

ACTIVIDAD DE VIRUS DEL COMPLEJO ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (VEEV) EN ARGENTINA.

ACTIVITY OF VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS COMPLEX VIRUSES (VEEV) IN ARGENTINA.

María B. Pisano¹, Viviana E. Ré¹, Luis A. Díaz¹, Marina Stein², María J. Dantur³, Adrián Farías¹, María P. Sanchez-Seco⁴, Antonio Tenorio⁴, Walter R. Almirón⁵, and Marta S. Contigiani¹.

RESUMEN

El complejo viral Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) emerge periódicamente causando brotes en algunas regiones de América. En Argentina se ha aislado Virus Río Negro (VRN), cepa AG80-663 (subtipo VI de EEEV) de mosquitos y roedores, como también se han detectado anticuerpos en humanos para este subtipo y para el subtipo I. Con el objetivo de detectar circulación VEEV en Argentina, se capturaron mosquitos en las provincias de Chaco y Tucumán. Se los agrupó por especie, lugar y fecha de captura, y se les realizó detección genérica para alfavirus por RT-Nested PCR. Las muestras positivas fueron secuenciadas para posteriores análisis filogenéticos. De los 99 pools analizados en la provincia de Chaco, siete resultaron positivos para alfavirus: seis agruparon con VRN y uno con virus Pixuna (subtipo IV de EEEV) (VPIX). Las Tasas Mínimas de Infección (TMI) mostraron mayor actividad viral en zona rural que en zona urbana. En la provincia de Tucumán se analizaron 139 pools, de los cuales cuatro fueron positivos. Se secuenciaron tres: dos agruparon con VRN y uno con VPIX. Las TMI muestran mayor actividad viral en la especie *Cx. mollis*. Los datos obtenidos en este trabajo confirman la circulación de VRN en Chaco, y demuestran la circulación de VPIX en esa región. En cuanto a Tucumán, esta es la primera detección de VEEV en esta provincia, registrándose circulación de los mismos subtipos que en Chaco. Estos resultados resaltan la importancia de reforzar medidas de vigilancia en la región norte de nuestro país.

Palabras clave: alfavirus, Encefalitis Equina Venezolana, Virus Río Negro, Virus Pixuna, mosquitos, Argentina.

ABSTRACT

Venezuelan Equine Encephalitis complex viruses (VEEV) emerge periodically causing outbreaks in some regions of America. In Argentina it has been isolated Rio Negro Virus (RNV), strain AG80-663 (VEEV subtype VI) from mosquitoes and rodents, as well as human antibodies against subtype VI and I. With the aim to detect VEEV circulation in Argentina, mosquitoes from Chaco and Tucumán provinces were collected. They were grouped by specie, place and date of collection. Each pool was tested for alphavirus detection by RT-Nested PCR. Positive samples were sequenced for phylogenetic analysis. From 99 pools analyzed in Chaco province, 7 were positive for alphavirus: 6 grouped with RNV and one with Pixuna Virus (VEEV subtype IV) (PIXV). Minimum Infection Rates (MIRs) show more viral activity in rural area than urban area. In Tucuman province, there were 139 pools analyzed. Four resulted positive, and three were sequenced: two grouped with RNV and one with PIXV. MIRs show more viral activity in *Cx. mollis* than the other species. Data obtained in this work confirm circulation of RNV in Chaco, and show circulation of PIXV in that region. In Tucumán, this is the first detection of VEEV, with circulation of the same subtypes of Chaco province. These results highlight the importance of enhance surveillance measures on the north region of our country.

Key words: alphavirus, Venezuelan Equine Encephalitis, Rio Negro Virus, Pixuna Virus, mosquitoes, Argentina.

