

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE ENCEFALITIS DE SAINT LOUIS EN MOSQUITOS DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

FERNANDO J. BELTRÁN¹, YAMILA I. BECHARA², GUILLERMO G. GUIDO², GABRIEL L. CICUTTIN³,
JUAN B. BEAUDOIN², FEDERICO E. GURY DOHMEN¹

¹Área de Zoonosis Virales, Sección Serología y Pruebas Biológicas, Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (SSPB-IZLP),

²División Acciones Comunitarias para la Salud, IZLP,

³Área de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias Transmitidas por Vectores, SSPB-IZLP, Buenos Aires, Argentina

Resumen Durante el mes de marzo de 2013 una población de palomas torcazas (*Zenaida auriculata*) se instaló en una zona céntrica de la ciudad de Buenos Aires. Conociendo el rol que poseen estas aves como hospedadores competentes del virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV), fue colocada en el lugar una trampa de luz tipo CDC, a fin de realizar una vigilancia entomológica. Durante ese mes, fueron capturados 5 grupos de mosquitos (n = 48), 3 correspondieron a la especie *Culex pipiens* (n = 10) y 2 a *Culex* spp. (n = 38), no pudiéndose determinar en estos últimos con precisión la especie por encontrarse dañados. En un grupo de mosquitos *Culex* spp. se detectó el SLEV por técnicas moleculares. Posteriormente fue secuenciado y clasificado como perteneciente al genotipo III.

Palabras clave: virus encefalitis de Saint Louis, *Culex*, mosquitos

Abstract *Molecular detection of Saint Louis encephalitis virus in mosquitoes in Buenos Aires, Argentina.* During March 2013 a population of eared doves (*Zenaida auriculata*) was established in the center of City of Buenos Aires. Considering the role of these birds as host competent for Saint Louis encephalitis virus (SLEV), a CDC light trap was put in place to perform entomologic surveillance. During this month 5 pools of mosquitoes (n = 48) were collected and taxonomically determined. Three of them were classified as *Culex pipiens* (n = 10) and the other two were *Culex* spp. (n = 38). In this case, the mosquitoes species could not be determined due to that individuals were damaged. One of the *Culex* spp. pool was found to be positive for Saint Louis encephalitis virus by molecular techniques. This was then sequenced and classified as genotype III.

Key words: Saint Louis encephalitis virus, *Culex*, mosquitoes

El virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV) es un arbovirus perteneciente al género *Flavivirus*. Son virus pequeños, que contienen una hebra de ARN de sentido positivo, con genomas de aproximadamente 11 Kb. Se encuentra incluido dentro del serocomplejo de encefalitis japonesa junto con el virus del Oeste del Nilo (WN), entre otros. Todos presentan alta reactividad cruzada entre ellos, lo que suele dificultar el diagnóstico serológico, tanto en humanos como en animales^{1,2}.

Su ciclo de transmisión involucra a especies de mosquitos y a especies de aves Passeriformes como *Passer domesticus* (gorrión), de mayor importancia en el centro-

este de EE.UU.³ y en Argentina por Columbiformes como *Zenaida auriculata* (paloma torcaza) y *Columbina picui* (paloma de la virgen), que experimentan altas viremias convirtiéndolos en reservorios competentes^{4,5}.

La diseminación viral se produce por especies de mosquitos de hábitos crepusculares pertenecientes fundamentalmente al complejo *Culex pipiens*⁶ alimentados de aves que actúan como hospedadores competentes, hacia aves susceptibles, que en viremia, pueden transportar el virus hacia otras áreas geográficas en vuelos migratorios relacionados con la reproducción o con la búsqueda de alimento. Se ha postulado un ciclo de transmisión entre mosquitos y algunas especies de roedores silvestres que podrían jugar un rol similar⁷. Los animales domésticos como caninos y equinos entre otros, no experimentan enfermedad y son considerados huéspedes terminales junto con el hombre, por no contribuir al ciclo de transmisión. En el hombre la enfermedad se presenta

Recibido: 6-III-2014

Aceptado: 19-V-2014

Dirección postal: Méd. Vet. Fernando J. Beltrán, Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Av. Díaz Vélez 4821, 1405 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4983-7300 e-mail: ferbelt@hotmail.com

inicialmente con hipertermia, cefalea, mialgias, náuseas y vómitos, que luego evoluciona en un período variable de días hacia un cuadro neurológico con rigidez de cuello, desorientación témporo espacial, fotofobia, confusión y alteración del lenguaje⁸.

