*, 1998). Os únicos achados relatados decorre de estudos experimentais e correspondem a alterações ultraestruturais – necrose de hepatócitos – em fígado de hamsters inoculados por via intracerebral (Araujo *et al.*, 1978). Estudos realizados em hamsters inoculados por via subcutânea, tentando simular a infecção natural, demonstrou que o VORO causa viremia e que possui marcante tropismo por fígado e cérebro com altos títulos virais nesses órgãos (Pinheiro *et al.*, 1982). De fato, cérebro e fígado dos animais com infecção clínica, apresentaram encefalite e hepatite severas, e que constituem componentes patológicos importantes da infecção. A imunohistoquímica demonstrou marcação de inúmeras células no cérebro e fígado incluindo respectivamente abundantes neurônios e hepatócitos infectados (Rodrigues, 2004).

1.7 ESTRUTURA VIRAL

1.7.1 Morfologia

Apesar de não haver estudos específicos de microscopia eletrônica em tecidos humanos para o VORO, acredita-se que suas partículas virais assumam morfologia similar a observada para os demais ortobunyavírus. Estudos ao nível de microscopia eletrônica para o *Virus La Crosse* (VLAC)

(Obijeski *et al.*, 1976), mostraram que as partículas desse vírus são esféricas medindo entre 80 a 110 nm de diâmetro, sendo envolvidas por um envelope lipídico. O envelope viral deriva de membranas do complexo de Golgi, e ocasionalmente da membrana plasmática celular. Internamente, a partícula viral encerra três segmentos de RNA de tamanhos diferentes e que se encontram, individualmente, ligada a uma proteína L (possível RNA polimerase viral dependente de RNA) e que são circundados por uma proteína denominada N (nucleocapsídeo), originando deste modo três nucleoproteínas conforme demonstrado na Figura 3 (Murphy *et al.*, 1973; Murphy, 1996; Buchen-Osmond, 2003).

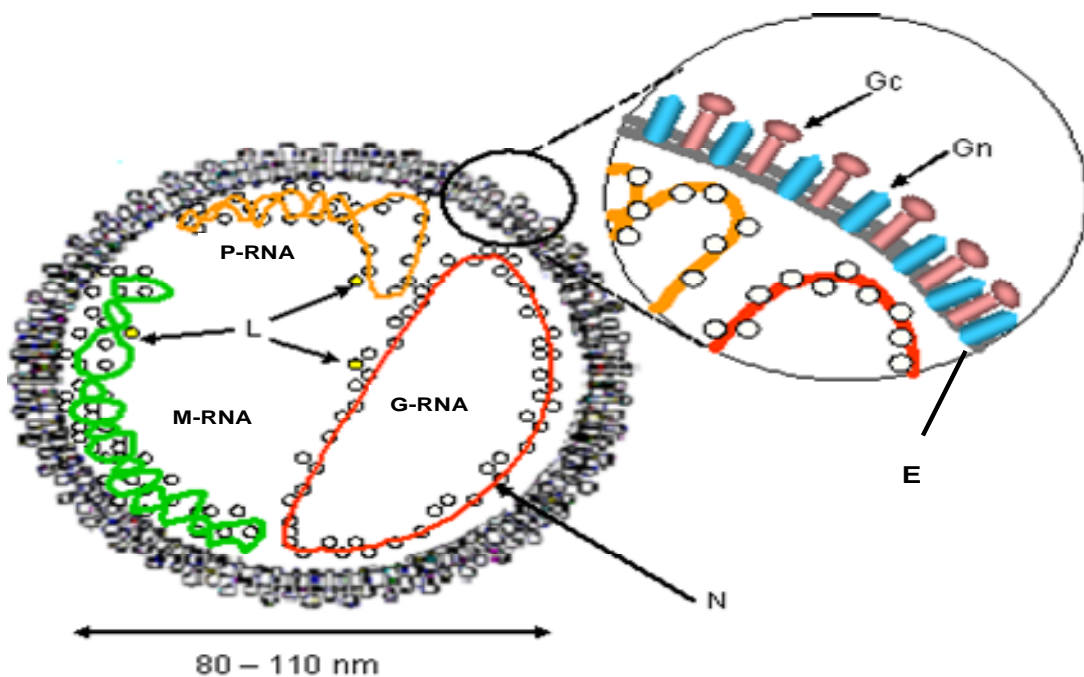


Figura 3 – Representação esquemática da partícula de orthobunyavirus evidenciando os três segmentos de RNA (PRNA, MRNA e GRNA) associados à proteína L. Circundando cada molécula de RNA, observa-se a proteína N, e no detalhe, as duas glicoproteínas Gn e Gc emergindo do envelope (E).

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.*, 2005

1.7.2 Ácido nucléico

O VORO apresenta como os demais orthobunyavirus, seu genoma composto por três segmentos de RNA de fita simples, polaridade negativa, denominados Pequeno (*Small*; PRNA), Médio (*Medium*; MRNA) Grande (*Large*; GRNA), os quais são responsáveis pela formação das proteínas estruturais de nucleocapsídeo (N) e glicoproteínas de superfície (Gn e Gc), bem como das proteínas não estruturais NSs, NSm e L, esta última uma possível RNA polimerase viral dependente de RNA.

O tamanho do genoma do VORO varia conforme o segmento genômico (Figura 4). O segmento PRNA é constituído por 754 nucleotídeos (nt), enquanto que os segmentos M e L possuem 4.385 e 6.846 nt, respectivamente (Saeed *et al.*, 2000; Aquino *et al.*, 2003; Aquino *et al.*, 2004). Os três fragmentos de RNA genômicos apresentam ao longo de suas extremidades 3' e 5' localizadas em regiões não codificantes (RNC), onze nt altamente conservados e complementares, o que proporciona circularização e a conformação helicoidal das moléculas de RNA, gerando conseqüentemente, um melhor acomodamento espacial no interior da estrutura viral (Clerx-Van Haaster & Bishop, 1980; Clerx-Van Haaster *et al.*, 1982a; Clerx-Van Haaster *et al.*, 1982b; Raju & Kolakofsky, 1989).

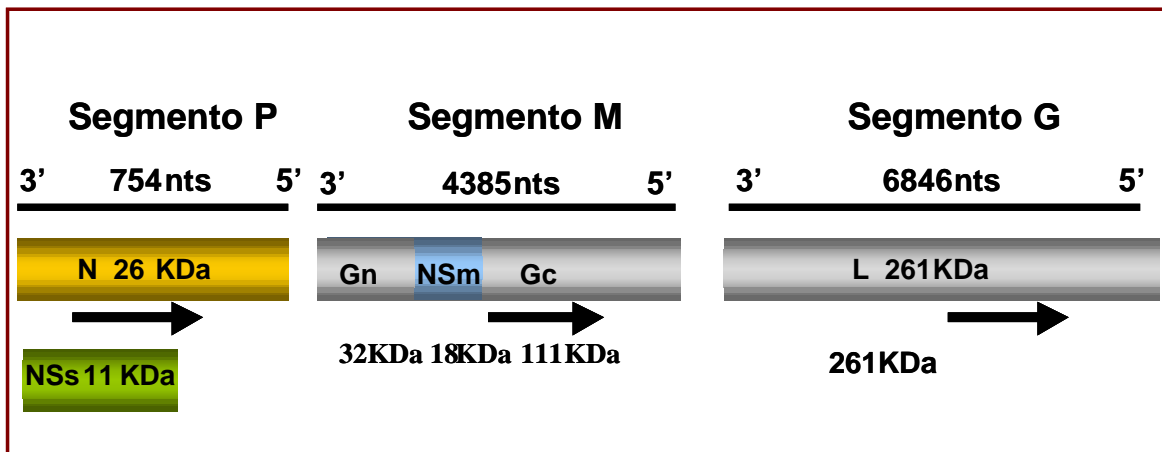


Figura 4 - Organização genômica do VORO. Os RNAs genômicos estão representados pelas linhas finas, sobre as quais se encontra o número de nucleotídeos de cada segmento. Os mRNAs são mostrados como setas (as setas indicam a origem do iniciador da sequência 3' para a extremidade 5'). Os produtos dos genes, aparecem com seus tamanhos em KDa.

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.*, 2005

1.7.3 Organização genômica

O VORO apresenta ao longo de seus segmentos de RNA genes orientados no sentido 3' → 5' que codificam proteínas estruturais e/ou não estruturais em suas sequências complementares. O segmento GRNA codifica em uma única cadeia aberta de leitura (CAL), a proteína L, a maior proteína dos Orthobunyavirus, uma possível RNA polimerase-dependente de RNA com massa molecular de 244,6 kDa e que se encontra associada aos três segmentos de RNA viral (Aquino *et al.*, 2004). Em relação ao segmento MRNA, o mesmo codifica em uma única CAL, uma grande poliproteína, que após

clivagem origina três proteínas virais, sendo duas glicoproteínas estruturais de superfície denominadas Gn e Gc e uma proteína não estrutural denominada NSm (Aquino *et al.*, 2004). O segmento PRNA codifica ao longo de duas CALs superpostas, uma proteína estrutural de nucleocapsídeo (N) que circunda cada um dos segmentos de RNA genômicos, e uma proteína não estrutural denominada NSs (Saeed *et al.*, 2000). As proteínas virais descritas acima estão implicadas a importantes propriedades biológicas dos ortobunyavírus, tais como: antigenicidade (processo que estimula a produção de anticorpos neutralizantes, fixadores de complemento e inibidores da hemaglutinação), virulência (grau de severidade da doença) e a infectividade em vertebrados e invertebrados (interação vírus-célula hospedeira) (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1989; Bouloy, 1991; Buchen-Osmond, 2003).

1.8 EPIDEMIOLOGIA

1.8.1 Distribuição Geográfica

Até o momento, o VORO foi isolado no Brasil, Panamá, Peru e Trinidad & Tobago (Figura 5). No Brasil, desde o primeiro isolamento do vírus em 1960 até 1980, o VORO causou diversas epidemias aparentemente restritas ao Estado do Pará, atingindo diferentes municípios das mesorregiões do Estado quais sejam: Metropolitana de Belém (Belém, Ananindeua, Benfica, Caraparu, Castanhal e Santa Isabel); Nordeste (Abaetetuba, Augusto Correia,

Baião, Bragança, Capanema, Curuçá, Tomé-Açu, Vigia e Viseu); Sudeste (Itupiranga); Baixo Amazonas (Belterra, Mojui dos Campos e Santarém); e Marajó (Portel). Nesse período apenas a mesorregião sudoeste do Estado não registrou casos ou epidemias de Febre do Oropouche (Pinheiro *et al.*, 1962; Pinheiro *et al.*, 1976 ; Freitas *et al.*.,1982; Dixon *et al.*, 1981).

Entre os anos de 1981 e 1996, surtos e epidemias de febre do Oropouche foram registrados no Estado do Pará (Oriximiná, mesorregião do Baixo amazonas; Brasil Novo e Altamira, mesorregião Sudeste); também ocorreram episódios em outros estados, como observado nas cidades de Manaus, Novo Airão e Barcelos (Amazonas), Mazagão (Amapá), Xapuri (Acre), Ariquemes, Machadinho e Ouro Preto D'Oeste (Rondônia), Porto Franco e Estreito (Maranhão) e Tocantinópolis (Tocantins) (Le Duc *et al.*, 1988; Pinheiro *et al.*, 1981; Borborema *et al.*, 1982; Vasconcelos *et al.*, 1989; Pinheiro *et al.*, 1998; Travassos da Rosa *et al.*, 1996). Em 2003 e 2004, surtos de febre do Oropouche foram registrados nos municípios paraenses de Parauapebas (mesorregião Sudeste) e Porto de Moz (mesorregião do Baixo Amazonas), respectivamente (Azevedo *et al.*, 2007).

Em 2006, o VORO voltou a causar epidemias no Estado do Pará, desta vez nos municípios de Maracanã, Igarapé-Açu, Magalhães Barata e Viseu localizados na zona Bragantina do Nordeste paraense, evidenciando a reemergência deste vírus após 26 anos de silêncio epidemiológico na região (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Em 2009, o VORO ressurgiu nos municípios paraenses de Santa Bárbara (Região Metropolitana de Belém), Altamira (Mesorregião Sudeste) e

em Mazagão, Estado do Amapá (Vasconcelos, P.F.C. *et al.*, dados não publicados).

Fora do Brasil, epidemias tem sido documentadas no Panamá e no Peru. A epidemia ocorrida no Panamá foi registrada no ano de 1989 no Vilarejo de Benjuco localizado aproximadamente 50 km a oeste da cidade do Panamá, capital do país (Evelia Quiroz *et al.*, 1989, dados não publicados; Pinheiro *et al.*, 2004). No Peru, a febre do Oropouche foi clínica e laboratorialmente documentada no ano de 1992, quando o VORO causou uma epidemia no município de Iquitos (Chávez *et al.*, 1992; Watts *et al.*, 1997). Ainda na Amazônia Peruana duas outras epidemias foram registradas no ano de 1994 nas cidades de Puerto Maldonado e Madre de Dios (Ministério da Saúde do Peru & NAMRID, 1994).



Figura 5 - Distribuição geográfica do VORO, mostrando as áreas onde ocorreram epidemias de febre do Oropouche entre os anos de 1960 a 2009.

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas e Laboratório de Geoprocessamento/IEC/SVS/MS

Em 2005, estudos soroepidemiológicos e moleculares realizados em amostras coletadas na província de Jujuy na Argentina demonstraram a presença de anticorpos IgM, bem como do genoma viral em soros de pacientes febris evidenciando a circulação do VORO na região (Fabbri, C. & Nunes, M.R.T. 2005, dados não publicados).

Na década de 1980 durante um inquérito sorológico para arbovírus na região do município de Ribeirão Preto Estado de São Paulo, observou-se dois moradores urbanos, ambos naturais do Estado de Minas Gerais com anticorpos inibidores de hemaglutinação para o VORO (Figueiredo, 1999).

1.8.2 Dispersão Epidêmica

A febre do Oropouche tem sido descrita em diferentes locais e em intervalos variados. Entretanto, muitos surtos foram marcados por epidemias em incontáveis lugares pertencentes a uma determinada área geográfica em um curto espaço de tempo, o que demonstra uma grande capacidade de dispersão do VORO. De fato, esse fenômeno de difusão epidêmica foi observado em Bragança em 1967, Santarém nos anos de 1974 e 1975, em Belém e na área bragantina entre 1978 e 1980, onde foram acometidos 10 municípios paraenses, bem como no Estado de Rondônia em 1991. A dispersão do vírus, provavelmente, é resultado da movimentação de pessoas em fase virêmica pelas localidades, onde existem vetores transmissores e pessoas suscetíveis em grande quantidade, resultando nas epidemias, geralmente de caráter explosivo (Pinheiro *et al.*, 2004, Nunes *et al.*, 2005).

1.8.3 Distribuição Sazonal

A febre do Oropouche ocorre na temporada de chuvas nos meses de maior índice pluviométrico, que no caso do Estado do Pará e demais Estados da Amazônia Brasileira, correspondem aos meses de janeiro a junho (Pinheiro *et al.*, 2004). Entretanto, muitas epidemias tem se estendido até a temporada mais seca que vai de julho a dezembro, embora com menor intensidade. Essa característica sazonal provavelmente está relacionada à alta densidade da população do maruim durante os meses mais úmidos. Ademais, se observa que para a ocorrência de surtos e epidemias é fundamental a renovação de pessoas susceptíveis ao VORO. Geralmente o declínio das epidemias está associado com a chegada da época seca e à diminuição da densidade dos maruins e de indivíduos susceptíveis (Pinheiro *et al.*, 1981a).

1.8.4 Ciclos de transmissão

Estudos realizados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) sugerem que o VORO está perpetuado em natureza por meio de dois ciclos distintos: um ciclo urbano e outro silvestre (Figura 6) (Pinheiro *et al.*, 1981a).

No ciclo urbano ou epidêmico, o vírus é transmitido de pessoa a pessoa pela picada do inseto antropofílico *Culicoides paraensis*, vulgarmente conhecido na região Amazônica brasileira como “maruim”. O envolvimento do maruim como transmissor do vírus, sustenta-se em estudos experimentais que demonstraram a habilidade do *Culicoides paraensis*, após alimentar-se de sangue de pacientes virêmicos, em transmitir o VORO para os hamsters, após um intervalo de 5 ou mais dias de exposição (Pinheiro *et al.*, 1982a).

Além disso, os maruins têm hábitos diurnos atuando especialmente no fim da tarde e apresentam uma grande avidez por sangue humano. São tipicamente encontrados em alta densidade/quantidade durante períodos de epidemia. Eles se reproduzem principalmente em matéria orgânica em decomposição como troncos cortados de bananeiras, cascas de cacau e de cupuaçu, etc. (Hoch *et al.*, 1986), e detritos acumulados em depressões de árvores. São amplamente encontrados em áreas tropicais e subtropicais das Américas (Linley *et al.*, 1983).

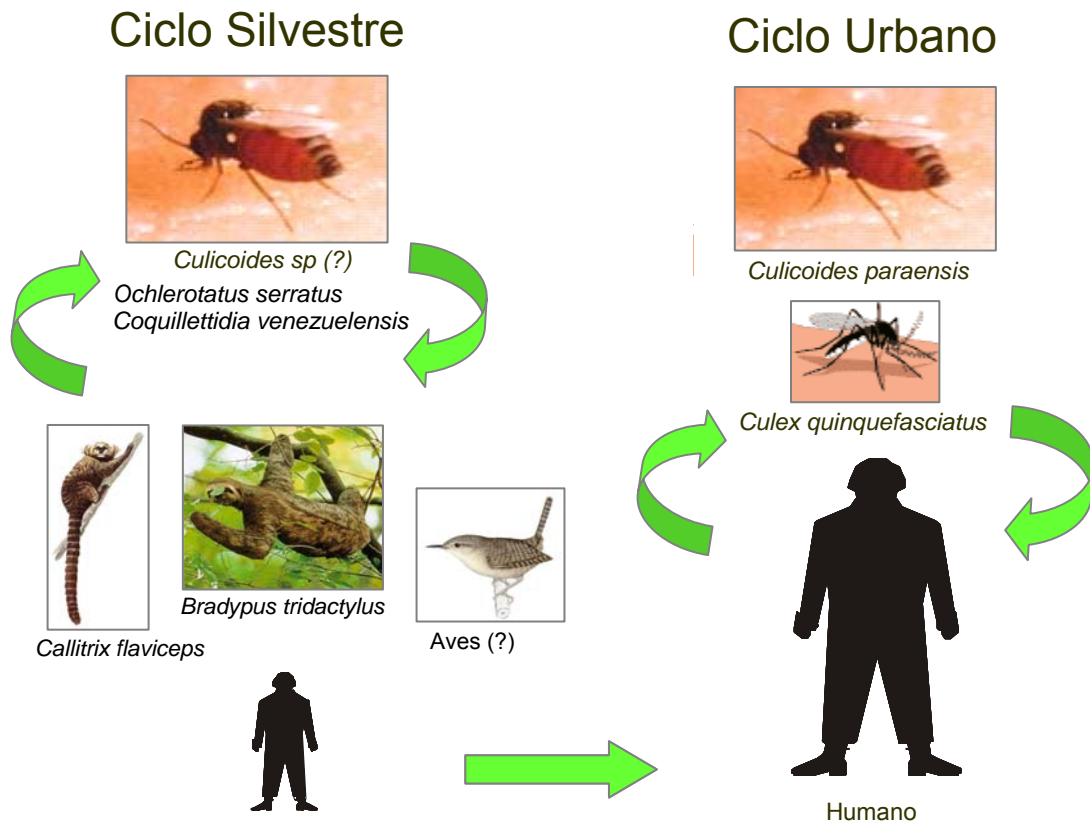


Figura 6 - Ciclos de manutenção do *Virus Oropouche*

Fonte: Adaptado de Pinheiro *et al.*, 1981a.

Em tentativas de transmissão do vírus entre hamsters por meio da picada do mosquito *Culex quinquefasciatus* (espécie comumente encontrada em áreas urbanas na Amazônia), foi demonstrado que a transmissão do VORO somente ocorria quando os níveis virêmicos eram muito altos, dificilmente encontrados em pessoas naturalmente infectadas (Pinheiro *et al.*, 1981b). Assim, esta descoberta praticamente excluiu as probabilidades do vetor epidêmico ser o *Culex quinquefasciatus*. Curiosamente a taxa de isolamento do vírus a partir de *Culicoides paraensis* durante períodos

epidêmicos é de apenas 1:12.500, o que sugere que o maruim possa ser um vetor de baixa eficiência (Leduc & Pinheiro, 1988).

Aparentemente o homem é o único vertebrado envolvido no ciclo urbano da virose; estudos com animais domésticos realizados durante diversos surtos excluíram o papel desses animais como amplificadores do vírus. (Pinheiro *et al.*, 1981a; Nunes *et al.*, 2005a)

No ciclo silvestre, silencioso, há evidências de que desdentados (preguiças), primatas não-humanos e possivelmente algumas espécies de aves silvestres, atuem como hospedeiros vertebrados (Pinheiro *et al.*, 1981^a; Nunes *et al.*, 2005b). O vetor ainda permanece desconhecido, no entanto falta investigar possível participação de maruins no ciclo silvestre do vírus (Pinheiro *et al.*, 2004).

O vínculo entre os dois ciclos provavelmente é o homem que adquirindo a infecção em áreas silvestres enzoóticas e a seguir retornando ao meio urbano em fase virêmica, serve de fonte de infecção para outros maruins, constituindo então uma cadeia de transmissão que resulta no desencadeamento de uma epidemia.

1.8.5. Período de incubação

Não se conhece ao certo a duração do período de incubação da febre do Oropouche, porém observações realizadas durante algumas epidemias sugerem que ele pode variar de quatro a oito dias. Dois técnicos de laboratório que foram infectados acidentalmente com o VORO apresentaram

sintomas da virose três e quatro dias após a provável infecção pela via respiratória (Pinheiro *et al.*, 1981a) .

1.8.6. Período de Transmissão

O sangue do paciente em fase aguda da doença é infectante para *Culicoides paraensis* nos primeiros três a quatro dias a partir do início dos sintomas quando a viremia é suficientemente alta para infectar os maruins. Estudos experimentais em hamsters dourados demonstraram que o período de incubação extrínseco é de cinco ou mais dias. Não foi demonstrado que o VORO seja transmitido diretamente de uma pessoa para outra (Pinheiro *et al.*, 1982a).

1.8.7. Incidência

Em geral, a estimativa das taxas de incidência é realizada através de inquéritos soropidemiológicos, nos quais grupos familiares são selecionados aleatoriamente; aplica-se um questionário clínico-epidemiológico aos membros de cada família, e coleta-se amostras de sangue para a detecção de anticorpos (neutralizantes, fixadores de complemento, inibidores de aglutinação e IgM), e nos casos febris para tentativas de isolamento em camundongos e em células VERO (Vasconcelos *et al.*, 1989; Pinheiro *et al.*, 2004).

Apesar de em algumas epidemias os valores da incidência não terem sido determinados, uma característica relevante da febre do Oropouche refere-se ao elevado número de pessoas infectadas nas epidemias até o momento descritas. Com efeito, a taxa de incidência média foi estimada em 30%. Em uma das epidemias a proporção de pessoas infectadas que desenvolveram quadros clínicos foi de 63% (Freitas *et al.*, 1982). Quanto ao sexo, as taxas de infecção pelo VORO são bastante variadas. Em 1979, na Zona Bragantina, nordeste do Estado do Pará, as pessoas do sexo feminino foram as mais infectadas já, por outro lado, no mesmo ano, em outra epidemia ocorrida em Belém, indivíduos do sexo masculino foram os mais afetados (Pinheiro *et al.*, 1981a). Na epidemia ocorrida em Santarém a proporção de mulheres infectadas foi duas vezes mais elevada que a obtida para homens. Em adição, a febre do Oropouche afeta grupos de todas as idades, embora em certos surtos, a incidência tenha sido maior em crianças e adultos jovens (Pinheiro *et al.*, 2004).

1.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

O primeiro estudo genético sobre o VORO foi realizado por Saeed e colaboradores (2000) e lançou as bases para o entendimento da epidemiologia molecular deste agente viral, sugerindo a existência de pelo menos três linhagens genéticas distintas circulantes nas Américas denominadas de genótipos I, II e III. Com base nos achados referentes ao sequenciamento nucleotídico do gene N (PRNA) de aproximadamente 30

cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros, localidades geográficas e períodos distintos, pode-se concluir que em Trinidad & Tobago, somente o genótipo I foi encontrado, enquanto que no Peru a linhagem descrita foi o genótipo II e no Panamá foi o genótipo III. No Brasil, dois dos três genótipos foram detectados, embora o genótipo I seja mais frequentemente encontrado no leste da Amazônia, enquanto o genótipo II no Oeste Amazônico (Saeed *et al.*, 2000).