(1)-Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Fac. Cs. Médicas. UNC. Córdoba, Argentina.(2) Instituto de Medicina Regional. UNNE. Chaco, Argentina.(3) INSUE. UNT. Tucumán, Argentina.(4) Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, España.(5) Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, FCEFYN. UNC. Córdoba, Argentina. Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. UNC. Córdoba. Argentina. Enfermera Gordillo Gómez s/n, Ciudad Universitaria. Correo electrónico: pisanomb@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Dentro de los alfavirus aislados en América de importancia médico-veterinaria, se encuentra el complejo antigénico Encefalitis Equina Venezolana (EEV), que consta de seis subtipos (I a VI). El subtipo I, a su vez, posee las variedades IAB, C, D, E y F, y el subtipo III las variedades A, B y C. Epidemiológicamente se clasifican en virus enzoóticos y virus epidémicos/epizoóticos. Los primeros (subtipos ID, IE, IF y II al VI), son transmitidos a través de roedores reservorios por mosquitos en hábitats silvestres y ocasionalmente producen enfermedad en humanos. Sin embargo, recientemente un brote epizoótico en México tuvo como responsable al subtipo IE (1). Las cepas epidémicas/epizoóticas (subtipos IAB y IC) emergen periódicamente en regiones de América Central y el norte de América del Sur (Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú), causando brotes que afectan a humanos y equinos con altas tasas de morbilidad y mortalidad (2).

En Argentina se ha aislado la cepa AG80-663 (subtipo VI) (actualmente denominada Virus Río Negro, VRN, y que sólo circula en nuestro país) a partir de mosquitos (3) y de roedores, la cual ha sido asociada a enfermedad aguda febril (4). Por otra parte, estudios serológicos mostraron la presencia de anticuerpos para virus del subtipo I (aún no aislado en la Argentina) y para VRN, lo que indica que más de un subtipo viral enzoótico es activo en nuestro territorio (5).

Con el objetivo de monitorear actividad del virus EEV en Argentina, se realizó detección del ARN viral mediante RT-Nested PCR genérica para alfavirus en las provincias de Chaco y Tucumán, con posterior secuenciamiento de las muestras positivas y análisis filogenéticos de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron mosquitos en diciembre de 2003 y desde febrero hasta abril de 2004 en la provincia de Chaco (localidades de Monte Ato y Resistencia); y en los meses de marzo, abril, noviembre y diciembre de

2005 y febrero de 2006 en la provincia de Tucumán (San Miguel de Tucumán), mediante trampas de luz tipo CDC complementadas con CO₂. Estos mosquitos fueron transportados en frío hasta el laboratorio, donde fueron identificados bajo microscopio estereoscópico y platina refrigerada, y agrupados en pools de hasta 50 individuos por especie. Cada pool fue triturado en mortero frío con Medio Esencial Mínimo (MEM) estéril, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y gentamicina al 1%, y descontaminado por centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue alícuotado y conservado a -70°C hasta detección viral.

El ARN viral fue extraído con el reactivo Trizol (Invitrogen BRL, Life Technologies, Rockville, MD) de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente se realizó RT-Nested PCR genérica para alfavirus, amplificando un fragmento de la proteína no estructural 4 (nsP4) (6). Las muestras positivas fueron purificadas utilizando el kit comercial Quiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Valencia, Ca, USA) y remitidas para secuenciamiento directo en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas fueron ingresadas en el banco de datos GenBank. Los análisis filogenéticos fueron construidos con el programa Mega versión 4. Las Tasas Mínimas de Infección (TMI) fueron calculadas de la siguiente manera: TMI = número de amplificaciones virales por especie/número total de especímenes testeados de esa especie para un lugar x 1000.

RESULTADOS

Provincia de Chaco

Se analizaron 2057 mosquitos, agrupados en 99 pools, pertenecientes a 33 especies. Siete pools resultaron positivos para alfavirus: 5 de Monte Alto y 2 de Resistencia. Las Tasas Mínimas de Infección (TMI) mostraron más actividad viral en Monte Alto (área rural) que en Resistencia (área urbana) (Tabla I). Seis secuencias, obtenidas de *Culex* (*Cx.*) *coronator*, *Cx. maxi*, *Psorophora* (*Ps.*) *cingulata*, *Ps. spp* y *Ps. varinervis*,

agruparon con VRN (VEEV subtipo VI); y una, obtenida de *Oclerotatus (Oc.) hastatus oligopistus*, agrupó con Virus Pixuna (VPIX) (VEEV subtipo IV) (Figura 1).