En nuestro país, la especie *Cx. quinquefasciatus* es más abundante en el área norte y centro⁹. En un estudio ecológico realizado en charcos del área metropolitana de Buenos Aires, las especies que fueron encontradas más frecuentemente fueron *Cx. dolosus* y *Cx. eduardoi* durante todo el año, *Cx. maxi* fue más abundante en otoño y *Cx. pipiens* predominó durante el verano, especialmente en febrero¹⁰.

El objetivo del trabajo fue detectar la presencia del SLEV en mosquitos de la ciudad de Buenos Aires, en un área urbana en donde se había instalado una gran población de palomas torcazas, durante el mes de marzo de 2013.

Materiales y métodos

Durante el mes de marzo de 2013, en un área urbana con una gran población de palomas torcazas (*Zenaida auriculata*) (34°35'39"S, 58°23'19"O), se colocó una trampa de luz tipo CDC para la captura de mosquitos. La identificación de los mosquitos se realizó en una platina refrigerada siguiendo la clave sistemática descrita por Darsie y col.¹¹. Los mosquitos fueron agrupados según fecha de captura y especie. Previo a la preparación de los homogenizados, a los ejemplares que se encontraban alimentados se les separó el abdomen.

La extracción del ARN viral se realizó a partir del sobrenadante de los ejemplares mortereados con 1 ml de medio esencial mínimo suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de gentamicina. Posteriormente, se centrifugaron a 12 000 rpm y se procesaron 200 µl del sobrenadante con ZR *Viral RNA Kit* (Zymo Research USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una RT-PCR anidada para una porción del gen de la proteína de envoltura E, siguiendo las indicaciones de Ré y col.¹².

Posteriormente, el producto de la primer ronda de la RT-PCR anidada fue purificado con *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research USA) y secuenciado usando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* de acuerdo al protocolo del fabricante, con un secuenciador automático *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer*.

La secuencia obtenida fue comparada en *BLASTn 2.2.19-Basic Local Alignment Search Tool*¹³. Se confeccionó un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining y los parámetros del modelo de Kimura con un valor de *bootstrap* de 1000 repeticiones, usando el programa MEGA 5.2¹⁴.

Resultados

En total se recolectaron 48 mosquitos, 10 ejemplares fueron identificados como pertenecientes a la especie *Culex pipiens*, mientras que los 38 restantes no se pudieron identificar a nivel de especie por la pérdida de escamas de sus exoesqueletos, clasificándose como *Culex* spp.

Se obtuvieron 5 grupos de mosquitos, 3 grupos correspondieron a la especie *Culex pipiens* con 1, 2 y 7 especímenes y 2 grupos al género *Culex* spp. con 14 y 24 especímenes respectivamente. El grupo de 24 mosquitos identificado dentro del género *Culex* spp. resultó ser positivo por la RT-PCR anidada (Fig.1).

El análisis del fragmento de 947 nucleótidos correspondiente presentó una identidad nucleotídica del 99.5% con las cepas CbaAr-4005 y CbaArg-4006, ambas pertenecientes al genotipo III. La secuencia obtenida en este estudio se encuentra ingresada en el *GenBank* bajo el número KF267887. El árbol filogenético elaborado se presenta en la Fig. 2.

Discusión

EISLEV se halla diseminado desde América del Norte hasta el sur de Argentina. Fue aislado en la provincia de Buenos Aires por primera vez en 1963, a partir de sueros de dos pacientes cursando la fase aguda de la enfermedad. También fue aislado en 1966 a partir de *Calomys musculinus* (cepa Coran 9124) y en 1967 de *Mus musculus* (cepa CorAn 9275), ambas cepas pertenecientes al genotipo VII. En la provincia de Santa Fe, en 1978 y 1979 fueron aislados a partir de mosquitos del complejo *Culex* spp. las cepas 78V-6507 y 79V-2533, pertenecientes a los genotipos V y III respectivamente⁷.