Mais recentemente, no ano de 2000, uma cepa do VORO foi isolada de um novo hospedeiro vertebrado (*Callithrix sp*) no Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil, sendo esta cepa classificada como genótipo III, previamente encontrada somente no Panamá sugerindo um possível potencial de dispersão do VORO para regiões populosas e altamente susceptíveis (Nunes *et al.*, 2005b). A análise molecular de cepas adicionais isoladas durante epidemias ocorridas entre 2003 e 2006 nos municípios de Parauapebas, Porto de Moz e na região Bragantina, mais precisamente nos municípios de Igarapé Açu, Maracanã, Magalhães Barata e Viseu, demonstrou a co-circulação dos genótipos I e II e sua associação aos casos de Febre do Oropouche na região (Azevedo *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009).

1.9.1 Mecanismo de Evolução: Rearranjo Genético

O processo evolutivo dos vírus de RNA segmentado de polaridade negativa ocorre basicamente por três mecanismos: i) mutação; ii) rearranjo genético; e iii) recombinação genética (Gentsch & Bishop, 1976a;

Gentsch & Bishop, 1976b; Gentsch *et al.*, 1980; Bishop & Beaty, 1988; Pringle, 1996; Holland & Domingo, 1998; Schmaljhon & Hooper, 2001; Archer & Ricco-Hesse, 2002; Charrell *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2002).

Apesar de inúmeros estudos terem sido realizados, a contribuição efetiva de cada um desses mecanismos para a biogênese dos *Orthobunyavirus* ainda é desconhecida. O rearranjo genético entre membros da família *Bunyaviridae* tem sido experimentalmente demonstrado mediante estudos utilizando culturas celulares e hospedeiros artrópodes co-infectados, bem como pela análise de isolamentos virais obtidos em natureza (Bishop & Beaty, 1988; Beaty *et al.*, 1997; Borucki *et al.*, 1999; Bowen *et al.*, 2001). Com o aprimoramento das técnicas moleculares, tais como o desenvolvimento de protocolos específicos para amplificação de genomas pelo método de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida pela reação de transcrição reversa (RT-PCR), clonagem e sequenciamento nucleotídico; atualmente já é possível avaliar a possibilidade de casos de rearranjo genético ocorridos em natureza, sugeridos pela observação de pesquisadores que utilizaram a associação de dados epidemiológicos, ecológicos e antigênicos sobre esses vírus para inferirem suas conclusões (Nunes *et al.*, 2005 a).

De fato, o rearranjo de segmentos genômicos tem se mostrado um dos mais importantes mecanismos de geração de biodiversidade viral entre os orthobunyavírus, entre os quais podem ser citados os vírus do grupo C, que constituem um dos melhores modelos destinados ao estudo de rearranjo genético em natureza (Shope *et al.*, 1988; Nunes *et al.*, 2005b). Também o *Virus Jatobal* (VJAT) isolado de um marsupial (*Nasua nasua*) em Tucuruí no

ano de 1985 (Figueiredo & Travassos da Rosa, 1988), é fruto de rearranjo entre o VORO e um vírus do grupo Simbu ainda não identificado (Saeed *et al.*, 2001); e igualmente o *Virus Garissa* é um vírus que foi rearranjado do *Virus Ngari*, que por seu turno resulta de um rearranjo genético do VBUN e o *Virus Batai* (Gerrard *et al.*, 2005).

Nesses termos, o estudo do relacionamento antigênico do orthobunyavírus Oropouche, em suas bases genéticas, pode vir a explicar e contribuir para enriquecer o conhecimento sobre a epidemiologia molecular do VORO e o rearranjo viral em natureza como mecanismo de evolução deste importante agente viral.

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 Objetivo Geral

Descrever a epidemiologia molecular do VORO na Amazônia brasileira.

1.10.2 Objetivos Específicos

- ◆ Amplificar as sequências nucleotídicas dos segmentos PRNA (sequência completa) e MRNA (sequência parcial) do VORO proveniente de isolamentos de humanos, de artrópodes e de vertebrados silvestres.
- ◆ Realizar análise filogenética comparativa dos segmentos PRNA e MRNA obtidos para as cepas do VORO em estudo.
- ◆ Verificar a possibilidade de rearranjo genético entre diferentes cepas do VORO;
- ◆ Descrever o padrão de dispersão geográfica das linhagens genéticas (genótipos) do VORO no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEPAS DO VÍRUS OROPOUCHE UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS CIRCULANTES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

As sessenta e seis cepas do VORO utilizadas neste estudo (Quadro 2) foram gentilmente cedidas pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Para este estudo retrospectivo, a seleção das cepas foi realizada de forma aleatória, onde foram selecionadas cepas de VORO liofilizadas a partir de amostras isoladas em tecido nervoso de camundongos ou em cultivo de células VERO durante epidemias ocorridas desde a década de 1960 até setembro de 2009, onde primeiramente foi realizado um levantamento acerca dos isolamentos ocorridos no período, a fim de representar isolamentos do VORO obtidos de diferentes hospedeiros (humanos 57, artrópodes 03 e vertebrados silvestres 06), áreas geográficas e período de isolamento distinto.

Quadro 2 - Cepas do VORO utilizadas para o estudo genético, segundo o hospedeiro, local e ano de isolamento.

Cepa	Hospedeiro	Local de Isolamento	Ano
AR 19886	<i>Ochlerotatus serratus</i>	BR 14 Km 94 - PA	1960
AN 19991	<i>Bradypus trydactilus</i>	São Miguel do Guamá - PA	1960
H 29086	Humano	Belém – PA	1961
H 29090	Humano	Belém – PA	1961
H 121923	Humano	Bragança - PA	1967
AR 136921	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Belém – PA	1968
AN 206119	<i>Bradypus trydactilus</i>	Maracanã - PA	1971
AN 208402	<i>Bradypus trydactilus</i>	Maracanã - PA	1971
AN 208819	<i>Bradypus trydactilus</i>	Maracanã - PA	1971
AN 208823	<i>Bradypus trydactilus</i>	Maracanã - PA	1971
H 244576	Humano	Belém – PA	1973
H 271708	Humano	Santarém - PA	1975
H 355173	Humano	Ananindeua - PA	1978
H 355186	Humano	Tomé-Açu - PA	1978
H 356898	Humano	Belém-PA	1978
AR 366927	<i>Culicoides paraensis</i>	Belém - PA	1979
H 366781	Humano	Belém – PA	1979
H 384192	Humano	Portel – PA	1980
H 384193	Humano	Portel – PA	1980
H 385591	Humano	Belém – PA	1980
H 389865	Humano	Manaus - AM	1980
H 390242	Humano	Manaus - AM	1980

Quadro 2 - Cepas do VORO utilizadas para o estudo genético, segundo o hospedeiro, local e ano de isolamento. (continuação).

Cepa	Hospedeiro	Local de Isolamento	Ano
H 472433	Humano	Porto Franco - MA	1988
H 472435	Humano	Porto Franco- MA	1988
H 498913	Humano	Machadinho D'Oeste - RO	1990
H 504514	Humano	Santa Izabel - PA	1991
H 505764	Humano	Ariquemes- RO	1991
H 505768	Humano	Ariquemes- RO	1991
H 505805	Humano	Ariquemes- RO	1991
H 521086	Humano	Barra do Corda – MA	1993
H 532314	Humano	Serra Pelada – PA	1994
H 532422	Humano	Serra Pelada – PA	1994
H 532490	Humano	Serra Pelada – PA	1994
H 532500	Humano	Serra Pelada – PA	1994
H 541140	Humano	Altamira – PA	1994
H 543091	Humano	Xapuri - AC	1996
H 543100	Humano	Xapuri - AC	1996
H 543629	Humano	Oriximina - PA	1996
H 543638	Humano	Oriximina - PA	1996
H 543639	Humano	Oriximina-PA	1996
H 543733	Humano	Oriximina - PA	1996
H 543760	Humano	Oriximina - PA	1996
H 543857	Humano	Oriximiná – PA	1996
AN 622998	<i>Callithrix sp</i>	Arinos – MG	2000
H 669314	Humano	Parauapebas - PA	2003

Quadro 2 - Cepas do VORO utilizadas para o estudo genético, segundo o hospedeiro, local e ano de isolamento. (continuação).

Cepa	Hospedeiro	Local de Isolamento	Ano
H 669315	Humano	Parauapebas - PA	2003
H 682426	Humano	Porto de Moz - PA	2004
H 682431	Humano	Porto de Moz - PA	2004
H 708139	Humano	Magalhães Barata - PA	2006
H 707287	Humano	Magalhães Barata - PA	2006
H 708717	Humano	Maracanã - PA	2006
H 758687	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 758669	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759525	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759541	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759531	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759558	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759038	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759562	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759018	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759023	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759041	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759042	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759043	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759044	Humano	Mazagaõ - AP	2009
H 759483	Humano	Mazagaõ - AP	2009

Legenda: AC: Acre; AM: Amazonas; AN: animal; AP: Amapá; AR: artrópode; H: humano; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; RO: Rondônia.

2.2 PROPAGAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS

As cepas do VORO mantidas em ampolas liofilizadas foram inicialmente hidratadas com 0,5 mL de água destilada, em seguida diluídas em 0,5mL de PBS pH 7,2 e o volume de 0,02 mL foram inoculados pela via intracerebral (i.c) em camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) recém-nascidos (2 a 3 dias). Os animais foram observados diariamente e, quando apresentaram sinais de doença, foram coletados e mantidos a -70°C. Dos animais infectados, suspensões virais foram produzidas a partir dos cérebros de camundongos infectados macerados na proporção de 1:10 em PBS pH 7,2 contendo albumina bovina (BSA) a 0,75 %, estreptomicina (100µg / mL) e penicilina (100 U / mL); as suspensões foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e em seguida, os sobrenadantes foram cuidadosamente transferidos para tubos estéreis, objetivando a propagação viral em cultura celular.

2.3 PROPAGAÇÃO VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS VERO (CÉLULAS RENAIIS DE MACACO VERDE AFRICANO - *Cercopithecus aethiops*)

Frascos de 75 cm² estéreis foram utilizados para preparação de monocamada celular. A cada frasco, previamente lavado com solução de PBS estéril pH 7,4 contendo 5% de penicilina (100 mg/mL), foi adicionado o volume de 29 mL de meio MEM de crescimento enriquecido com SBF a 5%, L-

Glutamina 1% e antibióticos (penicilina e estreptomicina 1%) e 2% de NaHCO₃; e 1 mL de suspensão de células VERO, sendo os frascos posteriormente incubados a 37°C na presença de CO₂ durante 2-3 dias ou até a formação de uma monocamada celular confluenta. Após a formação da monocamada celular, o meio de crescimento foi completamente retirado dos frascos e, em seguida, as células foram infectadas com 100 mL de suspensão viral. Esses frascos foram incubados durante 1 hora a 37°C objetivando uma melhor adsorção dos vírus à monocamada celular. Após esse período, adicionou-se 10 mL de meio MEM de manutenção enriquecido com SBF a 2%, L-Glutamina 1% e solução de penicilina e estreptomicina a 1%, e 2% de NaHCO₃; os frascos foram então incubados a 37°C durante 2 a 5 dias ou até que 70 a 75% de efeito citopático (ECP) fosse observado nas culturas, quando então os sobrenadantes celulares contendo partículas virais foram coletados em tubos estéreis e usados para extração de RNA (Saeed *et al.*, 2000).

2.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA foi realizada utilizando o método do reagente Trizol LS (Invitrogen, EUA), conforme instrução do fabricante a partir do sobrenadante de células VERO infectadas com as cepas do VORO, seguindo-se então as etapas de lise celular, precipitação de RNA e hidratação do RNA.

Brevemente, em microtubo estéril de 1,5 mL o volume de 0,25 mL de sobrenadante de célula VERO infectada com os isolados do VORO foi adicionado a 0,75 mL de Trizol Ls. A mistura foi homogeneizada por agitação

mecânica (vórtex) durante quinze segundos, sendo em seguida incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente, adicionou-se o volume de 0,2 mL de clorofórmio absoluto ao tubo, agitando-o por quinze segundos (vórtex), e em seguida, incubando-o por dez minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 rpm por quinze minutos e, a fase aquosa (contendo o RNA), foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo estéril de 1,5mL (Figura 7).

Em etapa posterior, o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto à fase aquosa obtida na etapa anterior. Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante dez minutos a temperatura ambiente, e centrifugados por dez minutos a 12.000 rpm. O isopropanol foi retirado cuidadosamente com o auxílio de pipeta e, o volume de 1 mL de etanol 75% (diluído em água livre de RNase) imediatamente adicionado. O tubo foi centrifugado por cinco minutos a 7.500 rpm, e o conteúdo de etanol foi retirado por inversão. Finalmente, o precipitado (*pellet*) foi seco a temperatura ambiente em cabine biológica ou em concentrador a vácuo (Figura 7). O RNA extraído foi então hidratado com 20µL de água livre de RNase e armazenado a – 70°C ou imediatamente utilizado para a amplificação do genoma viral.

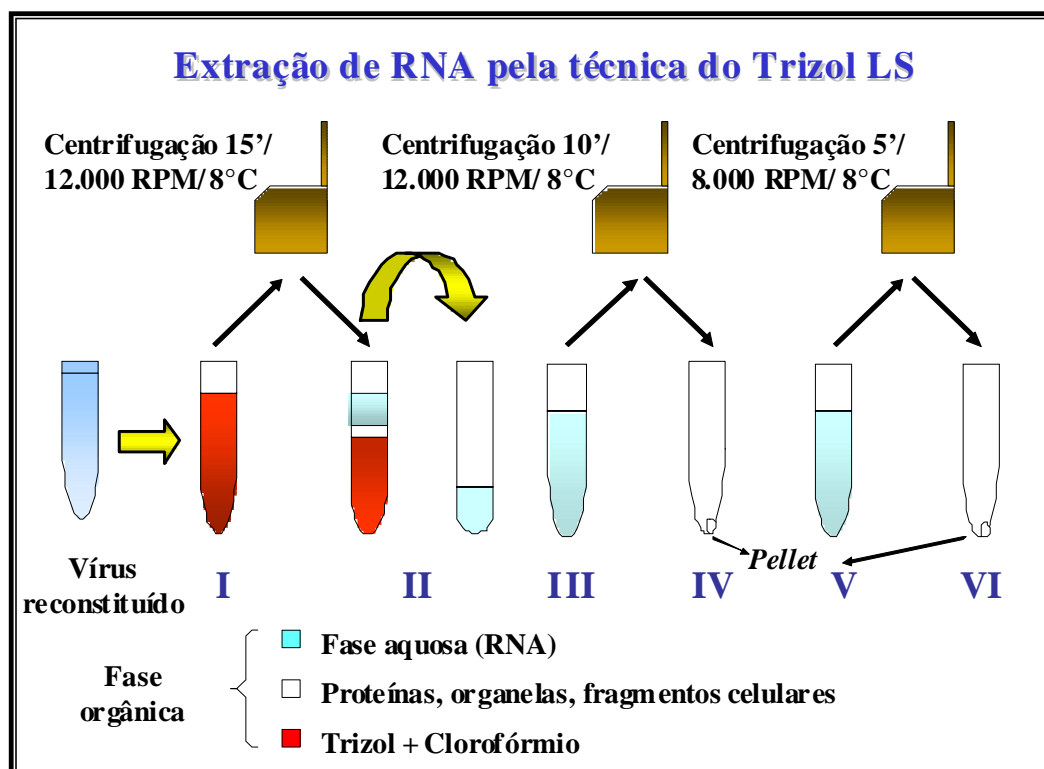


Figura 7 - Representação esquemática da técnica de extração de RNA pelo método do TRIZOL LS. Etapas: **I** - Adição de Trizol LS + Clorofórmio; **II** - Remoção da fase aquosa, sendo o RNA transferido para outro microtubo; **III** - Adição de isopropanol absoluto; **IV** - Remoção do isopropanol; **V** - Adição de etanol a 75%; **VI** - Remoção do etanol e reconstituição do *pellet*.

2.5 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT – PCR)

Os RNAs extraídos foram submetidos à técnica de RT-PCR em uma etapa (Dunn *et al.*, 1998; Aquino *et al.*, 2003) para amplificação do genoma do VORO utilizando iniciadores específicos para os segmentos PRNA

e mRNA capazes de se hibridizarem com os genes N (Saeed *et al.*, 2000) e Gn (este estudo).

As ampliações pelo método de RT-PCR foram realizadas em equipamento termociclador automático (Eppendorf, Alemanha) e ajustado para o volume final de 50 μ L contendo 5 μ L (1 - 5 ng) de RNA viral, 50 pmol de cada par de iniciador específico senso e complementar (Quadro 3) tampão de PCR 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCL 75 mM), $MgCl_2$ 2,5 mM, DTT 2,5 mM, 20 unidades (U) de enzima inibidora de RNase (RNasin RNase inhibitor, Invitrogen, EUA), 200 μ M de dNTPs (Invitrogen), 1 U da enzima transcriptase reversa (Superscript TM II Reverse Transcriptase, Invitrogen) e 1,125 U da enzima DNA polimerase (Platinum Taq DNA polimerase, Invitrogen). O RNA viral foi inicialmente transcrito reversamente por 65 minutos a 45°C, seguido por 35 ciclos de PCR cada um composto por etapas de desnaturação a 90°C por um minuto, hibridização dos iniciadores a 60°C (gene N) e 55°C (gene Gn) por dois minutos, e síntese a 72 °C por três minutos. Os produtos da RT-PCR foram então submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,2 % corado com brometo de etídio (5 μ g / mL), sendo visualizados em transiluminador com luz UV (Vilber Lourmat, EUA).

Quadro 3 - Iniciadores específicos utilizados para a amplificação das regiões correspondente aos genes N (PRNA) e Gn (MRNA).

Gene	Iniciador	Sequência (5' → 3')	Posição	Produto (pb)
N	ORO N5	AAAGAGGATCCAATAATGTCAGAGTTCATTT	10	693
	ORO N3	GTGAATTCCACTATATGCCAATTCCGAATT	703	
Gn	Gn 15S	GGCAACAAACAGTGACAAT	15	644
	Gn 659R	CTATGTTAACGCACATTGCT	659	

Legenda : pb : pares de base ; S : senso ; R : reverso; N5: complementar a região NCR 5'; N3: complementar a região 3' NCR.

2.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE RT-PCR

A purificação dos produtos de amplificação obtidos para os genes N e Gn foi realizada objetivando a otimização do processo de sequenciamento nucleotídico utilizando o protocolo do kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, EUA), no qual colunas de retenção à base de sílica foram usadas. Brevemente, as bandas visualizadas no gel de agarose foram retiradas com auxílio de estilete metálico, pesadas em balança digital e transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis. Posteriormente, adicionaram-se três volumes de tampão de dissolução (QG) ao tubo em relação ao peso da banda (3 µL de tampão QG para cada 1 mg de gel). Os tubos foram agitados vigorosamente e incubados a

60°C durante dez minutos ou até que a agarose fosse completamente dissolvida.

Após a completa dissolução da agarose, as amostras foram transferidas para tubos coletores contendo colunas de retenção com membrana de sílica e, em seguida centrifugadas por 30 segundos. O filtrado foi descartado, sendo repetido o passo anterior caso necessário. O volume de 500 µL de tampão de lavagem (PE) foi adicionado aos tubos, sendo estes em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 30 segundos. Posteriormente, as colunas foram transferidas do interior dos tubos coletores para tubos de 1,5 mL estéril e, a cada uma das colunas, adicionou-se o volume de 50 µL de tampão de eluição (EB) (Tris-HCL 10 mM pH 8,0) ou de água livre de RNase e DNase. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto para recuperar o DNA retido na coluna, que por fim foi armazenado a -20°C ou usado imediatamente para a reação de sequenciamento.

2.7 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Após a purificação dos produtos de amplificação, os DNA's foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico automático. Os produtos da RT-PCR purificados foram diretamente sequenciados, em ambos os sentidos, com os iniciadores específicos anteriormente descritos (Quadro 3) empregando o kit *ABI PRISM Dye Terminator v.3.1* (*Applied Biosystems*, EUA) e o método de terminação em cadeia (Sanger *et al.*, 1977). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático modelo ABI 3130 (*Applied Biosystems*).

2.7.1. Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi composta pela mistura de DNA viral amplificado (40-50 ng), 8 µl de tampão de reação contendo os dideoxynucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*terminator reaction mix*), 3,2 pmols dos iniciadores específicos senso ou reverso e água para volume final de 20µl. As reações foram processadas em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9700, *Applied Biosystems*) programado para realizar 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por dez segundos, hibridização dos iniciadores a 60°C (gene N) ou 55°C (gene Gn) por cinco segundos e síntese a 60°C por quatro minutos.

2.7.2 Precipitação da Reação de Sequenciamento

A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada pela adição de 40 µl de isopropanol a 65 % diluído em água livre de RNase aos tubos de PCR, sendo incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugados a 14.000 rpm durante 25 minutos a temperatura de 20°C. Posteriormente, o isopropanol foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pipeta e o volume de 150 µl de etanol a 60 % foi adicionado ao tubo. Nova etapa de centrifugação foi realizada durante cinco minutos a 14.000 rpm, objetivando a precipitação do DNA contendo os dideoxynucleotídeos marcados. Finalmente, o etanol foi removido com auxílio de uma pipeta, sendo os tubos secos a 90 °C durante três minutos para completa evaporação do etanol.

2.7.3. Eletroforese em Sequenciador Automático.

O DNA precipitado foi reconstituído em 20 uL formamida *high dye* (pH 7,0). Após ser submetido à etapa de choque térmico a 95°C por dois minutos, objetivando a quebra de estruturas secundárias que possam impedir a correta separação dos fragmentos de DNA marcados; o DNA reconstituído em formamida foi transferido para as placas do sequenciador e submetido à eletroforese em capilar de 30 cm. Para cada quatro amostras, a eletroforese em sequenciador automático foi realizada durante aproximadamente uma hora e meia, quando então os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos (diferença de um nucleotídeo entre cada fragmento), detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, e interpretados pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao passarem pela região de leitura ótica do sequenciador.

2.8 ANÁLISES E IDENTIFICAÇÕES DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Inicialmente as sequências nucleotídicas completas obtidas para o gene N e parciais para o gene Gn foram identificadas pelo programa BLAST (*Basic Local Aligning Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al.*, 1990). Posteriormente, as sequências nucleotídicas foram comparadas entre si e com

sequências de outras cepas do VORO disponíveis no *GenBank* utilizando o programa Clustal X (Thompson, 1998).

Em seguida, o pacote de programas *DNAstar lasergene*® (*DNAstar, Mega Align, Seqman, Genequest, Protean*) foi utilizado para avaliar as sequências quanto a presença de substituições nucleotídicas (nt) e de aminoácidos (aa).

2.9 ANÁLISES FILOGENÉTICA E EVOLUÇÃO

Árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*-NJ) (Saitou and Nei, 1987), máxima verossimilhança (*maximum likelihood*- ML) e máxima parcimônia (*maximum parsimony*- MP), usando o programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). O programa Modeltest versão 3.6 (Posada & Crandall, 1998), foi usado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica a ser utilizado para as sequências, segundo o critério de informação Akaike (CIA). Para o método de NJ, a matriz de distância foi calculada a partir das sequências alinhadas usando o modelo de Tamura-3 parâmetros e de distribuição gama (parâmetro de distribuição gama = 1). Para o método de MP, utilizou-se a razão de 4:1 para o número de mutações do tipo transição em relação ao número de mutações do tipo transversão. A análise de *Bootstrap* (1.000 réplicas) foi usada para dar confiabilidade aos agrupamentos filogenéticos (Felsenstein, 1985). Por fim, a análise Bayesiana empregando a cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada pelo programa MrBayes3.0b4 que foi programado para gerar dois

milhões de árvores, fixando uma amostragem a cada 1000 árvores geradas. As probabilidades posteriores Bayesianas foram estimadas a partir dos dados obtidos para 50% das árvores consenso geradas (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). O programa TRACER (www.evolve.zoo.ox.ac.uk) foi usado para verificar se as análises feitas pelo MrBayes alcançaram a convergência apropriada.

2.10 EVIDÊNCIA DE REARRANJO GENÉTICO

A evidência de rearranjo genético entre as cepas do VORO em estudo foi investigada utilizando o método de Kishino Hasegawa (Goldman *et al.*, 2000), no qual a topologia gerada para um dado segmento de RNA foi analisado em relação a topologia obtida para o outro segmento de RNA, sendo o valor de $p < 0,05$, estipulado para resultados estatisticamente significantes.