Provincia de Tucumán

Se analizó un total de 4700 mosquitos, agrupados en 139 pools, pertenecientes a 16 especies. Cuatro pools resultaron positivos para alfavirus: 2 obtenidos de *Ae. (oc.) scapularis*, uno de *Cx. mollis*, y uno de *Ae. aegypti*. Las TMI muestran una actividad viral mayor en *Cx. mollis* que en las otras especies (Tabla I). Tres pools fueron secuenciados: 2 agruparon con VRN y uno con VPIX (Figura 1).

DISCUSIÓN

Estudios previos en Argentina, llevados a cabo en la provincia de Chaco, postulan *Cx. (Mel.) delponteii* como el principal vector de VRN (Mitchell et al. 1985). Los datos obtenidos en esta investigación muestran presencia de este virus en mosquitos de otras especies. La no detección de VRN en *Cx. (Mel.) delponteii* puede deberse a que se colectaron pocos mosquitos de esta especie, en el caso de la provincia de Chaco, y ninguno en la provincia de Tucumán, en donde no hay registros de circulación de la misma hasta la fecha.

Al momento del comienzo de este estudio, en Argentina se conocía la circulación de VRN en la provincia de Chaco. Nuestros resultados confirman que este virus aún circula en la región. Sin embargo, no hay registros previos de detección de VPIX, siendo éste el primer reporte de su detección molecular en el país. Este virus fue aislado por primera vez en Belem, Brasil, en 1961 (7), y ha sido poco caracterizado.

En cuanto a la provincia de Tucumán, nuestros resultados muestran por primera vez presencia de virus del complejo EEV en mosquitos de esa provincia, coexistiendo circulación de dos subtipos enzoóticos, VRN y VPIX, los mismos detectados en la provincia de Chaco. Esto es de especial importancia ya que se ha observado emergencia de cepas epizoóticas patógenas vía mutación de cepas enzoóticas (por interacción entre dos cepas o por mecanismos genéticos de adaptación a nuevos huéspedes) (Powers et al. 1997).

Los datos informados en este trabajo demuestran la necesidad de desarrollar y/o

reforzar medidas de vigilancia epidemiológica para el virus EEV en la región norte de nuestro país, a fin de conocer su importancia como patógeno en el área, como así también intensificar medidas de control de vectores, no sólo para este virus, sino para las arbovirosis en general.

Teniendo en cuenta que el VRN fue asociado a enfermedad aguda febril durante un brote humano notificado como posible Dengue (4) es recomendable incluir este virus en el diagnóstico diferencial de síndromes febriles.

REFERENCIAS

- 1-González-Salazar D, Estrada-Franco JG, Carrara AS, Aronson JF, Weaver SC. Equine amplification and virulence of subtype IE Venezuelan equine encephalitis viruses isolated during the 1993 and 1996 Mexican epizootics. *Emerg Infect Dis*; 2003, 9:161-168.
- 2-Powers A, Oberste M, Brault A, Rico-Hesse R, Schmura S, Smith J, Kang W, Sweeney W, Weaver S. Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan Equine Encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J Virol*; 1997, 71: 6697-6705.
- 3-Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini, MS, Cropp C, Daffner J, Calisher C, Christensen H. Arbovirus Investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*; 1985, 34 (5): 945-955.
- 4-Contigiani M, Basualdo M, Cámara A, Ramírez A, Díaz G, González D, Medeot S, Osuna D. Presencia de anticuerpos contra virus de la encefalitis equina venezolana subtipo VI en pacientes con enfermedad febril aguda. *Rev Arg Microbiol*; 1993, 25: 244-251.
- 5-Cámara A, Díaz G, Vega V, Basualdo M, Contigiani M. Seroprevalence of antibodies to Venezuelan Equine Encephalitis Complex (subtypes IAB and VI) in humans from General Belgrano island, Formosa, Argentina. *Rev Inst Med Trop S Paulo*; 2003, 45: 201-204.
- 6-Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of

the alphavirus genus. J Virol Meth; 2001, 95: 153-161.

7-Shope RP, Causey OR, Andrade AH, Theiler, M. The Venezuelan Equine Encephalomyelitis complex of group A

arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med Hyg; 1964, 13: 723-727.