En el año 2005 se produjo un brote de casos humanos en la provincia de Córdoba con 47 casos y 9 muertos, asociados al genotipo III del SLEV determinado por diagnóstico molecular y aislamiento a partir de mosquitos¹⁶. También en el mismo año pudieron detectarse anticuerpos neutralizantes en 4 caninos residentes del área metropolitana de la ciudad de Buenos Aires que no habían viajado a otras localidades¹⁷. En el año 2010 se produjo el primer brote epidémico en la ciudad de Buenos Aires que incluyó a 13 pacientes sintomáticos, y en 2011 se diagnosticó en 2 pacientes inmunodeficientes por HIV. Las técnicas empleadas fueron Mac ELISA para la detección de IgM en suero y LCR, que fue confirmado por seroconversión de muestras pareadas para la detección de anticuerpos neutralizantes a SLEV, empleando un panel de flavivirus para descartar reactividad cruzada con dengue y WN^{8, 18}. Otros autores, en 2007 y 2010 detectaron genoma viral en el suero de dos pacientes con síndrome neurológico, que fueron identificados como pertenecientes al genotipo III¹⁹.

La vigilancia epidemiológica de SLEV en zonas urbanas y suburbanas incluye el estudio de las poblaciones de mosquitos involucradas en su transmisión, ya que estas especies mantienen al virus activo en sus glándulas salivales por períodos mayores que la duración de la viremia en aves, y no se requiere de una gran logística para capturarlos.

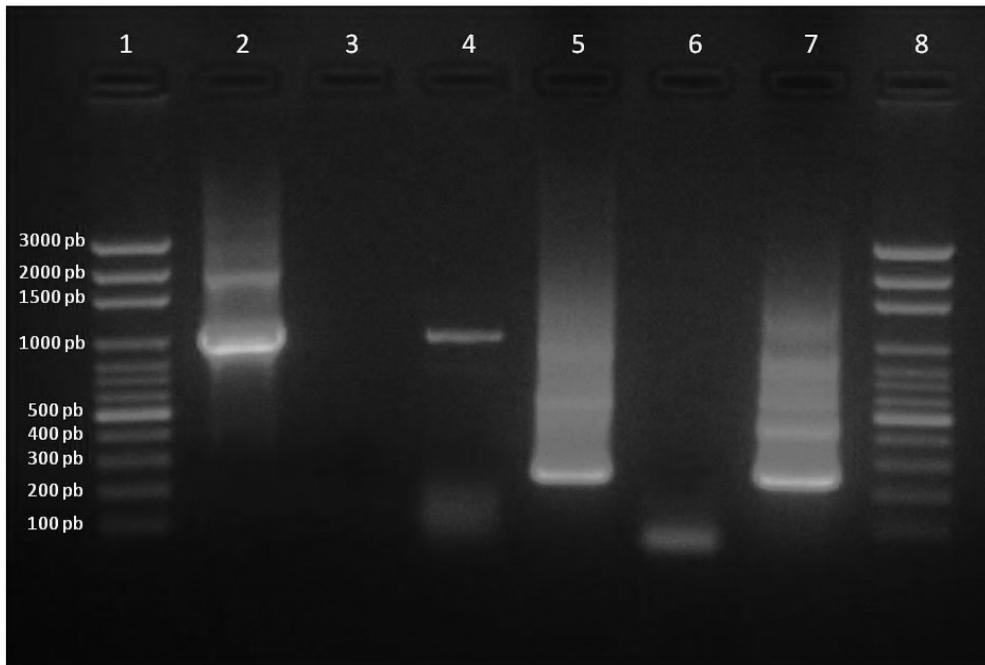


Fig. 1.– Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Calles 1 y 8: marcadores de peso molecular. Primera ronda: calle 2: control positivo (clon cepa 78v6507, genotipo V); calle 3: control negativo (agua DEPC); calle 4: grupo de 24 mosquitos *Culex* spp. PCR anidada: calle 5: control positivo; calle 6: control negativo, y calle 7: grupo de 24 mosquitos *Culex* spp.