2.11 RELÓGIO MOLECULAR

Para as inferências moleculares em termos cronológicos, utilizaram-se as 66 sequências do estudo (Quadro 2), além de 30 sequências do gene N já sequenciadas anteriormente de cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros, localidades e períodos (Quadro 4- este quadro irá incluir as cepas do estudo e do *GenBank* com as informações de legenda, registro, ano de isolamento e, nº de acesso ao *GenBank*).

A análise foi realizada empregando a árvore de máxima probabilidade a posteriori gerada pelo programa BEAST. Uma cadeia de 25

milhões foi usada com amostragens fixadas a cada 1000 árvores geradas. O tempo de emergência viral foi estimado com base na data de isolamento da cepa, pela estimativa da taxa de substituição nucleotídica para o VORO. As idades dos ancestrais mais recentes (*most recent common ancestor*- ACMR) foram estimadas para os dados gerados usando o modelo de relógio molecular relaxado (exponencialmente não correlacionado) disponível no programa BEAST, que permitiu variação de taxas entre possíveis linhagens (Drummond *et al.*, 2006), implementados no programa BEAST (Drummond *et al.*, 2003). A idade do ACMR para todas as sequências incluídas na análise foi confirmada pelo método *piecewise Bayesian skyline plot* (Drummond *et al.*, 2005). Todas as estimativas foram baseadas no modelo de substituição nucleotídica GTR Γ 4.

Finalmente, as pressões seletivas gerais e pressões seletivas sítio-específicas agindo sobre os diferentes genótipos do VORO, foram estimadas pela razão das substituições nucleotídicas não sinônimas (dN) em relação às substituições sinônimas (dS) por sítio, empregando os métodos para um único ancestral comum (para todas as sequências) e para um grupo de 50 sequências. Nesse caso, o modelo de GTR foi utilizado e as árvores foram construídas pelo método de NJ (Kosakovsky *et al.*, 2005).

Quadro 4 – Cepas do VORO utilizadas para a determinação do Relógio Molecular de acordo com legenda, registro (das cepas), ano, local de isolamento, e número de acesso ao *GenBank*.

Legenda	Cepas	Ano	Local de isolamento	Nº de acesso ao <i>GenBank</i>
TR01	TRVL 9760	1955	Sangre Grande-TR	AF164531
PA01	AR 19886†	1960	BR 14 KM 94(Ipixuna) - PA	NR
PA02	AN 19991†	1960	São Miguel do Guamá - PA	AF164532
PA03	H 29086†	1961	Belém - PA	NR
PA04	H 29090†	1961	Belém - PA	NR
PA 05	H 121923†	1967	Bragança - PA	NR
PA06	AR 136921†	1968	Belém - PA	NR
PA07	AN 206119†	1971	Maracanã - PA	AY993909
PA08	AN 208402†	1971	Maracanã - PA	AY993910
PA09	AN 208819†	1971	Maracanã - PA	AY993911
PA10	AN 208823†	1971	Maracanã - PA	AY993912
PA11	H 244576†	1973	Belém - PA	NR
PA12	H 271708†	1975	Santarém - PA	NR
PA13	AR 271815	1975	Santarém - PA	AF164533
PA14	H 357173†	1978	Ananindeua - PA	NR
PA15	H 355186†	1978	Tomé-Açu - PA	NR
PA16	H 356898†	1978	Belém - PA	NR
PA17	AR 366917†	1979	Belém - PA	NR
PA18	H 366781†	1979	Belém - PA	NR
PA19	H 381114	1980	Belém - PA	AF164435
PA20	H 384192†	1980	Portel - PA	NR
PA21	H 384193†	1980	Portel - PA	NR
PA22	H 385591†	1980	Belém - PA	NR
AM01	H 389865†	1980	Manaus - AM	NR
AM02	H 390233	1980	Manaus - AM	AF154536
AM03	H 390242	1980	Manaus - AM	NR
MA01	AR 473358	1988	Porto Franco - MA	AF164539
MA02	H 472433†	1988	Porto Franco - MA	NR
MA03	H 472435†	1988	Porto Franco - MA	NR

Quadro 4 – Cepas do VORO utilizadas para a determinação do Relógio Molecular de acordo com legenda, registro (das cepas), ano, local de isolamento, e número de acesso ao *GenBank*. (continuação)

Legenda	Cepas	Ano	Local de isolamento	Nº de acesso ao <i>GenBank</i>
MA04	H 472200	1988	Porto Franco - MA	AF154537
MA05	H 472204	1988	Porto Franco - MA	AF164538
PA23	H 475248	1988	Tucuruí - PA	AF164540
PN01	GML444477	1989	Chame - PAN	AF164555
PN02	GML444911	1989	Chame - PAN	AF164556
PN03	GML445252	1989	San Miguelito - PAN -	AF164557
PN04	GML450093	1989	Chilibre - PAN	AF164558
RO01	H 498913†	1990	Machadinho D'Oeste - RO	NR
RO02	H 505442	1991	Ouro Preto D'Oeste - RO	AF164542
RO03	H 505663	1991	Ariquemes - RO	AF164543
RO04	H 505764†	1991	Ariquemes - RO	NR
RO05	H 505768†	1991	Ariquemes - RO	NR
RO06	H 505805†	1991	Ariquemes - RO	NR
PA24	H504514†	1991	Santa Izabel - PA	AF164541
PE01	IQT 1690	1992	Iquitos - PER	AF164549
MA06	H 521086†	1993	Barra do Corda – MA	AY704559
PE02	MDO 23	1993	Madre de Dios - PER	AF164550
PE03	DEI209	1993	Iquito - PER	AF164551
PA25	H 532314†	1994	Serra Pelada - PA	NR
PA26	H 532422†	1994	Serra Pelada - PA	NR
PA27	H 532490†	1994	Serra Pelada - PA	NR
PA28	H 532500†	1994	Serra Pelada - PA	NR
PA29	H 541140†	1994	Altamira - PA	NR
PA30	H 541863	1996	Vitória do Xingu - PA	AF164544
PA31	H 544552	1996	Altamira - PA	AF164546
PA32	H 543033	1996	Oriximiná - PA	AF164545
AC01	H 543091†	1996	Xapuri - AC	NR
AC02	H 543100†	1996	Xapuri - AC	NR
AC03	H 543087	1996	Xapuri -AC	AF164547
PA33	H 543618	1996	Oriximina - PA	AF164548
PA34	H 543629†	1996	Oriximina - PA	NR

Quadro 4 – Cepas do VORO utilizadas para a determinação do Relógio Molecular de acordo com legenda, registro (das cepas), ano, local de isolamento, e número de acesso ao *GenBank*. (continuação)

Legenda	Cepas	Ano	Local de isolamento	Nº de acesso ao <i>GenBank</i>
PA35	H 543638†	1996	Oriximina - PA	NR
PA36	H 543639†	1996	Oriximina - PA	NR
PA37	H 543733†	1996	Oriximina - PA	AY704560
PA38	H 543760†	1996	Oriximina - PA	NR
PA39	H 543857†	1996	Oriximina - PA	NR
PA40	H 543880	1996	Oriximina - PA	NR
PE04	IQT 4083	1997	Iquitos - PER	AF164552
PE05	Iquitos 1-812	1998	Iquitos - PER	AF164553
PE06	IQT7085	1998	Iquitos - PER	AF164554
MG01	AN 622998 †	2000	Arinos – MG	AY117135
TO01	H 622544	2002	Paraná - TO	EF467368
PA41	H 669314†	2003	Parauapebas - PA	EF467370
PA42	H 669315†	2003	Parauapebas - PA	EF467369
PA43	H 682426†	2004	Porto de Moz - PA	EF467371
PA44	H 682431†	2004	Porto de Moz - PA	EF467372
PA45	H 706890†	2006	Igarapé Açu - PA	NR
PA46	H 706893	2006	Igarapé Açu - PA	NR
PA47	H 708139†	2006	Magalhães Barata - PA	NR
PA48	H 707157	2006	Maracanã - PA	NR
PA49	H 707287†	2006	Magalhães Barata - PA	NR
PA50	H 708717†	2006	Maracanã - PA	NR
AP01	H 758687†	2009	Mazagão - AP	NR
AP02	H 758669†	2009	Mazagão - AP	NR
AP03	H 759525†	2009	Mazagão - AP	NR
AP04	H759541†	2009	Mazagão - AP	NR
AP05	H 759531†	2009	Mazagão - AP	NR
AP06	H 759558†	2009	Mazagão - AP	NR
AP07	H 759038†	2009	Mazagão - AP	NR
AP08	H 759562†	2009	Mazagão - AP	NR
AP09	H 759018†	2009	Mazagão - AP	NR

Quadro 4 – Cepas do VORO utilizadas para a determinação do Relógio Molecular de acordo com legenda, registro (das cepas), ano, local de isolamento, e número de acesso ao *GenBank*. (continuação)

Legenda	Cepas	Ano	Local de isolamento	Nº de acesso ao <i>GenBank</i>
AP10	H 759023†	2009	Mazagão - AP	NR
AP11	H 759041†	2009	Mazagão - AP	NR
AP12	H 759042†	2009	Mazagão - AP	NR
AP13	H 759043†	2009	Mazagão - AP	NR
AP14	H 759044†	2009	Mazagão - AP	NR
AP15	H 759483†	2009	Mazagão - AP	NR

Legenda: † - Amostras que foram inoculadas, extraídas e sequenciadas para este estudo NR- Cepas do VORO deste estudo ainda não registradas no *GenBank*

3 RESULTADOS

3.1 RECONSTITUIÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CULTURA DE CÉLULAS VERO

As 66 amostras de isolamentos do VORO (Quadro 2) selecionadas para este estudo foram inoculadas em cultura de células VERO, onde se replicaram e produziram ECP. O início do ECP tornou-se visível em torno do 5º dia de infecção e quando as células apresentaram 75% de ECP (em torno do 10º dia), os sobrenadantes foram coletados e a monocamada de célula infectada utilizada para a confirmação da infecção; algumas cepas não apresentaram ECP provavelmente porque o título viral estava muito baixo ou por alguma modificação genotípica que será estudada futuramente, mas mesmo assim foram coletadas no 14º dia que é tempo máximo de espera e apresentaram o genoma do vírus.

3.2 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA RT-PCR PARA OS SEGMENTOS P-RNA E M-RNA.

As 66 cepas do VORO estudadas neste trabalho tiveram o gene N (PRNA) completamente amplificado utilizando os pares de iniciadores ORON5 e ORON3 (Saeed *et al.*, 2000) e, dessas, 35 tiveram parcialmente amplificados seus segmentos MRNA ao nível do gene Gn (usando os iniciadores Gn 15S e Gn 659R). A análise eletroforética em gel de agarose

evidenciou fragmentos de aproximadamente 700 pb para o gene N, enquanto que para os produtos de RT-PCR obtidos para o gene Gn o tamanho obtido foi de aproximadamente 644 pb.

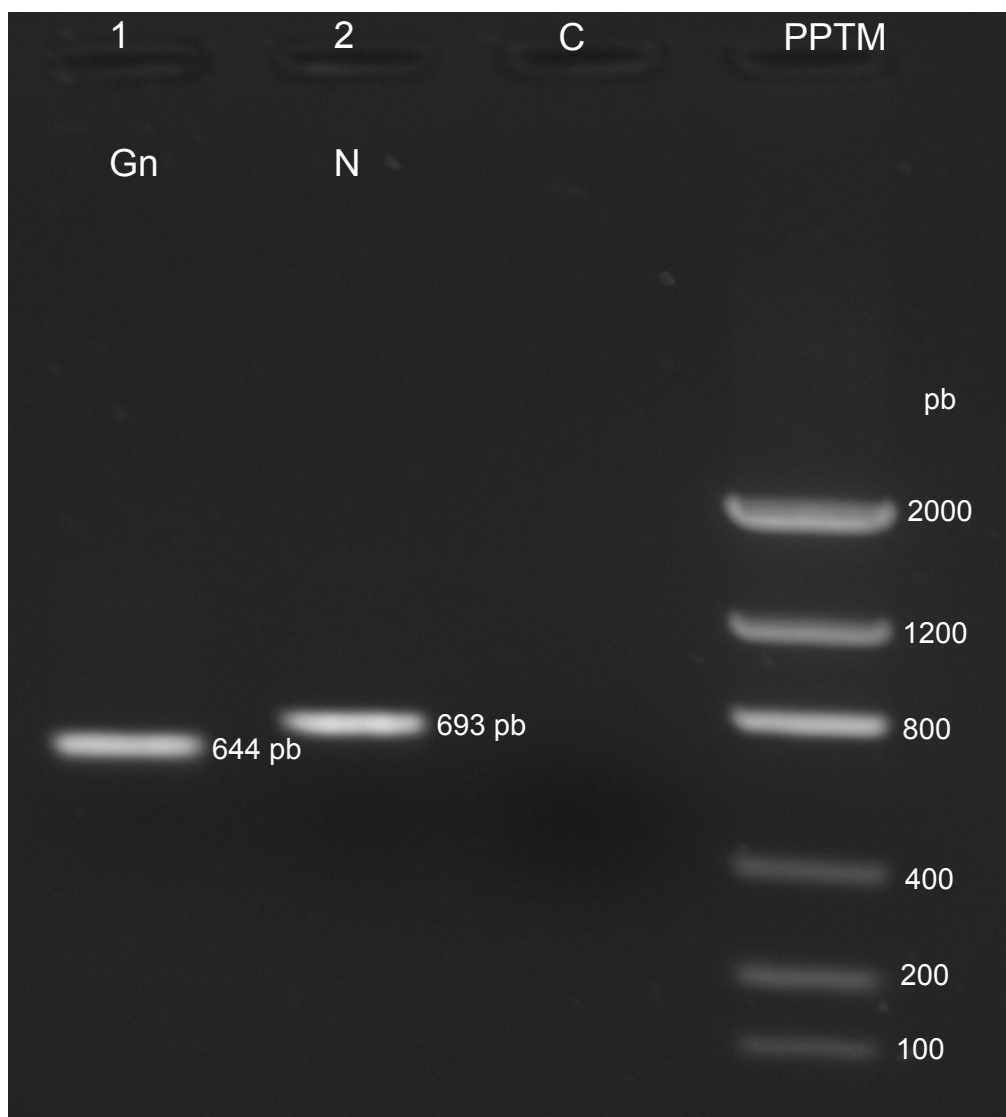


Figura 8 - Visualização dos produtos de RT-PCR para os genes Gn (1) e N (2) em gel de agarose a 1,2% para as diferentes cepas do VORO. CN: controle negativo (amostra de sobrenadante de células VERO não infectadas); PPTM: padrão de peso e tamanho molecular *Low DNA mass* (Invitrogen); pb: pares de bases.

3.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas para os isolamentos do VORO foram identificadas pelo programa BLAST como sequências completas do gene N (n=66) e parciais do gene Gn (n=35) com tamanhos de 693 nt e 644 nt, respectivamente. Posteriormente, a análise comparativa por múltiplo alinhamento evidenciou o alto grau de similaridade genética entre as cepas incluídas no estudo. Para o gene N, observou-se percentual de homologia nucleotídica e aminoacídica variando de 92,9% a 99,9% nt e de 95,2% a 100% aa, respectivamente. Para o gene Gn, os valores percentuais de identidade nucleotídica e aminoacídica variaram de 90,5% a 99,1% nt e de 93% a 100% aa, respectivamente.

A análise realizada pelo programa Mega 4.0 (Kumar *et al.*, 2008) para o gene N revelou uma divergência genética média de 6,8% para as sequências incluídas no estudo. A divergência genética entre os genótipos I, II e III variou de 3,0% (entre os genótipos I e II) a 4,4% (entre os genótipos I e III) com média de 3,5%. O valor médio de divergência genética observada entre os genótipos I, II e III (3,5%), foi usado como valor de confiabilidade para inclusão das cepas do VORO em grupos filogenéticos, e assim estabeleceu-se um quarto genótipo denominado de genótipo IV. Este apresentou divergência genética com os demais genótipos do VORO que variou de 5,3% (entre I e IV) e 6,8% (entre III e IV) com média de 5,8%. Assim a média da divergência

genética entre os quatro grupos filogenéticos foi determinada em 4,6% (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual de divergência genética entre os genótipos do VORO para as sequências completas do gene N.

Genótipos	I	II	III	IV
I	-			
II	3,0%	-		
III	4,4%	3,0%	-	
IV	5,3%	5,3%	6,8%	-
MDGIG	IV em relação a I,II e III	5,8%		
	I, II e III	3,5		
	I,II,III e IV	4,6%		

Legenda: MDGIG: média da divergência genética intergrupo.

Em relação ao gene Gn, a mesma análise revelou valores de divergência genética entre 0,9% e 9,5% com média de 6,5%. Três grupos filogenéticos foram identificados com divergência intergrupo que variou de 4,5% (entre os genótipos I e II) a 7,2% (entre os genótipos I e III) com média de 5,7%, sendo este percentual utilizado como valor de confiabilidade para determinação dos grupos filogenéticos (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de divergência genética entre os genótipos do VORO para as sequências parciais do gene Gn.

Genótipos	I	II	III
I	-		
II	4,5%	-	
III	7,2%	5,6%	-
MDGIG	IV em relação a I,II e III	5,7%	

Legenda: MDGIG: média da divergência genética intergrupo.

Em relação às frequências dos pares nucleotídicos para as sequências do VORO (gene N; 693 nt), a média de 28% (n= 194) de mutações foram observadas, das quais 21% (n=145) foram classificadas como transições e 7% (n:49) como transversões. Dentre as 145 mutações do tipo transição, sete (5%) ocorreram ao nível do primeiro códon, sete (5%) ao nível do segundo códon, e 131 (90%) ao nível do terceiro códon. A razão média entre mutações do tipo transição (Si) em relação às transversões (Sv) foi de 2,8 com valores de si/sv de 0,7, 3,1 e 3,6 para mutações que ocorreram ao nível do primeiro, segundo e terceiro códons, respectivamente.

Para o gene Gn (500 nt), observou-se a média de 120 mutações (24%), das quais 95 (79,1%) foram identificadas como Si e 25 (20,9%) como Sv. Dentre as mutações Si, 80 (84,2%) ocorreram ao nível do primeiro códon, enquanto que 5 (5,3%) e 10 (10,5%) ocorreram ao nível do segundo e terceiro códons, respectivamente. Para as mutações do tipo Sv, 15 (60%) ocorreram no primeiro códon, cinco (20%) ao nível do segundo e cinco (20%) no terceiro. A razão média Si/Sv foi de 4,3 com valores de 5,6, 2,6 e 1,7 obtidos para a razão Si/Sv para mutações que ocorreram ao nível do primeiro, segundo e terceiro códons, respectivamente.

3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

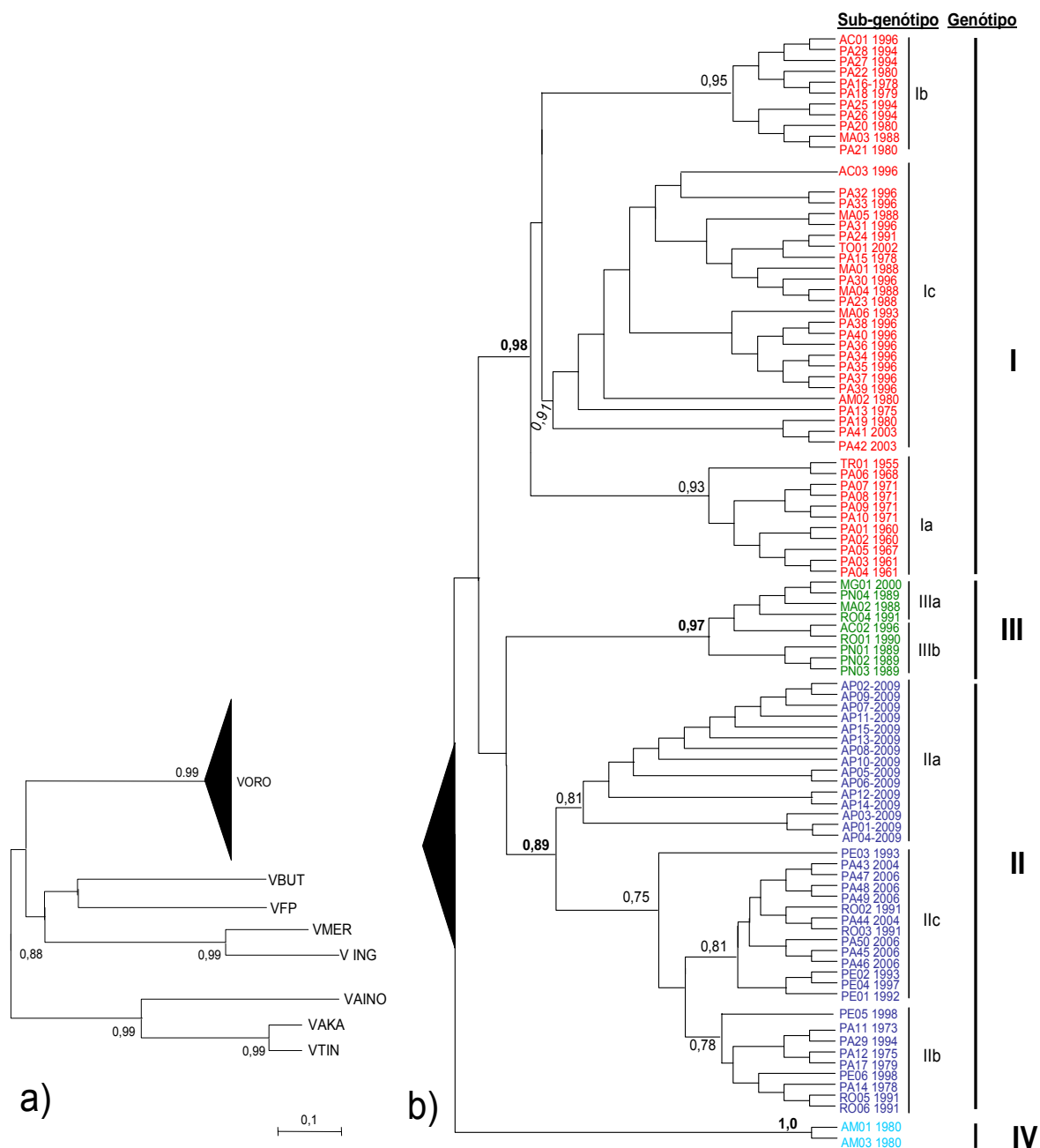
As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de NJ, MP, MV e Bayesiano utilizando o modelo de substituição nucleotídica indicado pelo programa Modeltest (Posada, 1998). Independente do método utilizado, as topologias apresentadas foram semelhantes mostrando valores de suportes (percentual de *bootstrap* ou valores Bayesianos) confiáveis. No entanto, a árvore construída pelo método Bayesiano mostrou valores relativamente mais confiáveis, sendo esta, portanto, utilizada para representar a filogenia para as cepas do VORO deste estudo.

Em relação ao gene N, A análise filogenética comparativa realizada para as 96 cepas virais de Oropouche (66 deste estudo e 30 obtidas diretamente do *GenBank*) (Quadro 4), evidenciou que o VORO constitui um grupo monofilético, ou seja, são isolamentos de vírus que compartilham ou

foram originados de um ancestral comum; dentro do grupo Simbu os isolamentos do VORO se mostraram geneticamente mais relacionados ao *Virus Buttonwillow* (VBUT), um membro deste grupo que foi isolado nos EUA (Figura 9).

As cepas do VORO foram distribuídas em quatro grupos filogenéticos principais denominados I, II, III e IV que correspondem aos diferentes genótipos do vírus (Figura 9a).

O genótipo I incluiu cepas brasileiras oriundas dos Estados do Acre, Amazonas, Maranhão e Pará, bem como isolados de Trinidad & Tobago, e foi subdividido em três subgenótipos denominados Ia, Ib e Ic (Figura 9b). O genótipo II, por sua vez, incluiu cepas brasileiras isoladas nos Estados do Amapá, Pará e Rondônia, bem como cepas isoladas no Peru, sendo as mesmas também agrupadas em três subgenótipos (II-a, II-b e II-c). O genótipo III incluiu cepas brasileiras dos Estados do Acre, Maranhão, Minas Gerais e Rondônia, e também do Panamá, sendo subdividido em dois subgenótipos (III-a e III-b). O genótipo IV incluiu cepas brasileiras do VORO isoladas no Estado do Amazonas (Figura 9b).