Tabla I: Detecciones virales y Tasas Mínimas de Infección por especie y lugar de captura de mosquitos en Argentina durante 2003-2006.

Especie	Origen	Nº Pools	Código	Nº indiv.	TM	Virus	Fecha
<i>Cx.</i>	MA	4	ArgCh96B	80	12,5	RNV	02/2004
<i>coronator</i>	R	1	ArgCh55	46	21,7	RNV	03/2004
<i>Cx. maxi</i>	MA	3		77			
	R	4	ArgCh53	49	20,4	RNV	04/2004
<i>Ps.</i>	MA	1	ArgCh45	1	1000	RNV	12/2003
<i>cingulata</i>	R	0		0			
<i>Ps. spp</i>	MA	1	ArgCh43	14	71,4	RNV	12/2003
	R	0		0			
<i>Ps.</i>	MA	2	ArgCh84	4	250	RNV	12/2003
<i>varinervis</i>	R	0		0			
<i>Oc. h.</i>	MA	3	ArgCh74	49	20,4	PIXV	12/2003
<i>oligopistus</i>	R	1		1			
<i>Ae. (oc.)</i>	SMT	20	ArgSMT121	928	2,2	VRN	11/2005
<i>scapularis</i>							
<i>Cx. mollis</i>	SMT	6	ArgSMT71	54	18,5	VRN	03/2005
<i>Ae.</i>	SMT	6	ArgSMT90	173	5,7	PIXV	12/2005
<i>aegypti</i>							

MA: Monte Alto, R: Resistencia, SMT: San Miguel de Tucumán

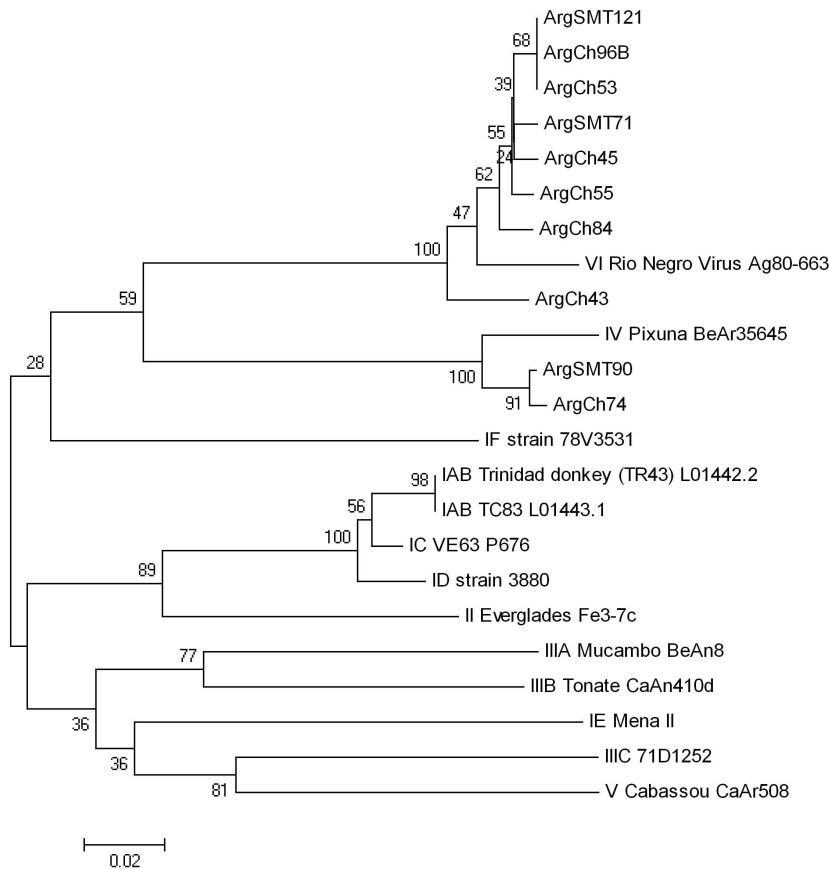


Fig. 1: Árbol consenso analizando un fragmento de 174 nucleótidos (región nsP4 de alfavirus) de las muestras positivas secuenciadas y las cepas prototipo de EEV utilizando el método neighbor joining (parámetro distancia p).