En la provincia de Córdoba la enfermedad tiene un comportamiento endémico y es en donde más trabajos se han realizado para intentar comprender el ciclo de transmisión del SLEV en la Argentina. En un estudio realizado entre los años 2001 a 2004 los genotipos circulantes fueron el V, VII y II, encontrados en las especies *Cx. quinquefasciatus*, *Aedes* sp. (*Ochlerotatus* sp.) y sus especies *A. albifasciatus*, *A. scapularis* y *Psorofora ferox*⁶. En otro estudio más reciente realizado en la misma provincia, se evaluó en laboratorio la susceptibilidad de *Cx. quinquefasciatus* a la infección con cepas nativas de SLEV que circulan localmente (78V-6507, genotipo V y Cba Arg-4005, genotipo III), demostrando que las mismas están muy bien adaptadas a esta especie, con tasas de infección de hasta el 90.8%²⁰.

También se ha demostrado como reservorio competente a *Zenaida auriculata* (torcaza) para el Genotipo V, alcanzando viremias entre 2 a 5.5 log (10) unidades formadoras de placa (UFP/ml) durante 1 a 7 días post-inoculación⁴, pero aún no se cuenta con datos sobre el nivel y la duración de las viremias que pueden producir las cepas de genotipo III en esta especie.

Según nuestro conocimiento, no hay publicaciones anteriores de detección de SLEV en mosquitos en la ciudad de Buenos Aires. Nuestro trabajo pone en evidencia

que durante el verano de 2013 el virus estuvo circulando en un área urbana muy poblada de la ciudad de Buenos Aires, a pesar de que la cantidad de mosquitos estudiados no fue elevada.

Según el Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación, durante todo el 2012 y hasta la semana epidemiológica 14^a que finaliza el 30/03/13, solo se confirmaron por laboratorio 3 casos: 1 en la ciudad de Buenos Aires, 1 en la provincia de Buenos Aires y el último en la provincia de Chaco²¹. Estos datos podrían sugerir que en la ciudad de Buenos Aires, a pesar de la gran población de palomas torcazas que se ubicaron en el área del hallazgo, las condiciones ecológicas fueron insuficientes para que se estableciera un ciclo de transmisión sustentable en el tiempo para producir un brote de la enfermedad, como bajo número de aves en viremia, ausencia de la especie más eficiente de *Culex* necesaria para optimizar la infección, condiciones climáticas o ambientales que pudieran disuadir la permanencia de las aves o que no permitieron la proliferación de las poblaciones de mosquitos. Este hallazgo plantea la necesidad de realizar estudios ampliados hacia otras áreas de la ciudad a fin de identificar si existen otras especies de mosquitos que pudieran actuar como diseminadores del genotipo III o de otros genotipos. La vigilancia entomológica - virológica

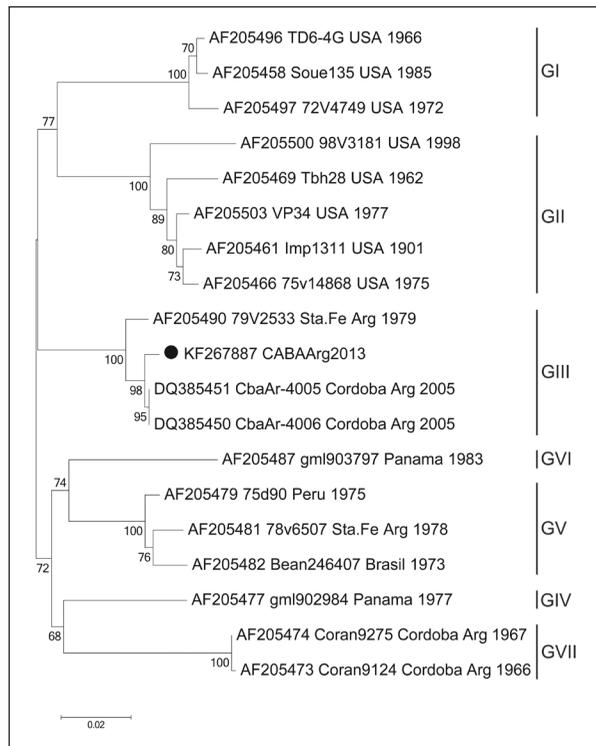


Fig. 2.- Árbol filogenético. Se confeccionó mediante el alineamiento de fragmentos del gen de la proteína de envoltura E de cepas disponibles en el GenBank incluidas en la clasificación de Kramer y Chandler¹⁵ agrupadas por genotipo (GI al GVII) para su comparación, con número de ingreso, nombre, lugar y año de hallazgo. El círculo en negro indica a la secuencia obtenida e informada en este trabajo.

es una herramienta útil en el medio urbano para conocer a las especies de mosquitos involucradas en la transmisión del SLEV, como también el genotipo circulante.