(Figura 9 a) análise filogenética comparativa entre o VORO e diferentes vírus pertencentes ao grupo Simbu (VAINO: *vírus Aino*; VAKA: *vírus Akabane*; VTIN: *vírus Tinaroo*; VBUT: *vírus Buttonwillow*; VFP: *virus Facey's Paddock*; VMER: *vírus Mermet*; VING: *vírus Ingwavuma*). **(b)** Filogenia comparativa para o gene N de 96 cepas do VORO. Valores indicados acima de cada nó principal da árvore correspondem aos valores Bayesianos de suporte aos grupos filogenéticos. O valor da barra corresponde a 10% de divergência genética entre as cepas virais. Legenda: AC; Acre; AM: Amazonas; AP: Amapá; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PE: Peru; PN: Panamá; RO: Rondônia; TO: Tocantins; TR: Trinidad & Tobago.

3.5 ANÁLISE DE REARRANJO GENÉTICO

Os resultados obtidos pela análise das sequências nucleotídicas parciais do gene Gn (MRNA) para 35 cepas do VORO, evidenciou diferenças topológicas entre as árvores filogenéticas construídas para os segmentos PRNA (gene N) e MRNA (gene GN) (Figura 10). Com efeito, das 20 cepas identificadas como pertencentes ao genótipo I pelo gene N (PRNA), 17 (85%), mantiveram-se como membros do genótipo I pelo gene GN (MRNA), duas (10%) cepas agruparam-se no genótipo II e apenas uma (5%) cepa agrupou-se com cepas pertencentes ao genótipo III. Dentre as cepas identificadas como genótipo II pelo gene N (PRNA) (n= 9) oito (89%) agruparam-se no genótipo I e uma (11%) no genótipo III. Em relação ao genótipo III, das cinco cepas identificadas pelo segmento P, uma (20%) foi classificada como genótipo I, duas (40%) como genótipo II e duas (40%) permaneceram como genótipo III (Figura 10). Dentre as duas cepas identificadas como genótipo IV pelo gene N (PRNA), apenas uma foi analisada quanto à topologia para o gene GN (MRNA) sendo a mesma reclassificada como genótipo I (Tabela 3). A análise pelo método de MV mostrou que, independente do modelo evolutivo selecionado, as topologias geradas para um determinado segmento genômico foram significativamente mais prováveis do que a topologia competitiva utilizando o outro segmento ($p < 0,001$). Esses resultados indicaram que as topologias obtidas para os genes N (PRNA) e GN (MRNA) foram diferentes, sugerindo que cada segmento de RNA apresentou uma história evolutiva diferente (Figura 10).

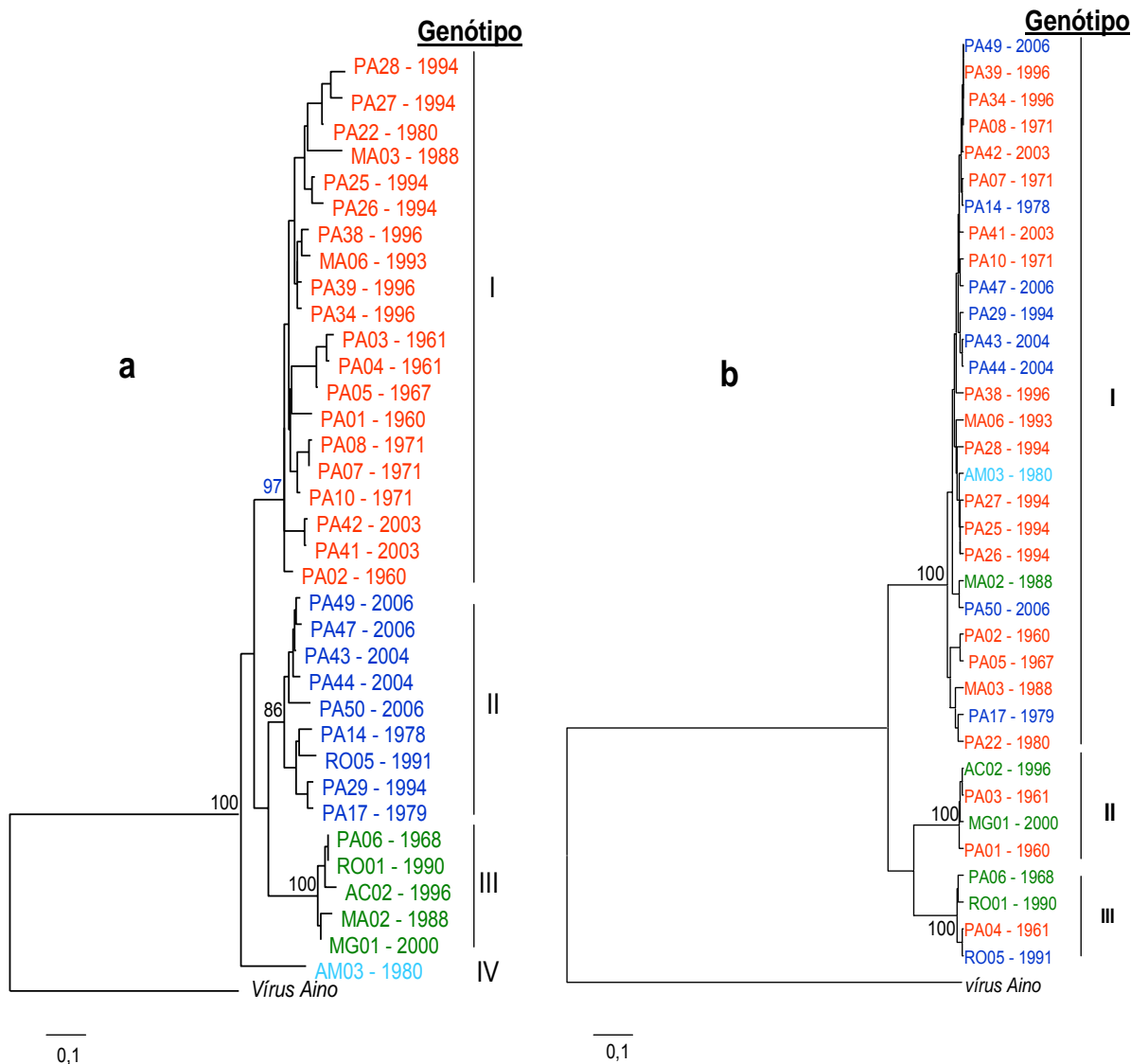


Figura 10 – Filogenia do VORV para os segmentos N(PRNA) (**a**) e GN (MRNA) (**b**). Valores de *bootstraps* obtidos para os métodos de MP e NJ. Os números exibidos nas barras em **a** e **b** representam 10% de divergência nucleotídicas, respectivamente e o *virus Aino* foi usado como grupo externo. Para N(PRNA) (**a**) isolados do genótipo I aparecem em vermelho, os do genótipo II estão em azul escuro, do genótipo III em verde e genótipo IV em azul claro. Para GN (MRNA) (**b**) os isolados que representam rearranjo genético aparecem grupados em genótipos diferentes.

Legenda: AC; Acre; AM: Amazonas; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; RO: Rondônia;

Tabela 3.- Distribuição dos genótipos de VORO de acordo com o percentual de rearranjo genético entre os genes N (PRNA) e GN (MRNA).

GENÓTIPOS (análise do gene N)	Cepas estudadas simultaneamente (genes N e Gn)	Cepas sem alteração de genótipo (Gene Gn em comparação ao gene N)	Cepas com troca de genótipo (rearranjo genético no gene Gn)
Gen I	20	17 (85%)*	2 GnII; 1 Gn III
Gen II	9	0(0) *	8 Gn I; 1 Gn III
Gen III	5	2(40%)*	2 Gn II; 1 Gn I
Gen IV	1	0(0) *	1 Gn I

Legenda: * Nos parênteses observam-se os percentuais

3.6 RELÓGIO MOLECULAR

Objetivando investigar o período temporal de emergência do VORO nas Américas, utilizou-se a análise cronológica, onde taxas evolucionárias e a data de divergência foram estimadas pelo método Bayesiano de coalescência. A taxa de substituição nucleotídica levando em consideração as 96 cepas do VORO foi determinada em $3,7 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano e utilizada para estimar as datas de divergência entre as cepas.

O ancestral recente mais comum (ARMC) do VORO, segundo os cálculos realizados pelo método de relógio molecular, emergiu há cerca de 223,6 anos do qual divergiram os ancestrais que deram origem ao vírus

parental comum dos genótipos I, II, III e IV (Figura 11). Com base nas datas de emergência estimadas, sugere-se que o genótipo I do VORO tenha sido o primeiro a emergir na Amazônia brasileira há cerca de 113 anos, mais precisamente na região leste do Estado do Pará na qual se incluem os municípios de Belém, Bragança e Maracanã, emergindo quase que concomitantemente em Trinidad & Tobago, dispersando-se posteriormente para a região oeste da Amazônia brasileira e, mais recentemente, para os estados do Acre, Maranhão e Tocantins. O genótipo II emergiu em seguida com o ancestral mais recente datando de 91 anos atrás e que originou tanto as cepas isoladas nos estados do Pará e Rondônia, quanto no Peru, bem como as recentemente isoladas no Estado do Amapá em 2009. O genótipo III tem sua origem estimada em aproximadamente 37 anos e se originou provavelmente no Estado de Rondônia (33 anos atrás), dispersando-se posteriormente para outros estados amazônicos como Acre e Pará, e emergindo quase que concomitantemente no Panamá (32 anos atrás) e, mais recentemente, No Estado de Minas Gerais. O genótipo IV emergiu no Estado do Amazonas há aproximadamente 43 anos (Figura 11).

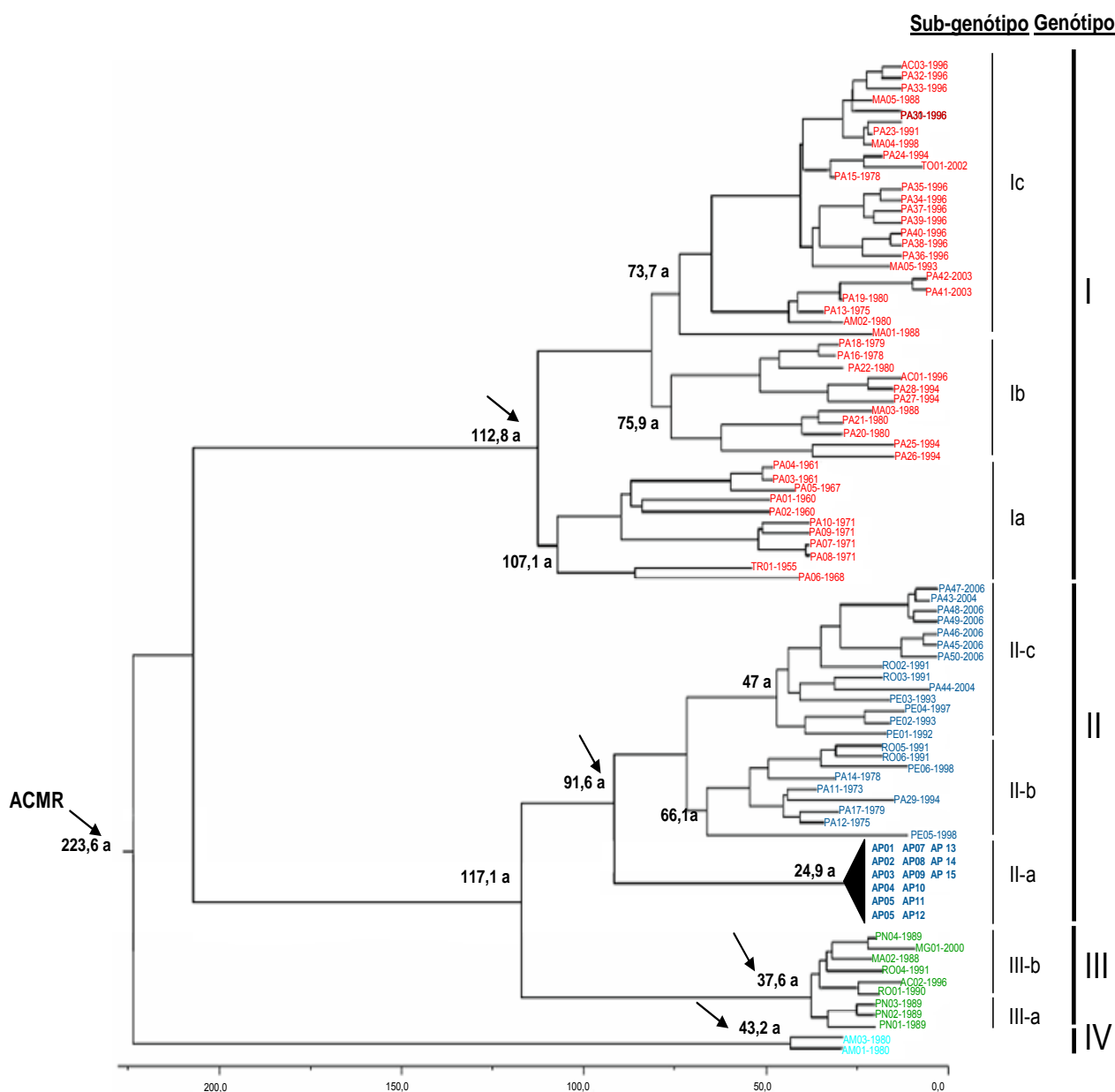


Figura 11 - Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa do gene N (693 nt) de 96 cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros, localidades e períodos. Os grupos filogenéticos principais encontram-se representados pelos genótipos (I, II, III e IV). Valores acima dos nós principais representam as datas de emergência dos ancestrais comuns expressos em anos em relação à data atual (ano de 2009). As setas indicam a data provável para emergência dos genótipos I, II, III e IV. ACMR: ancestral comum mais recente. Os valores numéricos existentes na barra representam a escala temporal de datação molecular.

Legenda: AC; Acre; AM: Amazonas; AP: Amapá; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; PE: Peru; PN: Panamá; RO: Rondônia; TO: Tocantins; TR: Trinidad & Tobago.

3.7 DISPERSÃO GEOGRÁFICA DOS GENÓTIPOS DO VORO

Com base nos resultados obtidos pelo relógio molecular foi possível determinar as prováveis rotas de dispersão dos diferentes genótipos do VORO, a partir das datas de emergência estimadas, e da detecção de surtos e epidemias de febre do Oropouche, ocasião em que isolados do VORO foram obtidos e que foram ou estão descritos neste estudo (Figura 12), como segue: (i) O Genótipo I (que aparece dispersando-se em vermelho), foi originalmente isolado no Brasil em Ipixuna no Estado do Pará (Rodovia BR 010, km 94), daí dispersou-se de forma contínua e em diferentes direções: inicialmente para vários municípios do oeste do Estado do Pará, e ao mesmo tempo para Trinidad & Tobago, posteriormente para o Estado do Amazonas (atingindo três municípios) e Estado do Acre (um município), e mais recentemente foi isolado em municípios do leste do Estado do Pará e nos Estados do Maranhão e Tocantins; (ii) O Genótipo II (que aparece dispersando-se em azul escuro), aparentemente emergiu concomitantemente nos Estados do Amapá, Pará e Rondônia, assim como no Peru e dispersou-se nesses locais, sendo neste ano de 2009 detectado em Mazagão no Estado do Amapá; (iii) O Genótipo III (que aparece dispersando-se em verde), emergiu no Estado de Rondônia, seguindo uma rota para o Panamá e outra para os Estados do Acre e Maranhão, e deste último, uma nova rota levou-o para o Estado de Minas Gerais; (iv) O Genótipo IV (ponto azul claro em Manaus), que aparentemente é mais antigo que o genótipo III (figura 11), emergiu no Estado do Amazonas, no município de Manaus, donde aparentemente não se dispersou (figura 12).

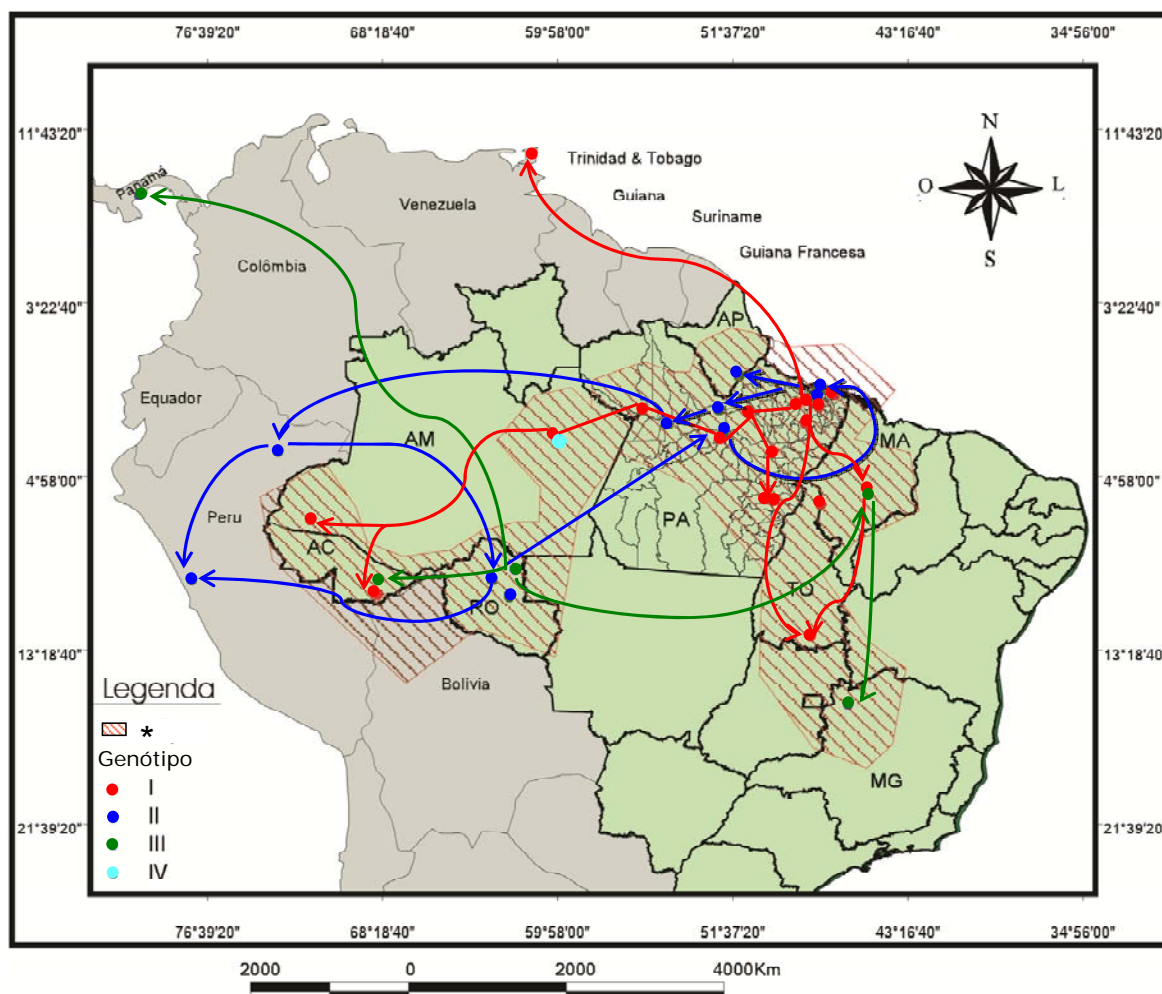


Figura 12 – Dispersão geográfica dos genótipos do VORO nas Américas entre os anos de 1955 e 2009.

Legenda: AC: Acre; AM: Amazonas; AP: Amapá; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PA: Pará; RO: Rondônia; TO: Tocantins; * Área de abrangência do VORO no Brasil

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Laboratório de Geoprocessamento/IEC/SVS/MS

4 DISCUSSÃO

Entre os anos de 1955 e 2009, dezenas de epidemias de Febre do Oropouche foram registradas em diferentes regiões tropicais das Américas. De fato, milhares de casos de doença febril aguda foram atribuídos a infecção pelo VORO, sendo também diagnosticados casos de meningite causados pelo VORO (Pinheiro, 1983). Na Amazônia Brasileira, desde a grande epidemia ocorrida em Belém no início da década de 1960 (Pinheiro *et al.*, 1962), o VORO vem demonstrando seu potencial epidêmico refletido em mais de 30 epidemias que acometeram centenas de milhares de pessoas e atingiu uma ampla área geográfica, inicialmente restrita ao Estado do Pará (entre 1960 e 1980), dispersando-se nas décadas seguintes para outros estados da Amazônia e para outros países da América Latina como o Peru, Trinidad & Tobago e Panamá (Pinheiro *et al.*, 1981, Azevedo *et al.*, 2007, Vasconcelos *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento de métodos moleculares Saeed e colaboradores (2000), descreveram a diversidade genética do VORO e contribuíram significativamente para o melhor entendimento do relacionamento filogenético entre as diferentes cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros (vertebrados e invertebrados), regiões geográficas e anos de isolamento. Nesse estudo envolvendo 28 cepas virais, três genótipos foram descritos e denominados de I, II e III. Segundo esses estudos dois genótipos (I e II) foram detectados no Brasil, sendo o genótipo I predominante na região leste da Amazônia enquanto que o genótipo II, predominante no Peru, foi detectado apenas no Estado de Rondônia nos municípios de Ouro Preto D'oeste e Ariquemes. O genótipo III, por sua vez, nesse estudo restringiu-se ao

Panamá, na América Central (Saeed *et al.*, 2000).

Os dados obtidos neste estudo com o sequenciamento completo do gene N de 66 outras cepas do VORO (Quadro 2) promoveram um melhor entendimento a respeito da epidemiologia molecular do VORO, onde a análise comparativa por métodos filogenéticos confirmou a existência dos três genótipos previamente descritos (Saeed *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2005b), bem como identificou a existência de um novo genótipo denominado de genótipo IV. A análise ainda mostrou que o VORO de fato constitui uma linhagem monofilética quando comparado com outros vírus do grupo Simbu conforme descrito previamente por Saeed e colaboradores (2000), sendo geneticamente mais relacionado ao VBUT isolado nos EUA em 1962. Ademais, observou-se claramente que o VORO, ao longo do tempo, segregou-se dando origem a 8 diferentes sublinhagens genéticas, aqui reconhecidas como subgenótipos (genótipo I: 3 subgenótipos; genótipo II: 3 subgenótipos; genótipo III: 2 subgenótipos) evidenciando que o VORO apresenta grande diversidade genética (Figura 9).

Quanto ao padrão de distribuição geográfica do VORO, os dados obtidos confirmaram a extensa área de abrangência do vírus na Amazônia brasileira. Em relação aos seus genótipos, no Brasil, o genótipo I, apesar de ocorrer em grande área, permaneceu restrito à Amazônia, mais precisamente nas Regiões Norte (estados do Pará, Amazonas, Acre e Tocantins) e Nordeste (Maranhão). As análises ainda revelaram a detecção do genótipo II no Estado do Pará (municípios de Magalhães Barata, Igarapé-Açu e Maracanã) em 2006 (Vasconcelos *et al.*, 2009 - ANEXO D página 133),

previamente detectado somente no estado de Rondônia (municípios de Ariquemes e Ouro Preto D'oeste) em 1991. Outro genótipo encontrado em áreas geográficas diferentes das até então descritas foi o genótipo III, previamente detectado no Panamá (Saeed *et al.*, 2000) e no Estado de Minas Gerais, Sudeste brasileiro (Nunes *et al.*, 2005b; Nunes *et al.*, 2007 - ANEXO C página 117). A análise atual demonstrou a presença do genótipo III nos estados do Acre, Maranhão e Rondônia, evidenciando um novo perfil de distribuição para este genótipo englobando pelo menos três outros estados brasileiros pertencentes a diferentes regiões geopolíticas (Norte e Nordeste).

Para investigar o período de emergência do VORO nas Américas, utilizou-se o método de relógio molecular, no qual a escala cronológica foi estimada com base nas taxas de evolução e tempos de divergência usando o método Bayesiano de coalescência (Drummond *et al.*, 2005). Ampla taxa de substituição nucleotídica foi observada para as sequências estudadas levando em consideração os dados investigados (genótipos, local e ano de isolamento); os valores obtidos para as taxas, independente do genótipo e local de isolamento (Brasil, Trinidad & Tobago e Peru) estão dentro do encontrado para outros vírus de RNA incluindo outros vírus pertencentes à família *Bunyaviridae* (Jenkins *et al.*, 2002).

Dados epidemiológicos previamente descritos sobre a distribuição geográfica do VORO no Brasil demonstraram que a circulação do vírus esteve restrita ao Estado do Pará entre os anos de 1960 a 1980, dispersando sistematicamente para outras regiões do Estado e para fora do Pará nas décadas subsequentes (Pinheiro *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2007;

Nunes *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009). Com a datação molecular foi possível conhecer o padrão de evolução e dispersão do VORO nas Américas, bem como responder questões referentes à que região das Américas o VORO provavelmente emergiu inicialmente, e para onde posteriormente dispersou-se.