Finalmente, como en otras flavivirus, la aparición de enfermedad será la consecuencia de la interacción de factores biológicos, virales, ambientales y poblacionales.

Agradecimientos: A los Dres. Daniel M. Cisterna y Cristina Lema, Servicio de Neurovirología, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina, por la secuenciación de los productos de PCR. A la Dra. Marta S. Contigiani, Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, por el apoyo técnico y su estímulo a continuar en esta línea de trabajo. Por último, a la Sra. Claudia Inga, del Centro de Información en Salud (CEDOS).

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Morales MA: Zoonosis producidas por arbovirus. En: Cachione R, Durlach R, Larghi O. (eds). Temas de Zoonosis II. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2004, p 65-72.
- Roberson JA, Crill WD, Chang JG. Differentiation of West Nile and St. Louis Encephalitis virus infections by use of no-

ninfectious virus-like particles with reduced cross reactivity. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3167-74.

- Bowen GS, Monath TP, Kemp GE, Kershner JH, Kirk LJ. Geographic variation among St. Louis encephalitis virus strains in the viremic responses of avian host. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 1411-9.
- Díaz LA, Ocelli M, Almeida FL, Almirón WR, Contigiani MS. Eared dove (*Zenaidura macroura*, *Columbidae*) as host for St. Louis encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 277-82.
- Díaz LA, Albréu Llinás G, Vázquez A, Tenorio A, Contigiani MS. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Córdoba, Argentina (2005). *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1489.
- Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv virus Res* 2003; 61: 139-83.
- Sabattini MS, Avilés G, Monta TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae*. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, eds. An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. Belem (Brazil): Instituto Evandro Chagas; 1998, p 113-34.
- Seijo A, Morales A, Poustis G, et al. Brote de Encefalitis de San Luis en el área metropolitana de Buenos Aires. *Medicina (B Aires)* 2011; 71: 211-7.
- Brewer M, Buffá L, Almiron W. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Dipt.: Culicidae) en Córdoba, Argentina. *Rev Per Ent* 1986; 29: 69-72.
- Fischer S, Schweigmann N. *Culex* mosquitoes in temporary urban rain pools: Seasonal dynamics and relation to environmental variables. *J Vector Ecol* 2004; 29: 365-73.
- Darsie RF, Mitchell CJ. The mosquitoes of Argentina. Part I. *Mosq Syst* 1985; 17: 153-253.
- Ré V, Spisanti L, Farías A, Díaz A, Vázquez A, et al. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nestedPCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 10-5.
- En: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; consultado el 30/05/13.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Biol and Evol* 2011; 28: 2731-9.
- Kramer LD, Chandler LJ. Phylogenetic analysis of the Envelope gene of St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol* 2001; 146: 2341-55.
- Díaz LA, Ré V, Almirón WR, et al. Genotype III Saint. Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1752-4.
- Beltran FJ, Aguilar J, Contigiani MS. Primera evidencia serológica de circulación del virus de la encefalitis de San Luis (flavivirus) en caninos de la región metropolitana de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis* 2006; III: 55-7.
- Viloria GA, Kundro MA, Toibaro JJ, Seijo A, Losso MH. Two cases of Saint Louis encephalitis in HIV-1 infected patients in Buenos Aires. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 607-8.
- Valinotto LE, Barrero PR, Álvarez López MC, Mistchenko AS. Molecular evidence of St. Louis encephalitis virus infection in patients in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2012; 54: 349-51.
- Díaz LA, Flores FS, Beranek M, Rivarola ME, Almirón WR, Contigiani MS. Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Córdoba, Argentina. *Trans R Trop Med Hyg* 2013; 107: 332-4.
- En: http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BoletínIntegradoDeVigilancia_N168-SE17.pdf; consultado el 5/03/14.