A dinâmica evolutiva do VORO se mostrou bastante interessante, pois as sublinhagens mais antigas vêm sendo gradativamente substituídas por sublinhagens mais recentes, como pode ser observado mais claramente para o genótipo I, no qual cepas da sublinhagem I-a isoladas entre 1961 e 1971 foram substituídas pela sublinhagem I-b cujas amostras foram isoladas em sua maioria entre 1978 e 1994 e, sequencialmente, pela linhagem mais nova (I-c) que inclui as cepas que causaram epidemias nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins entre os anos de 1996 e 2003 (Figura 9). O mesmo padrão foi observado para os demais genótipos (II e III), sugerindo que o VORO evoluiu rapidamente num curto espaço de tempo. Este padrão evolutivo tem sido denominado de “*boom and bust*” no qual linhagens ancestrais são substituídas por linhagens mais recentes mediante adaptação seletiva (Zanotto *et al.*, 1996). Este padrão de evolução vem sendo inferido para diversos flavivírus isolados de mosquitos (Zanotto *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 2003a); um padrão semelhante também foi observado para o vírus da Febre Amarela (Vasconcelos *et al.*, 2004).

Apesar de haver fortes evidências de que o rearranjo genético é um dos principais fatores que contribuem para o processo evolutivo dos membros do gênero *Orthobunyavirus* (Nunes *et al.*, 2005a; Guerrard *et*

al.,2004), pouco se sabe como este mecanismo contribui efetivamente para a emergência de novas linhagens virais (Nunes *et al.*, 2005a).

A troca de segmentos genômicos já foi descrita envolvendo o VORO e outro membro do grupo Simbu, o *Virus Jatobal* (VJTB) isolado de um marsupial (*Nasua nasua*) em Tucuruí em 1985 (Figueiredo & Travassos da Rosa, 1988). Após análises moleculares, chegou-se a conclusão que o VJTB é um vírus rearranjado entre o VORO e um vírus parental membro do grupo Simbu ainda não identificado (Saeed *et al.*, 2001).

Nunes e colaboradores (2005a), utilizando os vírus do grupo C (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) desenvolveram um modelo hipotético para explicar a emergência de diferentes progênies rearranjadas e parentais. Aplicando este modelo para o VORO, diferentes vírus rearranjados foram detectados quando avaliados quanto aos seus segmentos genômicos N(PRNA) e GN (MRNA). Para as cepas estudadas (n=35), a análise pelo método de Kishino Hasegawa (Figura10) ($p < 0,05$) evidenciou que aproximadamente 45% das cepas analisadas correspondiam a vírus rearranjados, onde um segmento de RNA pertencente a um representante de um dado genótipo foi herdado por outro membro de um genótipo distinto, sendo o genótipo I aparentemente o mais estável e o genótipo II o que mais sofreu rearranjo. Estes dados reforçam a hipótese de que o rearranjo genético constitui um dos mais importantes mecanismos de geração de biodiversidade entre os orthobunyavirus; neste caso em especial, entre as linhagens do VORO, mostrando que o rearranjo genético viral não constitui um evento tão raro como pensado anteriormente (Guerrard *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005a; Brease *et al.*, 2007; Reese *et al.*,

2008).

De acordo com a literatura, o primeiro isolamento do VORO ocorreu em Trinidad & Tobago no ano de 1955 (Anderson *et al.*, 1962) e posteriormente em 1960 no Brasil (Pinheiro *et al.*, 1962), mais precisamente no Estado do Pará, sendo que nas últimas cinco décadas, foi associado a centenas de milhares de casos de doença febril aguda descrita em pessoas residentes em diferentes áreas tropicais das Américas do Sul e Central principalmente na Amazônia brasileira (Pinheiro *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009), bem como por casos esporádicos no Estado do Acre (Bernardes-Terzian *et al.*, 2009) e em áreas da Amazônia Equatoriana (Manock *et al.*, 2009).

A datação molecular, com base nas taxas evolutivas e correlacionadas aos dados epidemiológicos, tem sido usada com sucesso para uma variedade de vírus de RNA incluindo arbovírus como o *Virus da Febre Amarela* (Bryant *et al.*, 2007), sendo possível fazer inferências importantes para o entendimento da dinâmica evolutiva desses agentes virais, tais como a origem e o padrão de dispersão (Zanotto *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 2003b).

No caso do VORO, os dados referentes ao relógio molecular evidenciaram que o primeiro evento evolutivo para esse vírus ocorreu cerca de 223 anos atrás (ano de 1786), quando a partir do ancestral comum mais recente, originaram-se os demais ancestrais dos quais emergiram, mediante evolução paralela, os ancestrais comuns do VORO que deram origem aos genótipos I (ano 1897), e aos genótipos II e III no ano 1892, e mais recentemente o genótipo IV no ano de 1963, evidenciando que o VORO e suas

respectivas linhagens vem evoluindo continuamente nas Américas há pelo menos 200 anos.

Em geral, os dados referentes aos isolados do VORO, nos permitiram, até o momento, descrever com maior precisão a distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos circulantes no Brasil e em outros países das Américas, bem como sua área de abrangência (Figura 12), no entanto somente com os estudos de datação molecular foi possível esclarecer os eventos de introdução, origem e emergência das cepas virais. Nesses termos, ao contrário do que se pensava, apesar de quase que concomitante, o evento ocorrido em Trinidad & Tobago no ano de 1955 foi de emergência posterior ao ocorrido em Belém no ano de 1960, sugerindo que o VORO tenha, de fato, emergido por primeiro no Brasil (América do Sul) e posteriormente naquele país do Caribe. Esse evento pode ser explicado pela possibilidade do VORO ter se dispersado do Brasil para Trinidad & Tobago sendo transportado por humanos em fase virêmica ou por tráfico de animais silvestres como sugerido para o vírus amarelo (Vasconcelos *et al.*, 2004).

A série histórica de dispersão das cepas do VORO revelou a origem do vírus inicialmente no Estado do Pará do subgenótipo I-a, que foi associado aos isolamentos virais em epidemias e de isolamentos do VORO de animais silvestres entre as décadas de 1960 e 1970, com rotas de dispersão concomitantes no sentido oeste-leste amazônico, incluindo o Estado do Acre (subgenótipo I-b) entre os anos de 1988 e 1994, e mais recentemente no final da década de 1990 e início dos anos 2000, abrangendo grande área de dispersão dentro do Estado do Pará, incluindo importantes municípios com

intenso trânsito de pessoas como Santa Izabel, Tomé-açu, Curionópolis, Altamira, Portel, Santarém e Oriximiná, bem como Manaus no Estado do Amazonas.

Para o genótipo II, observaram-se dois prováveis pontos de origem, um no leste do Estado do Pará (Porto de Moz) em direção a Iquitos no Peru (subgenótipo II-b), e outro no sentido Iquitos – Ariquemes no Estado de Rondônia (subgenótipo II-c), de onde provavelmente se dispersou para Madre de Dios no Peru e para o Estado do Pará. Em relação ao subgenótipo II-a, representado pelas cepas recentemente associadas com a epidemia ocorrida em Mazagão no Estado do Amapá no início de 2009 (Vasconcelos PFC, *et al.*, informação pessoal), sua origem está provavelmente relacionada a um ancestral comum que se segregou independentemente dos demais subgenótipos (II-b e II-c) ao longo do tempo, emergindo na região amazônica cerca de 24 anos atrás. No entanto, a inferência da provável origem evolutiva para as cepas do Estado do Amapá ficou comprometida uma vez que os isolados obtidos no ano de 1980 durante a primeira epidemia registrada nesse estado em Mazagão não foram viáveis e, portanto, não foi possível obter amplificação do genoma viral.

Quanto ao genótipo III, o fato de até este estudo, haver um único isolamento no Brasil, mais precisamente em Arinos no Estado de Minas Gerais (Nunes *et al.*, 2005b) não existia informação suficiente para explicar o surgimento deste genótipo no país, previamente descrito no Panamá (Saeed *et al.*, 2000), e principalmente, como o mesmo atingiu uma região geograficamente tão distante da área endêmica de circulação do VORO. Com

as cepas do Estado de Rondônia (Ariquemes e Machadinho do Oeste), do Estado do Acre (Xapuri) e do Estado do Maranhão (Porto Franco) identificadas como membros do genótipo III, pode-se inferir a provável rota de dispersão envolvendo uma complexa dinâmica de origem evolutiva entre os subgenótipos III-a (predominantemente brasileiro) e III-b (predominantemente Panamenho). Nesses termos, observou-se que a origem do genótipo III, ocorreu possivelmente com a sublinhagem III-a isolada em Ariquemes no Estado de Rondônia, da qual se segregou independentemente o ancestral da sublinhagem III-b que deu origem às cepas isoladas em Chame e San Miguelito no Panamá. Diferentemente, o representante do genótipo III isolado em Chilibre, também no Panamá, e identificado como subgenótipo III-a teve sua origem provável associada à evolução direta a partir de outra cepa do subgenótipo III-a isolada em Xapuri, Estado do Acre.

Por outro lado, no Brasil o subgenótipo III-a foi encontrado, e provavelmente emergiu primeiramente em Ariquemes (Estado de Rondônia), dispersando-se em seguida para o município vizinho de Machadinho D'Oeste e, em sequência, para Porto Franco no estado do Maranhão, e finalmente para Arinos, no Estado de Minas Gerais. Neste caso, é possível que o vírus tenha sido introduzido em Minas Gerais via Estado do Maranhão devido ao intenso trânsito de pessoas deste Estado para diferentes Estados e regiões do Brasil; no Estado de Minas Gerais, o VORO, vem sendo provavelmente mantido em ciclos silenciosos, talvez por não ter ainda encontrado condições ecológicas e ambientais adequadas, tais como alta densidade de *Culicoides paraensis*, para assim iniciar um ciclo epidêmico. Ademais, a detecção esporádica do VORO foi

recentemente documentada no Estado do Acre (Bernardes-Terzian *et al.*, 2009) confirmando que o vírus de fato circula silenciosamente na Amazônia Brasileira, como anteriormente sugerido por Azevedo e colaboradores (Azevedo *et al.*, 2007), podendo ser transportado por humanos em fase virêmica e portadores de quadros sub-clínicos de uma região a outra do país. Por fim, em relação ao genótipo IV do VORO, representado por duas cepas isoladas no Estado do Amazonas durante a epidemia de 1980/1981 (Borborema *et al.*, 1982), esse achado reflete a possibilidade de que futuramente novos genótipos venham a ser descritos à medida que outros isolados do VORO sejam geneticamente analisados evidenciando o grande potencial deste vírus em gerar novas progênes, e ao que tudo indica o VORO em sua evolução utiliza como um dos principais mecanismos, o rearranjo genético em natureza.

Os dados obtidos nesta dissertação proporcionaram um melhor entendimento sobre a epidemiologia molecular do VORO, permitindo-nos evidenciar a presença de rearranjo genético em natureza entre as cepas virais; a grande diversidade genética deste vírus inclusive com a descrição do genótipo IV até então desconhecido; e uma poderosa dinâmica de evolução e dispersão viral. No entanto, vale ressaltar que apesar dos avanços obtidos, a maneira como determinados fatores (ecossistema, associação vírus-hospedeiro e genética viral) realmente contribuem para a biodiversidade viral, ainda é uma questão que permanece sem uma resposta completa ou adequada, necessitando de mais estudos inclusive com a inferência de parâmetros ecológicos e ambientais, além dos aspectos virais e evolutivos.

5 CONCLUSÕES

1. Houve predomínio do genótipo I do VORO nas 66 amostras virais analisadas;
2. O VORO utiliza o rearranjo genético como mecanismo de geração de biodiversidade viral;
3. O genótipo I é o mais estável, já que 85% dos isolados se mantiveram como genótipo I pela análise de dois genes N (PRNA) e GN (MRNA);
4. O genótipo II é provavelmente o mais instável, e, portanto, esse genótipo está mais susceptível às pressões evolutivas seletivas que influenciam os vírus com genoma de RNA segmentado;
5. O genótipo III apresentou estabilidade intermediária;
6. Foi reconhecido um novo genótipo do VORO em amostras isoladas em Manaus no ano de 1980, sendo denominado de genótipo IV;
7. O genótipo IV não foi detectado em outras áreas, isto provavelmente porque ele ainda não se dispersou;
8. O VORO emergiu nas Américas a partir de um ancestral comum há aproximadamente 223 anos, no Estado do Pará a partir de um ancestral comum provavelmente no ano de 1902;
9. O genótipo I do VORO foi o primeiro a ser segregado e dele emergiram os demais genótipos;
10. Os genótipos mais prevalentes (genótipo I, II e III do VORO) estão constantemente evoluindo, mediante o mecanismo de “*boom and*

boost que resulta na emergência seguida de substituição de sublinhagens (subgenótipos) por outras mais recentes;

11. O VORO provavelmente emergiu primeiro no Brasil no Estado do Pará, e quase simultaneamente, em Trinidad & Tobago;
12. A diversidade e dispersão do VORO no Brasil (Amazônia Brasileira) são maiores do que nos demais países endêmicos (Peru, Panamá e Trinidad & Tobago).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, **215**: 403-410, 1990.
- ANDERSON, C.R., SPENCE, L., DOWNS, W. G., AITKEN, T. H. G. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad. West Indies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **10**: 574-578, 1961.
- AQUINO, V. H., MORELI, M. L., MORAES-FIGUEIREDO, L. T. Analysis of Oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbor an important role for the polymerase activity. **Archives of Virology**, **148**: 19-28, 2003.
- AQUINO, V. H., FIGUEIREDO, L. T.M. Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. **Journal of Virological Methods**, **115**: 51-57, 2004.
- ARAUJO, R., DIAS, L. B., ARAÚJO, M. T. F, PINHEIRO, F., OLIVA, F. P. Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (tipo BeAn19991). **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, **20**: 45-54, 1978.
- ARCHER, A. M, RICO-HESSE, R. High specific genetic divergence and recombination in arenaviruses from the Americas. **Virology**, **304**: 274-281, 2002.

- AZEVEDO, R. S. S., NUNES, M. R. T, CHIANG, J. O., BENSABATH, G., VASCONCELOS, H. B., PINTO, A. Y. N., MARTINS, L. C., MONTEIRO, H. A. O., RODRIGUES, S. G., VASCONCELOS, P. F. C. Reemergence of Oropouche Fever, Northern, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, **13**: 912-915, 2007.
- BEATY, B. J., BORUCKI, M., FARFAN, J., WHITE, D. Arbovirus-vector interactions: determinants of arbovirus evolution. In: **Factors in the emergence of arbovirus diseases**. J. F. Saluzzo, & B. Dodet, (eds.). Paris, Elsevier, 1997. p. 23-35.
- BERNARDES-TERZIAN, A. C., BRONZONI, R. V. M., DRUMOND, B. P., SILVA-NUNES, M., SILVA, N. S., FERREIRA, M. U., SPERANÇA, M. A., NOGUEIRA, M.L. Sporadic Oropouche vírus infection, Acre, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, **15**: 348-350, 2009.
- BISHOP, D.H.L., BEATY, B.J. Molecular and biochemical studies of the evolution, infection and transmission of insect bunyaviruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, **311**: 326-338, 1988.
- BORBOREMA, C. A., PINHEIRO, F. P., ALBUQUERQUE, B. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., DA ROSA, J. F., DOURADO, H. V. Primeiro registro de epidemia causada pelo vírus Oropouche no do Amazonas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **24**:132 - 139, 1982.
- BORUCKI, M. K., CHANDLER, L. J., PARKER, B. M., BLAIR, C. D., BEATY, B. J. Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. **Journal of General Virology**, **80**, 3173–3179, 1999.

- BOULOY, M. *Bunyaviridae*: Genome organization and their replication strategies. **Advances in Virus Research**, **40**: 235-266, 1991.
- BOWEN, M. D., TRAPPIER, S. G., SANCHEZ, A. J., MEYER, R. F., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., DUNSTER, L. M., PETERS, C. J., KZIAZEK, T. G., NICHOL, S. T. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. **Virology**, **291**: 185-190. 2001.
- BRIESE, T., BIRD, B., KAPOOR, V. NICHOL, S. T., LIPKIN, W. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. **Journal of Virology**, **80**: 5627-5630, 2006
- BRYANT, J. E., HOLMES, E.C., BARRET, A.D.T. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, **3 (5)**: e75, 2007.
- BUCHEN-OSMOND, C. Bunyaviridae. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3**. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA, 2003, 853 p.
- CALISHER, C. H. History, Classification, and Taxonomy of viruses in the Family *Bunyaviridae*: In: **The Bunyaviridae**. R.M. Elliott, (ed.). Plenum Press, New York. 1996, p. 1-18.
- CASALS, J., BROWN, L. V. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. **Journal of Experimental Medicine**, **99**: 429, 1954.
- CASALS, J. Viruses: The versatile parasites the arthropod-borne group of animal viruses. **The New York Academic Science**, **19**: 219-235, 1957.

- CASALS, O. R., CAUSEY, C. E., MAROJA, O. M., MACEDO, D. G. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon Region of Brazil. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **10**: 227-249, 1961.
- CASALS, J. Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-challenging tests. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **12**: 587-596, 1963.
- CHARREL, R. N., FELDMANN, H., FULHORST, C. F., KHELIFA, R., DE CHESSE, R., DE LAMBALLERIE, X. Phylogeny of new World arenavirus based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **296**: 1118-1124, 2002.
- CHAVEZ, R., COLAN, E., PHILIPS, I. Fiebre de Oropouche em Iquitos: reporte preliminar de 5 casos. **Revista de Farmacologia y Terapéutica**, **2**: 12 - 14, 1992.
- CLERX-VAN HAASTER, C. M., AKASHI, H., AUPERIN, D. D., BISHOP, D. H. L.,. Nucleotide sequence analyses and predicted coding of bunyavirus genome RNA species. **Journal of Virology**, **41**:119-128, 1982a.
- CLERX-VAN HAASTER, C. M., CLERX, J. P. M., USHIJIMA, H., AKASHI, H., FULLER, F., BISHOP, D. H. L. The 3' terminal sequences of bunyaviruses and nairoviruses (*Bunyaviridae*). Evidence of end sequence generic differences within the virus family. **Journal of General Virology**, **61**: 289, 1982b.

- DIXON, K. E., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., LLEWELLYN, C. H. Oropouche vírus. II. Epidemiological observation during an epidemic in Santarém, Pará, Brazil, in 1975. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 161 - 164, 1981.
- DRUMMOND, A.J., PYBUS, O., RAMBAUT, A., FORSBERG, R., RODRIGO, A.: Measurably evolving populations. **Trends in Ecology & Evolution**, **18**: 481-488, 2003.
- DRUMMOND, A.J., RAMBAUT, A., SHAPIRO, B., PYBUS, G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, **22**: 1185-1192, 2005.
- DRUMMOND, A. J., HO, S. Y. W., PHILLIPS, M. J., RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **Plos Biology**, **4**: 80-88, 2006.
- DUNN, E. F., PRITLOVE, D. C., EILLIOTT, R. M. The SRNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway Bunyaviruses: sequence determination and analysis. **Journal of General Virology**, **70**: 597- 608, 1998.
- FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A. *Bunyaviridae*. In: **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division. International Union of Microbiological Societies**. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberguer, U., & Ball, L. A. (eds.). Elsevier, Academic Press, p. 695-699, 2005.

- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Molecular Biology and Evolution**, **39**: 783-791, 1985.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Vírus brasileiro da família Bunyaviridae. **Medicina, Ribeirão Preto**, **32**: 154-158, 1999.
- FIGUEIREDO, L. T. M., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Jatobal vírus antigenic characterization test using EIA as indicator, on tissue culture. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **83 (2)**: 161-164, abril/junho, 1988.
- FREITAS, R. B., PINHEIRO, F. P., SANTOS, M. A V., TRAVASSOS DA ROSA P. A, DA ROSA, J. F. S., FREITAS, E. N., Epidemia de vírus Oropouche no leste do do Pará, In: **Internacional Symposium on Tropical Arboviruses and Hemorrhagic Fevers**, Pinheiro F. P., Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências, p. 419-439, 1982.
- GENTSCH, J. R., BISHOP, D. H. L. Recombination and complementation between Snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. **Journal of Virology**, **31**: 707-717, 1976a
- GENTSCH, J.R., BISHOP, D.H.L. Recombination and complementation between temperature-sensitive mutants of a bunyavirus, Snowshoe hare virus. **Journal of Virology**, **20**: 351-354, 1976b.
- GENTSCH, J.R., ROZHON, E.J., KLIMAS, R.A., EL SAID, L.H., SHOPE, R.E., BISHOP, D.H.L. Evidence from recombinant bunyavirus studies that the M RNA gene products elicit neutralizing antibodies. **Virology**, **1**: p.190-204, 1980.

- GERRARD, S. R., LI, L., BARRETT, A. D., NICHOL, S. T. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. **Journal of Virology**, **16**: 8922-6, 2004
- GOLDMAN, N., ANDERSON, J. P., RODRIGO, A. G. Likelihood-Based test of Topologies in Phylogenetics. **Systematic Biology**, **49 (4)**: 652-670, 2000.
- GONZALES-SCARANO, F., NATHANSON, N. Bunyaviridae. In: **Virology**. B.N. Fields, B.N., D.M. Knipe &, P.M. Honley (eds.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1473-1504.
- GOULD, E.A., DE LAMBALLERIE, X., ZANOTTO, P.M., HOLMES, E.C. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, **59**: 277-314, 2003a.
- GOULD, E. A., LAMBALLERIE, X., ZANOTTO, P. M. A., HOLMES, C. Evolution. epidemiology and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Advances Virus Research**, **57**:71-103, 2003b.
- HARRISON, S. D., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. Virus structure. In: **Virology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Honley, P. M. (eds). 3^a ed., New York, Raven Press, p. 59-99. 1996.
- HIGGINS, D. G., BLEASBY, A. J., FUSHS, R., CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**, **8**: 189 -91, 1992.
- HOCH, A. L., ROBERTS, D. R., PINHEIRO, F. D. P. Breeding sites of *Culicoides paraensis*, and other options for control by environmental management. **Emerging Infectious Diseases**, **4 (3)**: 284-293, 1986.

- HOLLAND, J., E. DOMINGO. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes** **16**: 13-21, 1998.
- HUELSENBECK, J. P., RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Aug, 17(8)**: 754-755, 2001.
- JENKINS, G. M., RAMBAUT, A., PYBUS, O. G., HOLMES, E. C. Rates of Molecular Evolution in RNA Viruses: A Quantitative Phylogenetic Analysis. **Journal of Molecular Evolution, 54**: 2002, 156–165.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviroses Including Certain Other Viruses of Vertebrates**, 3rd. Ed. San Antonio, USA: The American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1985. 1141p.
- KARABATSOS, N. **Annual Report on the Catalogue of Arthropod-Borne and Selected Vertebrate Viruses of the World**. San Antonio, USA: the American Committee on Arthrod Borne Viruses. Issue n° 108, 2002. 30p.
- KIMURA, M. A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution, 16**: 111-120, 1980.
- KINNEY, R. M., CALISHER, C. H. Antigenic relationships among Simbu serogroup (*Bunyaviridae*) viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 30**: 1307-1318, 1981.
- KOSAKOVSKY POND, S. L., FROST, S. D. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. **Molecular Biology Evolution, 22**:1208-22, 2005.

- KUMAR, S., TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software. Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, **24(8)**: 1596-1599, 2007.
- LE LAY-ROGUES, G., CHASTEL, C. Virus des chiropteres transmis ou non par arthropods. **Medécine Tropicale**, **46**: 389-395, 1986.
- LEDUC, J. W., HOCH, A. L., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Epidemic Oropouche virus disease in Northern Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, **15**: 97 - 103, 1981.
- LEDUC, J. W., PINHEIRO, F. P. Oropouche fever. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Monath, T. P (ed.). Boca Raton, CRC press, 1988. p.1-14.
- LINLEY, J. R., HOCH, A. L., PINHEIRO, F. P. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. **Journal of Medical Entomology**, **20**: 347 - 364, 1983.
- MANOCK, S R., JACOBSEN, K. H, BRAVO, N. B., RUSSELL, K. L., NEGRETE, M., OLSON, J. G., SANCHEZ, J. L., BLAIR, P. J. SMALLIGAN, R. D., QUIST, B. K., ESPÍN, J. F., ESPINOZA, W. R., MACCORMICK, F., FLEMING, L. C., KOCHER, T. Z. Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **81**: 146-151, 2009
- MARTINS, L. C., DINIZ, J. A. P., SILVA, E. V. P., BARROS, V. L. R. S., MONTEIRO. H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Characterization of Minaçu vírus (Reoviridae: 131

- Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice. **International Journal of Experimental Pathology**, **88**: 63-73, 2007.
- MATTHEWS, R. E. F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. **Intervirology**, **17**: 1-3, 1982.
- MURPHY F. A, HARRISON A. K, WHITFIELD S. G. Morphologic Similarities of Bunyamwera serological supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. **Intervirology**, **1**: 297-316, 1973
- MURPHY, F. A. Virus Taxonomy. In: **Virology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 15-57.
- NICHOL, S. T., BEATY, B. J., ELLIOTT, R. M. *Bunyaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo AM, Maniloff *et al.*, eds. **Virus Taxonomy**, VIII th. Report of the ICTV. London: Elsevier Academic Press, 2005, p.695-716.
- NUNES, M. R., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., WEAVER, S. C., TESH, R. B., VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of group C viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. **Journal of Virology**, **16**: 79, 10561-10570, 2005a.
- NUNES, M. R. T., MARTINS, L. C., RODRIGUES, S. G., CHIANG, J. O., AZEVEDO, R. S., DA ROSA, A. P., VASCONCELOS, P. F. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, **11**: 1610 - 1613, 2005b.
- NUNES, M. R. T., VASCONCELOS, H. B., MEDEIROS, D.B.A., RODRIGUES, S. G., AZEVEDO, R. S., CHIANG, J. O., MARTINS, L. C., VASCONCELOS,

- P. F. A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia brasileira. **Cadernos de Saúde Coletiva**, **13**: 303-318, 2007.
- OBIJESKI, J. F., BISHOP, D. H., MURPHY, F. A., PALMER, E. L. Strutral proteins of La Crosse virus, **Journal of General Virology**, **19**: 985-997, 1976.
- PHILLIPS, I., NEED, J., ESCAMILLA, J., COLAN, E., SANCHEZ, S., RODRIGUEZ, M., VASQUEZ, L., SEMINARIO, J., BETZ, T., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. First documented outbreak of dengue in the Peruvian Amazon region. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, **26**: 201 -7, 1992.
- PINHEIRO, F. P., PINHEIRO, M., BENSABATH, G., CAUSEY, O. R., SHOPE, R. E. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, **12**: 15-23, 1962.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., BENSABATH, G. An outbreak of Oropouche disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brasil. **Tropenmedizin und Parasitologie. Germany**, **27**: 213- 223, 1976.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F., ISHAK, R., FRIETAS, R. B., GOMES, M. L., LEDUC, J. W., OLIVA, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 149 - 160, 1981a.

- PINHEIRO, F. P., HOCH, A. L., GOMES, M. L., *et al.* Oropouche vírus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 172-176, 1981b
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., GOMES, M. L., LEDUC, J. W., HOCH, A. L. Transmission of Oropouche vírus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. **Science** **215**: 1251-1253, 1982.a
- PINHEIRO, F. P., ROCHA, A. G., FREITAS, R. B., OHANA, B. A., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., ROGÉRIO, J. S., LINHARES, A. C. Meningitis associated with \ oropouche vírus infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **24**: 246-251, 1982b
- PINHEIRO F. P. Febre do Oropouche. **Jornal Brasileiro de Medicina**, **44 (4)**: 46-62, 1983.
- PINHEIRO, F. P., TAVASSOS, DA ROSA, A. P. A. Arboviral Zoonoses. Of Central and South America. In: **Handbook of Zoonoses**. G. Beran. (ed) Boca Raton, CRC press, 1994 p. 214-217.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C. Febre por Oropouche. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico**. Leão, R. N. Q. (ed.). Belém, Editora CEJUP, 1997. p. 285-298.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighboring countries. In: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighboring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C and Travassos da Rosa, J. F. S (eds.). Belém, Brazil, Instituto Evandro Chagas, 1998. p.186-192.

- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever. In: **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Feigin, R. D. (ed.). Saunders, Philadelphia. 2004. p. 2418-2423.
- POSADA, D., CRANDALL, K. A. Modeltest Testing the model of DNA Substitution. **Bioinformatics 14 (9)**: 817-818, 1998
- PRINGLE, C. R. Genetics and genome segment reassortment. In: **The Bunyaviridae**. R. M. Elliott (ed). Plenum Press, New York, N.Y., 1996. p. 189-226.
- RAJU, R., KOLAKOFSKY, D. The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within the nucleocapsid are base paired. **Journal of Virology, 63**: 122-128, 1989.
- REESE, M. SARA., BRANDLEY, J. BLITVICH., CAROL, D. BLAIR., DAVE, GESKE., BARRY, J. BEATY., WILLIAM, C. BLACK IV. Potential for La Crosse virus segment reassortment in nature. **Virology Journal, 5**: 164, 2008
- RODRIGUES, A. H. **Desenvolvimento de um Modelo Experimental de Infecção Subcutânea por Vírus Oropouche em Hamster**. Dissertação de Mestrado (Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos Área de Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004. 153 p.
- SAEED, M. F., WANG, H., NUNES, M. R. T., VASCONCELOS, P. F. C., WEAVER, S. C., SHOPE, R. E., WATTS, D. M., TESH, R. B., BARRETT, A. D. T. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology, 81**: 743-748, 2000.

- SAEED, M. F., NUNES, M., VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., WATTS, D. M., RUSSELL, K., SHOPE, R. E., TESH, R. B., BARRETT, A. D. T. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 7, p. 2445 - 2452, 2001.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 406-425, 1987.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 74: 5463-5467, 1977.
- SCHMALJOHN, C.S., J, W. HOOPER. The Bunyaviridae. In: **Virology**, B. N. FIELDS AND D. M. KNIPE (eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa. p. 1581-1602.
- SHOPE, R. E., WOODALL, J. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. The epidemiology of disease caused by viruses in group C and Guamá (*Bunyaviridae*) In: **The arboviruses: Epidemiology and ecology**. T.P. Monath (ed). Boca Raton, USA, CRC press, 1988. p. 37-52.
- SMITHBURN, K. C., HENDON, A. J, MAHAFFY, A. F. A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki forest. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 26:189-208, 1946.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1999.

- SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods**, Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., D. G. HIGGINS. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, **24**: 4876-4882, 1998.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., NAKAUTH, C. M., VASCONCELOS, P. F. C. Aspectos virológicos dos arbovírus. In: **Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém, Instituto Evandro Chagas, 1986. p. 365-373.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., NUNES, M. R. T., MAGALHÃES, M. T. F. TRAVASSOS DA ROSA J. F. S., VASCONCELOS P. F. C. Epidemia de febre do Oropouche em Serra Pelada, Município de Curionópolis, Pará, 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **29**: 537 - 541, 1996.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico**. Leão, R. N. Q. (ed). Belém, Editora CEJUP, 1997.p. 208-225.
- TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DÉGALLIER, N., VASCONCELOS, P. F. C. Caracterização e relacionamento antigênico de três novos Bunyavírus no grupo Anopheles A

(Bunyaviridae) dos arbovirus. **Revista de Saúde Pública**, **26**: 173-178, 1992.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., PINHEIRO, F. P., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., DIAS, L. B., CRUZ, A. C. R. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. & Travassos da Rosa, J. F. S. (eds.). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998. p.19-31.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., GUERREIRO, S. C, DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos s do Maranhão e Goiás, Brasil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, 31:271-278, 1989.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. In: **Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)**, **44**: 117-124, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S, RODRIGUES, S. G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., Arboviruses pathogenic for

- man in Brazil. In: **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. & Travassos da Rosa, J. F. S.,(ed.). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998.p 72-100.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., DÉGALLIER., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergente and reemergence of arboviroses. **Cadernos de Saúde Pública, 17:** 155-164,2001.
- VASCONCELOS, P. F. C., BRYANT, J. E., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TESH, R. B., RODRIGUES, S. G., BARRET, A. D. T. Genetic divergence and dispersal of Yellow Fever Vírus, Brazil. **Emerging Infections Diseases 10:** :1578– 1584, 2004.
- VASCONCELOS, H.B., AZEVEDO, R.S. S, CASSEB, S.M, NUNES-NETO, J.P., CHIANG, J.O., CANTUÁRIA, P.C., SEGURA, M.N.O., MARTINS, L.C., MONTEIRO, H.A.O., RODRIGUES, S.G., NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, P.F.C. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology, 44:** 129-133, 2009.
- WATTS, D. M., PHILLIPS, I., CALLAHAN, J. D., GRIEBENOW, W., HYAMS, K. C., HAYES, C. G. Oropouche virus transmission in the Amazon river basin of Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene: 56(2),** 148 - 152, 1997.

- WATTS, D. M., RAMIREZ, G., CABEZAS, C., WOOSTER, M. T., CARRILLO, C., CHUY, M., GENTRAU, E. J., HAYES, C.G. Arthropod-borne viral disease in Peru. In: **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. & Travassos da Rosa, J. F.S. (eds). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998, p.193-218.
- WHITE, D. O., FENNER, F. J. *Bunyaviridae*. In: **Medical Virology Fourth Edition**, White, D. O, Fenner, F. J. (eds). San Diego, California, Academic Press, 4 ed., 1994.p. 509-521.
- WHO. World Health Organization. Scientific Group. Arthropod-borne and rodent-borne viral disease. **Technical Report Series**, n° 719. Geneva. 1985. 116 p.
- WOODS, C. W., KARPATI, A. M., GREIN, T., McCARTHY, N., GATURUKU, P., MARTIN, E. L., MANN, P., SMOAK, B. L., RYAN, M., KSIAZEK, T. G., ARTHUR, R. R., NDIKUYEZE, A., AGATA, N. N., PETTERS, C. J. An outbreak of Rift Valley fever in northeastern Kenya, 1997-98. **Emerging of Infectious Diseases**, **8**: 138-144, 2002
- ZANOTTO, P. M. A., GIBBS, M. J., GOULD E. A., HOLMES, E. C. A Reevaluation of the Higher Taxonomy of Viruses Based on RNA Polymerases. **Journal of Virology**, **70**: 6083–6096, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – CÓPIA DA AUTORIZAÇÃO DA DIRETORIA DO INSTITUTO
EVANDRO CHAGAS PARA PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.




Dra. HELENA BALDEZ VASCONCELOS

Ananindeua / Pará, 01 de julho de 2008.

Senhora Coordenadora,

Autorizamos liberação dos espécimes de cepas isoladas do vírus Oropouche pertencentes ao acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC) a fim de serem usados no desenvolvimento do projeto intitulado “Epidemiologia molecular do vírus Oropouche (Bunyaviridae: Orthobunyavirus) na Amazônia Brasileira”

Atenciosamente,



ELISABETH C. DE OLIVEIRA SANTOS
Diretora
Instituto Evandro Chagas
Secretaria de Vigilância em Saúde / MS

ANEXO B – CÓPIA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COM ANIMAIS-CEPAN/IEC/SVS/MS.



Parecer de Aprovação Nº 0037/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 0027/2008

Ananindeua/PA, 18 de dezembro de 2008.

Projeto: “Epidemiologia molecular do vírus oropouche (*Bunyaviridae: orthobunyavirus*) na Amazônia Brasileira”.


Pesquisador Responsável: PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

ANEXO C – CÓPIA DE ARTIGO: A FEBRE DO OROPOUCHE – UMA REVISÃO DOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

A FEBRE DO OROPOUCHE: UMA REVISÃO DOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Oropouche fever: an overview of the epidemiological and molecular aspects in the Brazilian Amazon region

Marcio Roberto Teixeira Nunes¹, Helena Baldez Vasconcelos², Daniele Barbosa de Almeida Medeiros³, Sueli Gerreiro Rodrigues⁴, Raimunda do Socorro da Silva Azevedo⁵, Jannifer Oliveira Chiang⁶, Livia Carício Martins⁷, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos⁸

RESUMO

O vírus Oropouche (VORO; *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) é um dos mais importantes arbovírus que infectam humanos na Amazônia Brasileira, sendo o agente causador da febre do Oropouche. Entre os anos de 1961 e 2006, um grande número de epidemias foi registrado em diferentes centros urbanos do estado do Pará (Belém, Santa Isabel, Castanhal, Santarém, Oriximiná, Serra Pelada, zona Bragantina – Igarapé Açu, Maracanã e Magalhães Barata), do Amazonas (Manaus e Barcelos), Acre (Xapuri), Amapá (Mazagão), Maranhão (Porto Franco), Tocantins (Tocantinópolis) e Rondônia (Ariquemes e Oro Preto D'Oeste). Estudos moleculares têm demonstrado a presença de pelo menos três linhagens distintas do VORO na Amazônia Brasileira (genótipos I, II e III), sendo os genótipos I e II os mais frequentemente encontrados em regiões da Amazônia ocidental e oriental, respectivamente. O genótipo III do VORO, previamente encontrado somente no Panamá, foi recentemente descrito na região Sudeste do Brasil. A associação de dados epidemiológicos e moleculares vêm contribuindo substancialmente para a caracterização das cepas do VORO isoladas durante epidemias, no período de pelo menos quatro décadas, bem como permitindo um melhor

¹ Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Pesquisador da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

² Enfermeira. Especialização em Saúde Pública. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

³ Doutora em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

⁴ Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

⁵ Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

⁶ Doutora em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

⁷ Doutora em Ciências Biológicas. Pesquisadora da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS.

⁸ Doutor em Medicina. Pesquisador e chefe da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas / SVS/MS - Av. Almirante Barroso, 492, CEP: 66093-020, Belém - PA. E-mail: pedrovasconcelos@iec.pa.gov.br

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARICIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

entendimento a respeito da epidemiologia molecular do VORO no que tange à emergência de novas linhagens genéticas e à dinâmica evolutiva desse arbovirus nas Américas e principalmente na Amazônia Brasileira. Este trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares do VORO enfatizando sua distribuição, a dinâmica das epidemias ocorridas entre 1961 e 2006, bem como a dispersão de diferentes genótipos no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE

Vírus Oropouche, epidemiologia molecular, Amazônia Brasileira

ABSTRACT

The Oropouche virus (OROV; *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) is one of the most important arbovirus that infect humans in the Amazon region causing an arboviral disease denominated Oropouche fever. Between 1961 and 2006, several outbreaks were reported in different urban areas of Pará (Belém, Santa Isabel, Castanhal, Santarém, Oriximiná, Serra Pelada, zone Bragantina – Igarapé Açu, Maracanã e Magalhães Barata), Amazonas (Manaus e Barcelos), Acre (Xapuri), Amapá (Mazagão), Maranhão (Porto Franco), Tocantins (Tocantinópolis) and Rondônia (Ariquemes e Oro Preto D'Oeste) states. Molecular studies recently conducted have demonstrated the circulation of at least three major OROV lineages in the Amazon region (genotypes I, II and III). The genotypes I and II are more frequently detected in the western and eastern Amazon, respectively. The genotype III, previously recognized only in Panama, was recently described in Southeast region of Brazil. The association of molecular and epidemiological data has contributed substantially for the genetic characterization of OROV strains isolated during different outbreaks in the past four decades, as well as providing a better understanding regarding its molecular epidemiology in terms of emergence of new lineages and dynamic of evolution of these arboviruses in the Americas mainly in the Amazon region. This work aims to present a comprehensive review regarding the epidemiological and molecular aspects of the OROV emphasizing its geographic distribution, dynamics of the outbreaks occurred between 1961 and 2006, as well as the genotype dispersion in Brazil.

KEY WORDS

Oropouche virus, molecular epidemiology, Amazon region

1. INTRODUÇÃO

Na Amazônia Brasileira, a febre do Oropouche é considerada a mais freqüente arbovirose que acomete o homem depois da dengue, sendo caracterizada por episódios de doença febril aguda acompanhada principalmente por cefaléia, artralgia, mialgia, fotofobia e outras manifestações sistêmicas. Mais raramente, alguns pacientes podem apresentar um quadro de meningite asséptica com sinais e sintomas típicos de comprometimento das meninges. Interessante é que os sintomas da febre do Oropouche geralmente reaparecem poucos dias após o final do episódio febril inicial, no entanto são usualmente menos severos. Os pacientes acometidos pela febre do Oropouche se recuperam completamente e sem seqüelas, mesmo em casos

mais severos. Até o momento, nenhum caso fatal foi registrado e/ou associado à febre do Oropouche. Uma das mais importantes características do *vírus Oropouche* (VORO) é a sua capacidade de causar epidemias em centros urbanos, das quais a maioria foi registrada na Amazônia Brasileira (Pinheiro *et al.*, 1981; 2004).

O VORO foi isolado pela primeira vez em 1955 em amostra de sangue de um paciente febril residente no vilarejo denominado Vega de Oropouche em Trinidad, bem como de um lote de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (Anderson *et al.*, 1961). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1960 a partir do sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*) capturada em uma área silvestre durante a construção da rodovia Belém-Brasília e de um lote de mosquitos *Ochlerotatus serratus* capturados próximo à mesma área (Pinheiro *et al.*, 1962). No ano seguinte, a doença foi detectada na capital Paraense, ocasião em que o vírus causou uma grande epidemia, na qual cerca de 11.000 pessoas foram afetadas pela doença (Pinheiro *et al.*, 1962). A partir deste momento, o VORO demonstrou seu potencial epidêmico causando outras epidemias em diferentes centros urbanos da região Norte e Nordeste do Brasil, mais especificamente nos estados do Pará, Amapá, Amazonas, Acre, Tocantins, Maranhão e Rondônia (Pinheiro *et al.*, 2004). Fora do Brasil, epidemias causadas pelo VORO foram registradas no Panamá (1989) (Pinheiro *et al.*, 2004), bem como na região Amazônica Peruana (1992 e 1994) (Chavez *et al.*, 1992; Watts *et al.*, 1997).

Este trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão dos aspectos moleculares e epidemiológicos do VORO, enfatizando a distribuição geográfica desse importante arbovírus Amazônico, a dinâmica das epidemias registradas entre os anos de 1961 e 2006, bem como dados moleculares recentes no que tange a dispersão dos diferentes genótipos do VORO no Brasil. Todos os dados apresentados foram obtidos a partir de estudos epidemiológicos e moleculares publicados em revistas científicas nacionais e internacionais, bem como a partir de comunicações pessoais de diferentes pesquisadores envolvidos com pesquisas sobre o VORO.

2. O VÍRUS OROPOUCHE (VORO)

A febre do Oropouche é causada pelo VORO, um arbovírus que pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* (Fauquet *et al.*, 2005). A partícula viral apresenta-se sob a forma esférica, cujo diâmetro varia de 90 a 100 nm. Por apresentar envelope, o vírus é sensível à ação de solventes orgânicos (éter e clorofórmio) e detergentes (desoxicolado de sódio) (Karabatsos, 1985). A simetria dos virions é helicoidal apresentando como material genético o ácido ribonucléico (RNA) (Bishop & Shope, 1979). O genoma deste vírus, assim como os demais orthobunyavírus, é constituído por três moléculas de RNA fita simples, polaridade negativa, denominados SRNA, MRNA e LRNA correspondentes aos segmentos

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARÍCIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

pequeno, médio e grande, respectivamente (Fauquet *et al.*, 2005). Estes segmentos são responsáveis pela codificação de seis proteínas, sendo três estruturais, uma delas a proteína de nucleocapsídeo, N, que é codificada no segmento SRNA, e outras duas, glicoproteínas de superfície, Gn e GC, codificadas no segmento MRNA. As proteínas não estruturais NSs, NSm e L (polimerase viral) são codificadas nos segmentos S, M e LRNAs, respectivamente (Fauquet *et al.*, 2005). O VORO possui hemaglutinina que apresenta atividade hemaglutinante para hemácias de gansos, podendo esta ser recuperada do soro de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados tratados pelo método da sucrose-acetona (Travassos da Rosa *et al.*, comunicação pessoal, 1969). Em termos de patogenia, a inoculação do VORO em camundongos recém-nascidos (2-3 dias) pelas vias intracerebral (i.c) e intraperitoneal (i.p), bem como em hamsters adultos pelas vias i.c, i.p e subcutânea, produzem infecção letal para esses animais. O vírus se replica em um grande número de sistemas celulares, incluindo as células VERO, BHK-21 e células embrionárias de pinto (fibroblastos), causando efeito citopatogênico (Pinheiro *et al.*, 1994).

Estudos laboratoriais e de campo realizados por pesquisadores da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC) durante o curso das inúmeras epidemias ocorridas na Amazônia Brasileira demonstraram a importância do inseto *Culicoides paraensis* (família *Ceratopogonidae*) como vetor urbano para o VORO (Pinheiro *et al.* 1981a; 1982). Este diminuto inseto comumente chamado de “maruim” na região Amazônica é encontrado em áreas tropicais e subtropicais das Américas sendo ativo durante o dia, mais especificamente no período da tarde, cuja hematofagia em humanos é exercida tanto dentro quanto fora do domicílio (Hoch *et al.*, 1990; Karabatsos, 1985; Pinheiro *et al.*, 1976).

O VORO é mantido em natureza mediante dois ciclos distintos: um ciclo urbano e outro silvestre (Pinheiro *et al.*, 1981b). No ciclo urbano, conhecido também como ciclo epidêmico, o vírus é transmitido entre indivíduos infectados e indivíduos sadios suscetíveis pela picada do *C. paraensis* durante a realização do repasto sanguíneo. Este inseto se multiplica principalmente em áreas com acúmulo de material orgânico em decomposição, tais como cascas de cacau, cachos de bananas e troncos de bananeiras (Linley *et al.*, 1983). Estudos utilizando hamsters como modelo experimental evidenciaram a transmissão do VORO entre estes animais tendo o mosquito *Culex quinquefasciatus* (um mosquito comumente encontrado em centros urbanos da Amazônia) como vetor. No entanto, a transmissão ocorreu somente quando altos níveis de viremia eram observados nos hamsters, níveis estes que raramente ocorrem em humanos infectados. Estes dados praticamente descartam mosquitos *Culex* como vetores urbanos envolvidos na transmissão do VORO durante as epidemias (Pinheiro *et al.*, 1981b).

Em relação ao ciclo silvestre, evidências sugerem que, entre os vertebrados, as preguiças (*Bradypus tridactylus*), macacos e, possivelmente, determinadas espécies de aves silvestres podem servir como hospedeiros para o VORO (Pinheiro *et al.*, 1962; 2004; Nunes *et al.*, 2005). Embora o VORO tenha sido isolado uma única vez de um lote de mosquitos *Aedes serratus* no Brasil e de um lote de *Coquillettidia venezuelensis* em Trinidad (Pinheiro *et al.*, 1981b), até o momento nenhum tipo de estudo foi realizado objetivando avaliar o envolvimento do maruim na transmissão do vírus no que tange o ciclo silvestre. A ligação entre os dois ciclos de manutenção do VORO provavelmente é feita pelo próprio homem, que ao se infectar em áreas enzoóticas silvestres retorna aos centros urbanos ainda em período virêmico, tornando-se uma fonte de vírus em potencial para a infecção de novos maruims. O VORO se replica nos tecidos do maruim, que após um período extrínseco de incubação realiza o repasto sanguíneo e infecta novos indivíduos suscetíveis, dando início a uma cadeia de infecção que culmina em epidemias (Pinheiro *et al.*, 2004).

3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DISPERSÃO DAS EPIDEMIAS

Até o momento, os únicos casos de febre por Oropouche, bem como o isolamento do vírus, têm sido registrados e descritos no Brasil, Panamá, Peru e Trinidad. No Brasil, desde o primeiro isolamento do vírus em 1960 até 1980 o VORO causou diversas epidemias, porém restritas ao estado do Pará, atingindo diferentes municípios das mesorregiões Metropolitana de Belém (Belém, Ananindeua, Benfica, Caraparu, Castanhal e Santa Isabel do Pará), Nordeste (Abacetuba, Augusto Correa, Baião, Bragança, Capanema, Curuçá, Tomé-Açu, Vigia, Viseu), Sudeste (Itupiranga), Baixo Amazonas (Belterra, Mojui dos Campos Santarém) e Marajó (Portel). Neste período, apenas a mesorregião Sudoeste do Estado não registrou casos de febre por Oropouche (Pinheiro *et al.*, 1962; 1976; Freitas *et al.*, 1982; Dixon *et al.*, 1981) (Figura 1).

Entre os anos de 1981 e 1996, casos de febre por Oropouche foram registrados tanto no estado do Pará (Oriximiná, mesorregião do Baixo Amazonas; e Altamira, mesorregião Sudoeste) quanto fora do estado nas cidades de Manaus e Barcelos (Amazonas), Mazagão (Amapá), Xapuri (Acre), Ariquemes e Ouro Preto D'Oeste (Rondônia), Porto Franco (Maranhão) e Tocantinópolis (Tocantins) (Le Duc *et al.*, 1981; Pinheiro *et al.*, 1981b; Borborema *et al.*, 1982; Vasconcelos *et al.*, 1989; Pinheiro *et al.*, 1998; Travassos da Rosa *et al.*, 1996) (Figura 1). Em 2003 e 2004, surtos de febre por Oropouche foram registradas nos municípios paraenses de Parauapebas (mesorregião Sudeste) e Porto de Moz (mesorregião do Baixo Amazonas), respectivamente (Azevedo *et al.*, 2007). Em 2006, o VORO voltou a causar epidemias, desta vez em municípios de Maracanã, Igarapé-Açu, Magalhães Barata e Viseu localizados na

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARÍCIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

zona Bragantina do Nordeste paraense, evidenciando a reemergência deste vírus após 26 anos de silêncio epidemiológico na região (Vasconcelos *et al.*, comunicação pessoal, 2007) (Figura 1).



Figura 1

Epidemias de Febre por Oropouche ocorridas nas Américas Central e do Sul entre 1961 e 2006. * Detecção de anticorpos IgM para o VORO e genoma viral em amostras de soros de pacientes clinicamente suspeitos de febre por Oropouche.

A dispersão da virose provavelmente é resultado da movimentação de pessoas em fase virêmica pelas localidades onde existe o vetor transmissor (Pinheiro *et al.*, 2004).

Estudos soropidemiológicos realizados no Brasil e nas Américas indicam que, entre 1961 e 2007, aproximadamente 357000 pessoas tenham sido infectadas pelo vírus. No entanto, estes dados parecem estar subestimados uma vez que a incidência dessa arbovirose não foi computada em importantes epidemias como as ocorridas em Belém no ano de 1968, em Porto Franco (Estado do Maranhão) e Tocantinópolis (Estado do Tocantins) em 1988. Portanto, acredita-se que mais de meio milhão de pessoas residentes na Amazônia Brasileira tenham sido infectadas pelo VORO desde o início da década de 1960 (Freitas *et al.*, 1980; Pinheiro *et al.*, 1981b; 1986; Pinheiro, 1983).

Fora do Brasil, epidemias têm sido registradas no Panamá e no Peru. A epidemia ocorrida no Panamá foi registrada no ano de 1989 no vilarejo de Benjuco localizado aproximadamente a 50 km a oeste da cidade do Panamá, capital do país (Evelia Quiroz, comunicação pessoal, 1989; Pinheiro *et al.*, 2004). No Peru, a febre por Oropouche foi clínica e laboratorialmente documentada no ano de 1992 quando o VORO causou uma epidemia em Iquitos (Chavez *et al.*, 1992; Watts *et al.*, 1997). Duas outras epidemias foram registradas no ano de 1994 nas cidades de Puerto Maldonado e Madre de Dios, ambas pertencentes à Amazônia peruana (Ministério da Saúde do Peru & NAMRID, dados não publicados, 1994). Em 2005, estudos soroepidemiológicos e moleculares realizados em amostras coletadas na província de Jujuy na Argentina demonstraram a presença de anticorpos IgM, bem como do genoma viral, em soros de pacientes febris evidenciando a circulação do vírus na região (Nunes, comunicação pessoal, 2005) (Figura 1).

4. BIOLOGIA MOLECULAR

Mais recentemente, com o advento de estudos moleculares direcionados ao seqüenciamento nucleotídico do gene N (segmento SRNA) de 55 cepas do VORO isolados de diferentes regiões das Américas do Sul e Central (Brasil, Peru, Panamá e Trinidad), de diferentes hospedeiros (humanos, artrópodes, primatas não-humanos e preguiças), bem como durante diferentes períodos de tempo (de 1955 a 2007) (Tabela 1) (Saeed *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007), pode-se demonstrar a presença de pelo menos três distintos genótipos do VORO (I, II e III) que circulam nas Américas Central e do Sul (Saeed *et al.*, 2000). Em Trinidad, apenas o genótipo I foi detectado, enquanto que no Peru apenas o genótipo II foi descrito. No Brasil, inicialmente apenas o genótipo I e II foram detectados com circulação ativa, sendo o genótipo I mais predominante na região da Amazônia ocidental e o genótipo II, na Amazônia oriental (Saeed *et al.*, 2000). Em 2000, uma cepa do VORO isolada de um novo hospedeiro (*Callithrix* sp) no estado de Minas Gerais, na região Sudeste do Brasil, foi identificada como pertencente ao genótipo III, genótipo até então encontrado somente no Panamá, sugerindo um possível potencial de dispersão a regiões mais populosas e suscetíveis (Nunes *et al.*, 2005). Entre os anos de 2003 e 2004, duas epidemias de febre do Oropouche ocorreram nos municípios de Parauapebas e Porto de Moz, respectivamente (Azevedo *et al.*, 2007), e, mais recentemente, em 2006, nova epidemia foi registrada na região bragantina do estado do Pará, atingindo os municípios de Igarapé Açu, Maracanã, Magalhães Barata e Viseu (Vasconcelos *et al.*, comunicação pessoal, 2007, dados não publicados). A análise genética das cepas isoladas entre 2003 e 2006, identificou a presença do genótipo II na Amazônia Ocidental (Município de Porto de Moz), previamente encontrado somente no Peru e na região oeste da Amazônia Brasileira (Figura 2).

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARICIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Tabela 1

Cepas do vírus Oropouche utilizadas para a análise filogenética de acordo com o local, ano de isolamento e hospedeiro.

Cepa viral	Hospedeiro	Amostra	Ano	Localidade (Cidade/Estado/País)	Legenda	Nº de acesso ao GenBank
TRVL 9760	humano	sangue	1955	Trinidad	Trinidad 55	AF164531
BeAn 19991	<i>Bradypus trydactylus</i>	sangue	1960	São Miguel-Pará	Brasil 60	AF164532
AR 136921	<i>Culex (Culex) fatigans</i>	lote	1968	Belém-Pará	Brasil 68	NR
BeH 271815	humano	sangue	1975	Santarém-Pará	Brasil 75	AF164533
BeAn 206119	<i>Bradypus trydactylus</i>	sangue	1971	Maracanã-Pará	Brasil 71a	AY993909
BeAn 208402	<i>Bradypus trydactylus</i>	sangue	1971	Maracanã-Pará	Brasil 71b	AY993910
BeAn 208819	<i>Bradypus trydactylus</i>	sangue	1971	Maracanã-Pará	Brasil 71c	AY993911
BeAn 208823	<i>Bradypus trydactylus</i>	sangue	1971	Maracanã-Pará	Brasil 71d	AY993912
BeH 390233	humano	sangue	1980	Manaus-Amazônas	Brasil 80c	AF164536
BeH 381114	humano	sangue	1980	Belém-Pará	Brasil 80b	AF164535
BeH 379693	humano	sangue	1980	Castanhal-Pará	Brasil 80a	AF164534
BeH 472200	humano	sangue	1988	Porto Franco-Maranhão	Brasil 88a	AF164537
BeH 472204	humano	sangue	1988	Tocantinópolis-Tocantins	Brasil 88b	AF164538
BeAr 473358	<i>Culicoides paraensis</i>	lote	1988	Porto Franco-Maranhão	Brasil 88c	AF164539
BeH 475248	humano	sangue	1988	Tucuruí-Pará	Brasil 88d	AF164540
GLM 444477	humano	sangue	1989	Panama	Panama 89a	AF164555
GLM 444911	humano	sangue	1989	Panama	Panama 89b	AF164556
GLM 445252	humano	sangue	1989	Panama	Panama 89c	AF164557
GLM 450093	humano	sangue	1989	Panama	Panama 89d	AF164558
BeH 505514	humano	sangue	1991	Santa Isabel-Pará	Brasil 91a	AF164541
BeH 505442	humano	sangue	1991	Ouro Preto D'Oeste-Rondônia	Brasil 91b	AF164542
BeH 505663	humano	sangue	1991	Ariquemes-Rondônia	Brasil 91c	AF164543
IQT 1690	humano	sangue	1992	Peru	Peru 92	AF164549
MD 023	humano	sangue	1993	Peru	Peru 93a	AF164550
DEI 209	humano	sangue	1993	Peru	Peru 93b	AF164551
BeH 521086	humano	soro	1993	Barra do Corda-Maranhão	Brasil 93	AY704559
BeH 541863	humano	sangue	1996	Altamira-Pará	Brasil 96a	AF164544
BeH 543033	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96b	AF164545
BeH 544552	humano	sangue	1996	Brasil Novo-Pará	Brasil 96c	AF164546
BeH 543087	humano	sangue	1996	Xapuri-Acre	Brasil 96d	AF164547
BeH 543618	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96e	AF164548
BeH 543733	humano	serum	1996	Oriximiná-Brasil	Brasil 96f	AY704560
BeH 543745	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96g	NR
BeH 543854	humano	soro	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 h	NR
BeH 543880	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 i	NR
BeH 543790	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 j	NR
BeH 543638	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 k	NR
BeH 543629	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 L	NR
BeH 543735	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 m	NR
BeH 543857	humano	sangue	1996	Oriximiná-Pará	Brasil 96 n	NR
IQT 4083	humano	sangue	1997	Peru	Peru 97	AF164552
01-812-98	humano	sangue	1998	Peru	Peru 98a	AF164553
IQT 7085	humano	sangue	1998	Peru	Peru 98b	AF164554
BeAn 626990	<i>Callithrix sp</i>	viscera	2000	Arinos- Minas Gerais	Brasil 00	AY117135
BeH 622544	humano	sangue	2002	Paraná-Tocantins	Brasil 02	EF 467368
BeH 669314	humano	sangue	2003	Parauapebas-Pará	Brasil 03a	EF467370
Be H 669315	humano	sangue	2003	Parauapebas-Pará	Brasil 03b	EF467369
BeH 682426	humano	sangue	2004	Porto de Moz-Pará	Brasil 04a	EF467371
BeH 682431	humano	sangue	2004	Porto de Moz-Pará	Brasil 04b	EF 467372
IÇU 486	H 706890	soro	2006	Igarapé-Açu-Pará	Brasil 06 f	NR
IÇU 489	H 706893	soro	2006	Igarapé-Açu-Pará	Brasil 06d	NR
MCN 3860	H 707157	soro	2006	Maracanã-Pará	Brasil 06 a	NR
MCN 3862	H 707159	soro	2006	Maracanã-Pará	Brasil 06 b	NR
MAB 65	H 707289	soro	2006	Magalhães Barata-Pará	Brasil 06 c	NR
MAB 126	H 708139	soro	2006	Magalhães Barata-Pará	Brasil 06e	NR

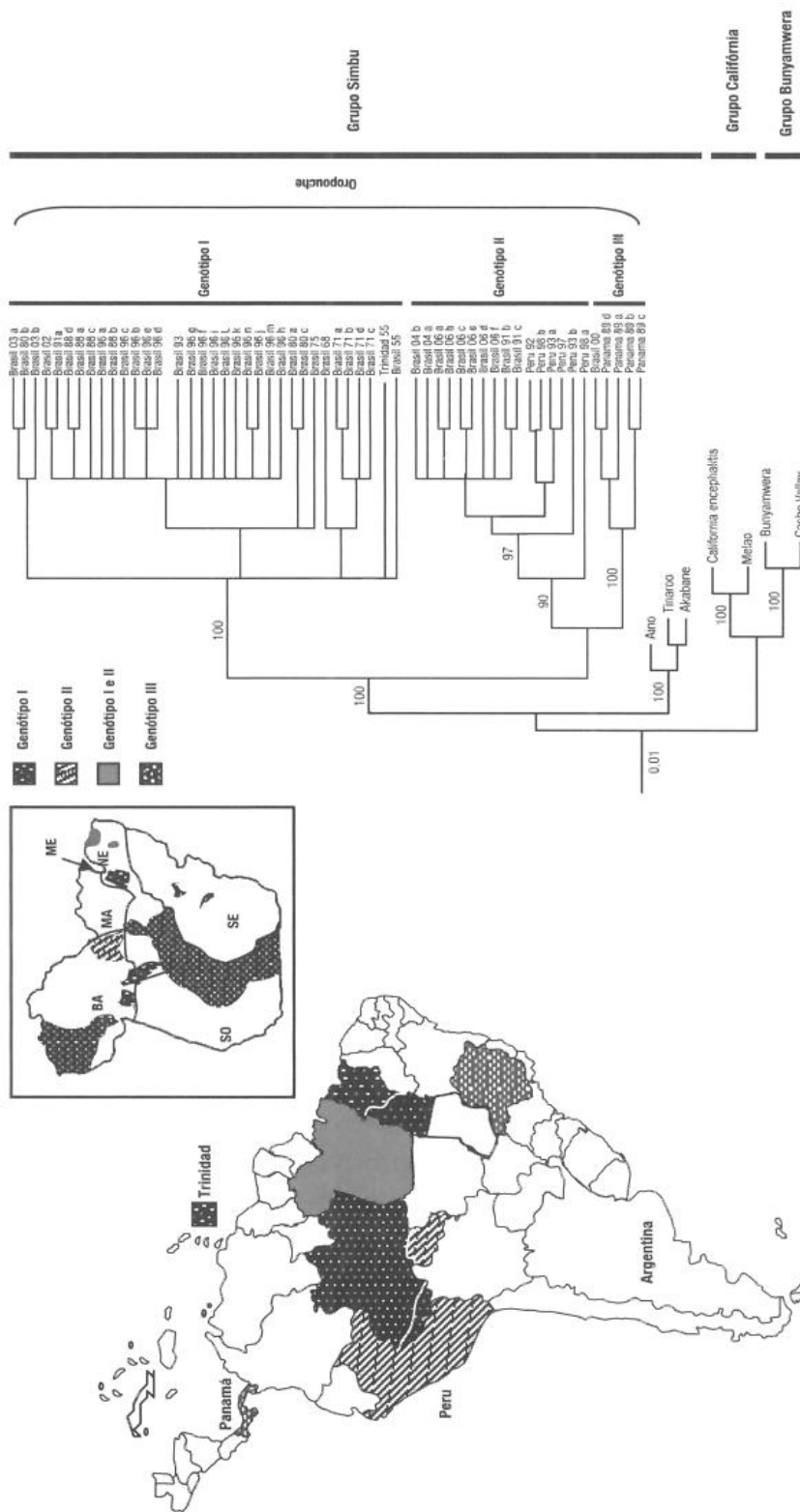


Figura 2
 Filogenia do vírus Oropouche e outros orthobunyavirus pertencentes aos grupos Simbu, Califórnia e Bunyamwera construída pelo método de Máxima Parcimônia. A distribuição geográfica dos genótipos I, II e III pode ser observada no mapa. Valores de *bootstrap* encontram-se acima do nó de cada grupo principal. O valor da escala (0,01) corresponde a 10% de divergência nucleotídica.

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARÍCIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

5. DISCUSSÃO

Em mais de cinco décadas desde o isolamento original, o VORO vem causando epidemias e infectando dezenas de milhares de pessoas em diferentes centros urbanos localizados em regiões tropicais e subtropicais das Américas do Sul e Central. Os diversos estudos soropidemiológicos e de patologia experimental realizados durante este período ajudaram a elucidar e definir aspectos importantes a respeito do agente etiológico, tais como ciclos de transmissão, distribuição geográfica, prevalência de anticorpos, aspectos clínicos da doença, além de evidenciar o real potencial epidêmico do VORO como um importante patógeno humano (Pinheiro *et al.*, 1962; 1976; 1981a; 1998; Araújo *et al.*, 1979; Freitas *et al.*, 1980; 1982; Dixon *et al.*, 1981; Le Duc *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981; Borborema *et al.*, 1982; Vasconcelos *et al.*, 1989; Hoch *et al.*, 1990; Travassos da Rosa *et al.*, 1996).

O conhecimento a respeito da diversidade genética do vírus pôde ser ampliado com a utilização de técnicas moleculares de detecção do genoma e sequenciamento nucleotídico. Atualmente, sabe-se que pelo menos três diferentes genótipos do VORO circulam ativamente nas Américas. Diferentemente de Trinidad, Peru e Panamá, onde apenas os genótipos I, II e III circulam (Saeed *et al.*, 2000), respectivamente, no Brasil as três diferentes linhagens têm sido encontradas (Nunes *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007).

Em termos evolutivos, os dados filogenéticos disponíveis até o momento nos sugerem que o VORO constitui um grupo monofilético, ou seja, um grupo que apresenta um único ancestral quando comparado a outros arbovírus pertencentes ao grupo Simbu (grupo sorológico ao qual o VORO está antígenicamente relacionado) e a outros membros do gênero *Orthobunyavirus*. É importante observar que as cepas brasileiras isoladas na Amazônia oriental (Pará, Amapá, Tocantins e também o estado do Maranhão) em sua maioria são mais geneticamente relacionadas às cepas de Trinidad (genótipo I), enquanto que as cepas isoladas na região ocidental da Amazônia Brasileira (Acre, Amazonas e Rondônia) são predominantemente mais semelhantes às cepas isoladas no Peru (genótipo II), que sugerem prováveis origens evolutivas diferentes para os genótipos brasileiros.

Outra observação importante refere-se à introdução de genótipos previamente restritos a determinadas regiões geográficas das Américas ou da Amazônia Brasileira em outras áreas aonde tais linhagens não eram detectadas. Como exemplo, podemos citar o genótipo III, detectado previamente somente no Panamá e atualmente encontrado no Brasil no estado de Minas Gerais (Nunes *et al.*, 2005). Do mesmo modo, o genótipo II, detectado somente no Peru e em certos estados da Amazônia Brasileira ocidental (Acre e Rondônia), recentemente foi encontrado na Amazônia oriental (Estado do Pará).

Estes fatos podem estar fortemente relacionados à facilidade de deslocamento de indivíduos infectados com um dado genótipo durante a fase virêmica de uma região endêmica para outra, ou numa forma de tráfico de vírus semelhante ao que tem sido sugerido para o vírus da febre amarela (Vasconcelos *et al.*, 2004). Outra possibilidade seria o deslocamento natural de hospedeiros preferenciais do VORO (preguiça, macacos e aves silvestres) em fase virêmica, ou por meio de atividades ilegais de tráfico de animais silvestres, o que é muito comum na região Amazônica.

Em relação à origem evolutiva da cepa do VORO isolada na região Sudeste do Brasil e identificada como genótipo III, filogeneticamente a mesma é relacionada às cepas panamenhas. Estudos utilizando a associação de dados genéticos aos epidemiológicos proporcionaram um melhor entendimento a respeito da epidemiologia molecular deste importante patógeno humano e novos estudos adiante, nos permitirão descrever com maior precisão a dinâmica evolutiva deste vírus no que tange à origem das cepas brasileiras, bem como à dispersão dos genótipos circulantes na Amazônia. Esses mesmos estudos servem também para verificar a possibilidade de rearranjo genético entre as cepas como mecanismo de biodiversidade deste agente viral, fato comum entre vírus de RNA com genoma segmentado, como é o caso do VORO, o que, aliás, já foi demonstrado para membros dos grupos sorológicos Simbu (Jatobal), Bunyamwera (Ngari) e para certos orthobunyavírus do grupo C (Saeed *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2005; Briese *et al.*, 2006). Portanto, certamente novas informações serão geradas a partir da associação de estudos soropidemiológicos e moleculares utilizando as cepas do VORO disponíveis na coleção de vírus da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC.

* Agradecimentos: Os autores são gratos a diversos pesquisadores que há várias décadas têm se dedicado ao estudo do vírus Oropouche, em particular os Dr. Francisco de Paula Pinheiro e Amélia Paes de Andrade Travassos da Rosa, bem como às diversas equipes de técnicos do Instituto Evandro Chagas pelas atividades de campo e de laboratório, que muito contribuíram para o entendimento dos aspectos epidemiológicos e moleculares desse arbovírus. Esse trabalho também foi apoiado com recursos do CNPq (processo 300460/2005-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C.; SPENCE, L.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 10, p. 574 - 578, Jul., 1961.
- ARAÚJO, R.; PINHEIRO, F. P.; ARAÚJO, M. T.; PETERES, D. A.; DIAS, L. B. Patogenia das lesões hepáticas na infecção experimental com o vírus Oropouche

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARÍCIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

(BeAn 1991): análise comparativa das curvas virêmicas e de infectividade com as alterações ultra-estruturais. *Hiléia Médica*. Belém, v. 1, p. 7 - 12, 1979.

AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; CHIANG, J. O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H. B.; PINTO, A. Y. N.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, H. A. O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 13, n. 6, p. 912 - 915, 2007.

BISHOP, D. H. L.; SHOPE, R. E. Bunyaviridae. In: FRAENKEL-CONRAT, H.; WAGNER, R. R. (Ed.). *Comprehensive virology*. New York: Plenum Press, v. 14, p. 1 - 156, 1979.

BORBOREMA, C. A.; PINHEIRO, F. P.; ALBUQUERQUE, B. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; DA ROSA, J. F.; DOURADO, H. V. Primeiro registro de epidemia causada pelo vírus Oropouche no estado do Amazonas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. São Paulo, v. 24, n. 3, p. 132 - 139, 1982.

BRIESE, T.; BIRD, B.; KAPOOR, V.; NICHOL, S. T.; LIPKIN, W. I. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *Journal of Virology*. v. 80, n. 11, p. 5627 - 5630, 2006.

CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILIPS, I. Fiebre de Oropouche em Iquitos: reporte preliminar de 5 casos. *Revista de Farmacología y Terapéutica*. v. 2, n. 1 p. 12 - 14, 1992.

DIXON, K. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; LLEWELLYN, C. H. Oropouche vírus. II. Epidemiological observation during an epidemic in Santarém, Pará, Brazil, in 1975. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 30, n. 1, p. 161 - 164, 1981.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. *Virus taxonomy - eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 1164p.

FREITAS, R. B.; PINHEIRO, F. P.; SANTOS, M. A. V.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; FREITAS, E. N. Epidemia de Vírus Oropouche no leste do estado do Pará, 1979. *Revista da Fundação SESP*. Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 59 - 72, 1980.

_____. Epidemia de vírus Oropouche no leste do Estado do Pará, 1982. In: PINHEIRO, F. P. (Ed.). *Internacional Symposium on Tropical Arboviruses and Hemorrhagic fevers*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1982, p. 419 - 439.

HOCH, A. L.; ROBERTS, D. R.; PINHEIRO, F. P. Host-seeking behavior and sensorial abundance of *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v. 6, p. 110 - 114, 1990.

KARABATSOS, N. (ed.). *International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*. 3rd ed., San Antônio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1985. 1147p.

LE DUC, J. W.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Epidemic Oropouche vírus disease in northern Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. v. 15, p. 97 - 103, 1981.

LINLEY, J. R.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. *Journal of Medical Entomology*. v. 20, n. 4, p. 347 - 364, 1983.

NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S.; DA ROSA, A. P.; VASCONCELOS, P. F. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 11, n. 10, p. 1610 - 1613, 2005.

PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*. v. 12, n. 1, p. 13 - 23, 1962.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; BENSABATH, G. An outbreak of Oropouche disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brasil. *Tropenmedizin und Parasitologie*. Germany, v. 27, p. 213 - 223, 1976.

PINHEIRO, F. P.; HOCH, A. L.; GOMES, M. L. C.; ROBERTS, D. R. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 30, n. 1, 172 - 176, 1981a.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ISHAK, R.; FREITAS, R. B.; GOMES, M. L.; LE DUC, J. W.; OLIVIA, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 30, n. 1, p. 149 - 160, 1981b.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GOMES, M. L. C.; LE DUC, J. W.; HOCH, A. L. Transmission of Oropouche virus from man to hamsters by midge *Culicoides paraensis*. *Science*. v. 215, n. 4537, p. 1251 - 1253, 1982.

PINHEIRO, F. P. Febre do Oropouche. *Jornal Brasileiro de Medicina*. v. 44, n. 4, p. 46 - 62, 1983.

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. *Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*.

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARICIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Belém: Instituto Evandro Chagas/Fundação Serviços de Saúde Pública, p. 349 - 357, 1986.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviral zoonoses of central and South América. Part G. Oropouche fever. In: BERAN, G. W. (Eds): *Handbook of Zoonoses*. 2. ed. Boca Raton: C.R.C. Press, 1994. p. 214 - 217.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and the neighbor countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 186 - 192.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever. In: FEIGIN, R. D. (Ed.). *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5. ed., Philadelphia: Editora Saunders, 2004. p. 2418 - 2423.

ROBERTS, D. R.; HOCH, A. L.; DIXON, K. E.; LLEWELLYN, C. H. Oropouche virus. III. Entomological observations from three epidemics in Pará, Brazil, 1975. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 30, n. 1, p. 165 - 171, 1981.

SAEED, M. F.; WANG, H.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; WEAVER, S. C.; SHOPE, R. E.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T. Nucleotides sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of the Oropouche virus. *The Journal of General Virology*. v. 81, n. 3, p. 743 - 748, 2000.

SAEED, M. F.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 7, p. 2445 - 2452, 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; MAGALHÃES, M. T. F. TRAVASSOS DA ROSA J. F. S.; VASCONCELOS P. F. C. Epidemia de febre do Oropouche em Serra Pelada, Município de Curionópolis, Pará, 1994. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 29, p. 537 - 541, 1996.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; GUERREIRO, S. C.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 31, p. 271 - 278, 1989.

MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES, HELENA BALDEZ VASCONCELOS, DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS, SUELI GERREIRO RODRIGUES, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA AZEVEDO, JANNIFER OLIVEIRA CHIANG, LIVIA CARÍCIO MARTINS, PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Belém: Instituto Evandro Chagas/Fundação Serviços de Saúde Pública, p. 349 - 357, 1986.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviral zoonoses of central and South América. Part G. Oropouche fever. In: BERAN, G. W. (Eds): *Handbook of Zoonoses*. 2. ed. Boca Raton: C.R.C. Press, 1994. p. 214 - 217.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and the neighbor countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 186 - 192.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever. In: FEIGIN, R. D. (Ed.). *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5. ed., Philadelphia: Editora Saunders, 2004. p. 2418 - 2423.

ROBERTS, D. R.; HOCH, A. L.; DIXON, K. E.; LLEWELLYN, C. H. Oropouche vírus. III. Entomological observations from three epidemics in Pará, Brazil, 1975. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 30, n. 1, p. 165 - 171, 1981.

SAEED, M. F.; WANG, H.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; WEAVER, S. C.; SHOPE, R. E.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T. Nucleotides sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of the Oropouche vírus. *The Journal of General Virology*. v. 81, n. 3, p. 743 - 748, 2000.

SAEED, M. F.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T. Diagnosis of Oropouche vírus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 7, p. 2445 - 2452, 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; MAGALHÃES, M. T. F. TRAVASSOS DA ROSA J. F. S.; VASCONCELOS P. F. C. Epidemia de febre do Oropouche em Serra Pelada, Município de Curionópolis, Pará, 1994. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 29, p. 537 - 541, 1996.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; GUERREIRO, S. C.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 31, p. 271 - 278, 1989.

VASCONCELOS, P. F. C.; BRYANT, J. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TESH, R. E.; RODRIGUES, S. G.; BARRETT, A. D. T. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 10, n. 9, p. 1578 - 1584, 2004.

WATTS, D. M.; PHILLIPS, I.; CALLAHAN, J. D.; GRIEBENOW, W.; HYAMS, K. C.; HAYES, C. G. Oropouche virus transmission in the Amazon river basin of Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 56, n. 2, p. 148 - 152, 1997.

ANEXO D – CÓPIA DE ARTIGO: OROPOUCHE FEVER EPIDEMIC IN NORTHERN BRAZIL: EPIDEMIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATES

Journal of Clinical Virology 44 (2009) 129–133



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv



Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates

Helena B. Vasconcelos, Raimunda S.S. Azevedo, Samir M. Casseb, Joaquim P. Nunes-Neto, Jannifer O. Chiang, Patrick C. Cantuária, Maria N.O. Segura, Lívia C. Martins, Hamilton A.O. Monteiro, Sueli G. Rodrigues, Márcio R.T. Nunes, Pedro F.C. Vasconcelos*

Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Belém, Pará State, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2008
Received in revised form
13 November 2008
Accepted 15 November 2008

Keywords:
Oropouche fever
Epidemic
Re-emergence
Epidemiology
Molecular characterization

ABSTRACT

Background: Oropouche fever virus is an important arbovirus associated with febrile disease that re-emerged in 2006 in several municipalities of Pará State, Bragantina region, Amazon, Brazil, 26 years after the last epidemic.

Objective: To investigate an Oropouche fever outbreak in this region.

Study design: A serologic survey and prospective study of acute febrile cases were performed in Magalhães Barata (urban and rural areas) and Maracanã (rural area) municipalities. Serology (IgM-ELISA and hemagglutination-inhibition [HI]), virus isolation, RT-PCR and real-time-PCR were used to confirm *Oropouche virus* (OROV) as responsible for the febrile outbreaks.

Results: Real-time-PCR showed high titers of OROV in acute-phase serum samples from febrile patients. From 113 of 119 acutely febrile patients with paired serum samples, OROV infections was confirmed by serologic conversion ($n = 76$) or high titers ($n = 37$) for both HI and IgM-ELISA. Patients had a febrile disease characterized by headache, chills, dizziness, photophobia, myalgia, nausea, and vomiting. Females and children under 15 years of age were most affected. Nucleotide sequencing of six OROV isolates identified that genotype II was associated with the human disease epidemic.

Conclusions: Oropouche fever, which has re-emerged in the Bragantina region in eastern Amazon 26 years after the last epidemic, is caused by genotype II, a lineage previously found only in Peru and western Brazil.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oropouche virus (OROV), a single-stranded, negative sense RNA virus of *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*,¹ which is the etiologic agent of Oropouche fever, is transmitted between humans in urban areas by the biting midge, *Culicoides paraensis*.^{2,3}

OROV was first isolated in the Brazilian Amazon in 1960 from the blood of a sloth (*Bradypus trydactylus*), following its original isolation in Vega de Oropouche County in Trinidad in 1954.⁴ Its epidemic potential was recognized during an outbreak in Belem, Pará state (Brazil) in 1961, where approximately 11,000 people were infected.⁵ Dozens of epidemics of Oropouche fever were recorded over the next 45 years in Northern South America, with an estimated half million cases.³ Oropouche fever and OROV have been recognized in Trinidad, Panama, Peru and Brazil, and as an impor-

tant public health concern in tropical areas of Central and South America.³

Members of the genus *Orthobunyavirus* have a tripartite, single-stranded, negative sense RNA genome. The segments small (S), medium (M), and large (L) encode the nucleocapsid, the glycoproteins, and the RNA polymerase, respectively. Phylogenetic analysis of the nucleocapsid (N) gene of different OROV strains has defined three distinct genotypes (I, II and III) currently circulating in Central and South America; genotypes I and II have been previously detected in the Brazilian Amazon.^{8,9}

In the current study, we report an epidemic in the Magalhães Barata municipality that spread to neighboring municipalities of Igarapé Açu, Maracanã, and others within eastern Pará State, an area that has not had an Oropouche fever epidemic since 1981.

2. Materials and methods

2.1. Study sites

Magalhães Barata situated in the Bragantina region of Pará state, is about 138 km east of Belém (Fig. 1). It has approximately

* Corresponding author at: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ave. Almirante Barroso 492, CEP 66093-020, Belém, Pará, Brazil. Tel.: +55 91 3217 3109; fax: +55 91 3226 5262.
E-mail address: pedrovasconcelos@iec.pa.gov.br (P.F.C. Vasconcelos).



Fig. 1. Map showing the municipalities stricken with outbreaks of Oropouche fever in South America, including the Pará State and Bragançinha region where Oropouche fever outbreaks were recognized in 2006.

6000 inhabitants, 2000 of them in the urban area. The climate is tropical, with high temperatures ranging from 22 °C to 35 °C, and the rainy season occurring between January and July that brings 2000–2800 mm of rainfall per year. The main productive activities include cattle grazing, fishing, and cultivation of manioc, pepper, and other specialties. Many people live under poor conditions. Maracanã municipality (47°32'W; 0°42'S) is located in the same region and is 163 km from Belém. Of its 35,000 inhabitants, 17,000 of them live in the urban area. Productive activities are similar to those of Magalhães Barata municipality.

2.2. Collection of samples

Between 29 May through 30 June, 2006, 651 and 93 serum samples were obtained from residents of Magalhães Barata, and Maracanã municipalities, respectively as follows: 231 and 47 were from patients reporting an acute disease with fever lasting up to 5 days; from 119 patients (95 of Magalhães Barata and 24 of Maracanã), convalescent phase serum samples were also obtained. A serologic survey was also conducted from 465 people (420 from Magalhães Barata and 46 from Maracanã) reporting a febrile illness one to several weeks prior to blood collection.

2.3. Virus isolation

Isolation of virus from acute blood samples was attempted in suckling mice (2 days) using a 1:10 (v/v) suspension of serum samples in phosphate-buffered solution (PBS) pH 7.4 containing

penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) as described elsewhere.¹⁰ 50 and 35 blood samples taken from acute febrile patients from Magalhães Barata and Maracanã, respectively, were used to infect suckling mice. An additional 9 acute febrile blood samples obtained from sick persons from Igarapé Açú municipality were also inoculated in the same system.

2.4. Serological tests

Serum samples were tested by hemagglutination inhibition–HI and IgM-ELISA for detection of specific HI and IgM antibodies to OROV as previously described.^{11,12}

2.5. Molecular characterization of OROV isolates

Six isolates were selected for molecular analysis, two from each municipality as follows: Magalhães Barata (Brazil 2006a, Brazil 2006b); Maracanã (Brazil 2006c, Brazil 2006d); Igarapé Açú (Brazil 2006e, Brazil 2006f). Viral RNA was extracted from Vero cells infected with the human serum samples after showing at least 75% cytopathic effect, and the N gene (SRNA) was amplified using a one-step RT-PCR assay and a pair of primers ORO N5 (AAAGAGGATCCAATAATGTCAGAGTTCATTT) and ORO N3 (GTGAATTCCACTATATGCCAATTCGGAATT) previously described.^{8,9} Phylogenetic trees were constructed for N gene nucleotide sequences using neighbor-joining¹³ and Maximum-Parsimony¹⁴ methods implemented in the programs Mega 2.1¹⁵ and PAUP 4.0.¹⁴ Bootstrap analyses were performed on 1000 replicates

Table 1

Selected OROV strains isolated from different sources, period of time and countries/municipalities in Central and South America used for SRNA phylogenetic analyses of the six isolates obtained in 2006.

Strain	Source of isolation	Sample	Year	Place	Legend	GenBank accession
TRVL 9760	Human	Blood	1955	Trinidad	Trinidad 55	AF164531
GLM 444477	Human	Blood	1989	Panamá	Panamá 89a	AF164555
GLM 444911	Human	Blood	1989	Panamá	Panamá 89b	AF164556
GLM 445252	Human	Blood	1989	Panamá	Panamá 89c	AF164557
GLM 450093	Human	Blood	1989	Panamá	Panamá 89d	AF164558
IQT 1690	Human	Blood	1992	Peru	Peru 92	AF164549
MD 023	Human	Blood	1993	Peru	Peru 93	AF164550
IQT 4083	Human	Blood	1997	Peru	Peru 97	AF164552
01-812-98	Human	Blood	1998	Peru	Peru 98	AF164553
IQT 7085	Human	Blood	1998	Peru	Peru 98	AF164554
BeAn 19991	<i>Bradypus trydactylus</i>	Blood	1960	Brazil	Brazil 60	AF164532
BeH 543733	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96a	AY704560
BeH 543745	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96b	AY704561
BeH 543639	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96c	AY704562
BeH 543629	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96d	AY704563
BeH 543638	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96e	AY704564
BeH 543880	Human	Blood	1996	Brazil	Brazil 96f	AY704565
BeH 505663	Human	Blood	1991	Brazil	Brazil 91a	AF164543
BeH 505442	Human	Blood	1991	Brazil	Brazil 91b	AF164542
BeAn 626990	<i>Callithrix</i> sp.	Viscera	2000	Brazil	Brazil 2000	AY117135
BeH 669314	Human	Blood	2003	Parauapebas	Brazil 2003a	EF467370
BeH 669315	Human	Blood	2003	Parauapebas	Brazil 2003b	EF467369
BeH 682426	Human	Blood	2004	Porto-de-Moz	Brazil 2004a	EF467371
BeH 682431	Human	Blood	2004	Porto-de-Moz	Brazil 2004b	EF467372
BeH 707287	Human	Blood	2006	Magalhães Barata	Brazil 2006a	
BeH 708139	Human	Blood	2006	Magalhães Barata	Brazil 2006b	
BeH 707157	Human	Blood	2006	Maracanã	Brazil 2006c	
BeH 707159	Human	Blood	2006	Maracanã	Brazil 2006d	
BeH 706890	Human	Blood	2006	Igarapé Açu	Brazil 2006e	
BeH 706893	Human	Blood	2006	Igarapé Açu	Brazil 2006f	

Source: Saeed et al., 2000⁸; Nunes et al., 2005⁹; Azevedo et al., 2007.¹⁷

to generate confidence in groupings.¹⁶ The current sequences were compared with OROV N gene sequences available in the GenBank database (Table 1).

3. Results

Fifteen OROV strains were isolated, 9 from Magalhães Barata, 4 from Maracanã, and 2 from Igarapé Açu after inoculation of 94 blood samples in suckling mice. Identification of isolates was done by complement fixation (CF) test as previously described.¹⁰ All virus isolates were confirmed by PCR.

From 136 residents in Magalhães Barata with an acute febrile disease (up 5 days of onset) from whom a blood sample was taken, 52 were from the urban area and 84 from rural areas, a total of 38 (73%) and 54 (64.3%) were positive by HI and IgM-ELISA tests, respectively. The number positive by at least one test was 92 (68.1%). From 47 serum samples obtained in Maracanã municipality, with similar characteristics but all of them from rural areas, 32 (66.6%) had HI and anti-OROV IgM antibodies by ELISA.

From 119 patients with paired samples (95 from Magalhães Barata and 24 of Maracanã), 76 serologic conversions were obtained by IgM ELISA and/or HI. Another 37 infections were confirmed by IgM ELISA positive and high HI titers (≥ 320) in both serum samples. Thus 113 (95%) people with paired samples had evidence of recent OROV infection. The age of 112 patients was known. All age groups were affected, but the most and the least affected groups were between 5–14 and ≥ 55 years of age (47.7% and 2.7%, respectively): 57.5% of all positive patients were people under 15 years of age (Table 2).

In both municipalities, patients showing clinical symptoms suggestive of Oropouche fever (Table 3) were predominantly females (57.1%). The symptoms most frequently reported were fever (100%), headache (99.1%), chills (59.3%), and myalgia (46.9%), which is similar to that observed in previous outbreaks.^{2,3,12,20}

Table 2

Distribution of 113 Oropouche fever cases by age groups reported in Magalhães Barata and Maracanã municipalities, Pará State, Brazil, 2006.

Age	Magalhães Barata		Maracanã		Positive (%)
	No. of cases	%	No. of cases	%	
0–4	9	9.8	3	14.3	12 (10.6)
5–14	47	51.1	6	28.6	53 (46.9)
15–24	15	16.3	6	28.6	21 (18.6)
25–34	8	8.7	4	19.0	12 (10.6)
35–44	3	3.3	1	4.8	4 (3.5)
45–54	5	5.4	1	4.8	6 (5.3)
≥ 55	3	3.3	0	0	3 (2.6)
Unk	2	2.2	0	0	2 (1.8)
Total	92	100	21	100	113 (100)

Serologic survey among 465 people reporting febrile disease at least 20–30 days before sampling was undertaken in the urban and rural areas of Magalhães Barata ($n=422$) and rural areas of Maracanã ($n=45$) municipalities. This indicated that 323 (76.7%) had specific HI antibody and 33 (73.3%) had IgM-ELISA antibody.

Table 3

Symptoms and signal presented by 113 Oropouche fever patients from Magalhães Barata and Maracanã municipalities, Pará State.

Symptom/signal	Number of patients	Frequency (%)
Fever	113	100
Headache	112	99.1
Chills	67	59.3
Myalgia	53	46.9
Dizziness	45	39.8
Photophobia	43	38.1
Nausea/vomiting	41	36.3
Joint pains	24	21.2
Epigastric pain	7	6.2
Rash	4	2.5



Fig. 2. Comparative SRNA phylogeny using the NJ method for OROV strains isolated in 2006 in Pará State (in bold) with sequences deposited in the GenBank database. Numbers adjacent to each the three nodes for each main group (I, II and III) represent the percentage bootstrap support calculated for 1000 replicates. Aino virus SRNA sequence was used as an out group. Bar line corresponds to a divergence of 5% in the nucleotide sequence.

Twenty-one (17 and 4, respectively from Magalhães Barata and Maracanã) were only positive by HI, and 16 (15 and 1, respectively) were only positive by IgM-ELISA. The positive test with a single antibody assay on sera from these 37 patients were confirmed by repeat testing.

Based on the overall OROV positivity obtained by serology, virus isolation, and PCR, the estimated incidence for Oropouche fever virus infection was 76.9% in Magalhães Barata (~4000 cases) and 73.3% in the rural area of Maracanã (~13,000 cases), indicating that at least 18,000 cases of OROV infections occurred in the 2006 epidemic of Oropouche fever.

The full-length SRNA of all six OROV strains which were genetically characterized (Table 1) presented 714 nt in length and are predicted to encode two overlapping open reading frames, the nucleocapsid (N) and a non structural (NSs) protein of 693 nt (231 aa) and 273 nt (91 aa), respectively. Furthermore, two small non-coding regions were also found at the 3' and 5' ends from nucleotide positions 1 to 44 and 741 to 754, respectively. Phylogenetic analysis comparing Brazil 2006a–f isolates with other OROV strains from different geographic regions in South and Central America grouped strains of the present epidemic into the same clade of OROV genotype II (Fig. 2).

4. Discussion

Oropouche fever is the most widely distributed arboviral disease in the Brazilian Amazon after dengue fever, and is estimated to have infected at least half a million people since the first epidemic was recognized in 1960. Prior to the 1980 epidemics Oropouche fever was described only in this area.³ OROV has subsequently spread

to other Amazonian states, including Acre (1996), Amapá (1981), Amazonas (1981), Rondônia (1991) and Tocantins (1988); to a non-Amazonian state, as observed in 1988 in Maranhão in the Northeast region^{2,3,12}; and to other countries, such Peru and Panama.^{3,7} In addition, between 1980 and 2005, sporadic cases or self-limited outbreaks of Oropouche fever have been reported in the Brazilian Amazon region and the Peruvian Iquitos region, suggesting silent, endemic circulation of the virus.^{5,7,18,19}

In 2006, several cases of Oropouche fever were detected in at least six municipalities in the Bragantina region, Pará State, an area with 30 municipalities and over one million inhabitants. This region reported a large epidemic between 1979 and 1980, when at least 20 municipalities were affected and 110,000 infections were estimated based on sero-epidemiologic surveys [20]. In the present outbreak, the first cases were recognized in April in Magalhães Barata. Some weeks later cases were detected in June in Igarapé Açu and Maracanã municipalities, and in August in Curuça, Marapanim, and Viseu municipalities. The frequency of cases diminished with the cessation of rain in the Bragantina region.

This epidemic occurred 26 years after the last one²⁰ in the area and apparently was limited by the cessation of rain. Arbovirus epidemics have been temporally associated with rain and other climatic factors that play lead to an increase in the hematophagous insect vectors of arboviruses.^{21–23} In Kenya several Rift Valley fever epidemics were associated with abnormally high rainfall²¹; similar findings were observed during a jungle yellow fever virus epidemic in Central Brazil.²² Environmental changes have been closely associated with arboviral epidemic widespread in Brazilian Amazon. OROV epidemics were associated with deforestation, colonization and unplanned urbanization^{23,24} similar to changes occurring in the

municipalities of Bragantina region involved in the present OROV epidemic, where large areas have been used for agricultural activities.

The overall prevalence of OROV antibodies in Magalhães Barata (76.9%) and Maracanã (73.3%) suggest an occurrence of almost 18,000 infections in the two municipalities. These numbers are of a magnitude observed with serologic surveys in past Oropouche fever outbreaks and probably are underestimated.^{2,5,20}

The 26-year inter-epidemic period probably represents accumulation of OROV-susceptible people, especially among young inhabitants. Another factor is the influx of immigrants. Our survey in Magalhães Barata municipality showed that infection was most frequent among inhabitants aged ≤ 15 years old, which is in accordance with our expectation, since it is believed that many adults were infected and became immune to OROV during the 1979–1980 epidemic. In fact, 57.5% of all people infected during the present epidemic were less than 15 years of age.

OROV genotype II was responsible for the epidemic in all municipalities where OROV was isolated. This genotype had been previously associated with Oropouche fever epidemics in focal western Amazon areas, particularly in Rondônia state, as well as in Peru.⁸ Interestingly, it was the found that this genotype had been isolated in 2004 during a small outbreak in the Taparã county in Porto de Moz municipality, middle Pará State (which is at same distance between western and eastern Amazon region¹⁸ and that it was genetically related to strains isolated in Peru during the 1990s and in Rondônia State in 1991.⁸ This finding demonstrates an apparent intense transit of OROV genotype II across the Amazon region, from western to eastern areas.

Acknowledgments

We are grateful to the Secretaria Municipal de Saúde de Magalhães Barata for logistical assistance, as well as Geraldo M. Santos, Maria dos Anjos, Iveraldo F. da Silva, Maxwell F. de Lima, Basílio S. Buna, and Luiz R.O. Costa for their technical support during field collection, viral isolation process and serologic tests. This work was supported by IEC/SVS/Ministry of Health and the CNPq grant 300460/2005-8.

References

- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press; 2005. p. +1259.
- Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Ishak R, Freitas RB, Gomes MLC, Oliva OFP, Le Duc JW. *Oropouche virus*. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *Am J Trop Med Hyg* 1981;**30**:165–81.
- Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC. Oropouche fever. In: Feigin RD, et al., editors. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 2418–23.
- Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken THG. *Oropouche virus*: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 1961;**10**:574–8.
- Pinheiro FP, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Rev Serv Esp Saúde Públ* 1962;**12**:15–23.
- Azevedo RSS, Souza MRS, Rodrigues SG, Nunes MRT, Buna BS, Leão RNQ, Vasconcelos PFC. Ocorrência endêmica de febre por Oropouche em Belém/PA no período de 2000 a 2001. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;**35**(Suppl. 1):386.
- Watts DM, Phillips I, Callahan JD, Griebenow W, Hyams C, Hayes CG. *Oropouche virus* transmission in the Amazon River basin of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1997;**56**:148–52.
- Saeed MF, Wang H, Nunes MRT, Vasconcelos PFC, Weaver SC, Shope RE, Watts DM, Tesh RB, Barrett ADT. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of *Oropouche virus*. *J Gen Virol* 2000;**81**:743–8.
- Nunes MRT, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo RSS, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC. *Oropouche virus* isolation, Southeast Brazil. *Emerg Infect Dis* 2005;**11**:1610–3.
- Shope RE, Sather GE. In: Lennette EH, Schmidt NJ, editors. *Arboviruses diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. Washington: American Public Health Association; 1979. p. 767–814.
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;**7**:561–73.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Guerreiro SC, Dégallier N, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa APA. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989;**31**:271–8.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;**4**:406–25.
- Swofford DL. *PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4*. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1998.
- Kumar SK, Tamura M, Nei S. *Molecular evolutionary genetic analysis. Version 1.01*. The Pennsylvania State University; 2000.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;**39**:783–91.
- Weidmann M, Rudaz V, Nunes MRT, Vasconcelos PFC, Hufert FT. Rapid detection of human orthobunyaviruses. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:3299–305.
- Azevedo RSS, Nunes MRT, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AYN, Martins LC, Monteiro HAO, Rodrigues SG, Vasconcelos PFC. Reemergence of Oropouche fever in Northern Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**(6):912–5.
- Watts DM, Ramirez G, Cabezas C, Wooster MT, Carrillo C, Chuy M, et al. Arthropod-borne viral diseases in Peru. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editors. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 193–218.
- Freitas RB, Pinheiro FP, Santos MAV, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Freitas EN. Epidemia de Oropouche no leste do Estado do Pará, 1979. In: Pinheiro FP, editor. *International symposium on tropical arboviruses and haemorrhagic fevers*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1982. p. 419–39.
- Linthicum KJ, Anyamba A, Tucker CJ, Kelley PW, Myers MF, Peters CJ. Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science* 1999;**285**:397–400.
- Vasconcelos PFC, Costa ZG, Travassos da Rosa ES, Luna E, Rorigues SG, Barros VLRS, et al. An epidemic of jungle Yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol* 2001;**65**(3):598–604.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence of arboviruses. *Cad Saúde Pública* 2001;**17**:155–64.
- Patz JA, Confalonieri UEC, Amerasinghe FP, Chua KB, Daszak P, Hyatt AD, et al. Human health: ecosystem regulation of infectious diseases. In: Hassan R, Scholes R, Ash N, editors. *Millennium ecosystem assessment: ecosystems and human well-being—volume 1 (current state and trends)*. Washington: Island Press; 2005. p. 391–415.