

Papel del *Rhodnius prolixus* en la transmisión del virus de la encefalitis equina Venezolana.

Alejandro Divo y Gladys Benavides

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad de Carabobo, Apartado Postal 550, Valencia, Venezuela.

Resumen. Se investigó el papel del *Rhodnius prolixus* (chupos) como agente transmisor del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), mediante ensayos con alimentación en pollos en fase virémica y con mezcla sangre-virus, y posterior realimentación sobre ratones recién nacidos. Igualmente se averiguó aspectos relacionados con la persistencia del virus en la especie citada de triatoma, así como la infecciosidad del agente para pollos de corta edad.

Los resultados mostraron que no hubo transmisión directa del virus desde los chipos a los ratones en prueba, indicando un nulo papel del *Rhodnius prolixus* en el ciclo epidemiológico de la EEV. Se comprobó la persistencia del virus en los chipos hasta diez días después de la comida infectiva y una viremia de breve duración y bajo título en los pollos.

The role of *Rhodnius prolixus* in the transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus.

Invest Clin 19(3): 108-115, 1978.

Abstract. The role of *Rhodnius prolixus* as a vector of the Venezuelan encephalitis virus (VEE) fed with both viremic chickens or chicken blood mixed with VEE virus was investigated. Infant mice was used to check the transmission of the virus. The survival of the VEE virus in these bugs and its infection on newly hatched and young chickens was also studied. The results indicated that there was no direct transmission of VEE virus from the bugs to the mice. It is assumed that *R. prolixus* do not play a part in the cycle of infection of VEE. It was also found that the virus survives ten days on the bugs after the infective blood meal. VEE produced a short and low viremia in chickens.

INTRODUCCION

No hay duda de que los hallazgos habidos por distintos investigadores en relación a la ecología y epidemiología del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) son en gran parte coincidentes; pero hay todavía diferencias sustanciales entre ellos que obligan a realizar nuevas búsquedas con el fin de afirmar aspectos para una mejor definición de tan importantes campos.

La significación de esta patología, especialmente por su repercusión en la salud humana, quedó establecida en nuestro país a partir de los brotes habidos en 1962, los que se propagaron con rapidez a extensas zonas del territorio venezolano (1, 2, 13), y aún representa un peligro potencial por la sobrevivencia del virus en la naturaleza (animales reservorios) y la abundancia de insectos transmisores (14).

El papel de los mosquitos en la epidemiología de la encefalitis equina venezolana ha sido bien estudiado (6, 8, 9, 15), pero no así para las aves como lo aprecian Sellers y col. (15) en los brotes ocurridos en Venezuela durante los años 1962-1964. Estudios en mamíferos silvestres y domésticos tenidos como reservorios y amplificadores, aparecen en literatura especializada (4, 5).

Briceno-Rossi (3) da cuenta del aislamiento del virus de la EEV en un pollo y un gallo procedentes de zonas endémicas, pero no en aves silvestres, 131 en total, de diferentes especies capturadas en distintas regiones de Venezuela. No encuentra

viremia en pollos de varias semanas y gallinas inoculadas experimentalmente, pero sí alta susceptibilidad y concentrada viremia en pollitos recién nacidos.

Hruskova y col (10) descubren pequeñas cantidades del virus de la EEV de modo irregular en bazo, hígado, cerebro, bolsa de Fabricio y suero, de pollos de 4-6 semanas, infectados por vía subcutánea, así como muy escasa susceptibilidad al virus en pollos de un día de nacidos. Concluye que por la baja y corta duración de la viremia, los pollos no juegan un importante papel en la transmisión natural del virus de la EEV.

Mangiafico y col (12) en ensayos con el virus de la variedad oeste de Norteamérica (EEO) en Triatominae, comprueba la larga supervivencia del agente en estos insectos y logra en una ocasión -previa rotura de la barrera estomacal por punción aplicada- transmitir el virus a un ratón recién nacido durante el período de alimentación en éste. Estima que tal situación puede ocurrir de modo natural por canibalismo entre Triatominae no alimentados sobre otros que se han atiborrado de sangre. No pudo establecer la infección cuando el *Rhodnius prolixus* no fue puncionado. Los Triatominae no han sido implicados en la transmisión natural del virus de la EEV, no apareciendo literatura alguna al respecto.

La presente investigación va dirigida a estudiar el posible papel del *Rhodnius prolixus* como agente transmisor del virus de la EEV, por

su carácter de insecto hematófago y hábitos alimenticios conocidos en animales domésticos y en el hombre, y su abundancia en nuestro medio rural; como también a comprobar encuentros asociados por otros investigadores, tal como hemos referido, y que revisten importancia en la materia.

MATERIAL Y METODOS

Virus.- Encefalitis equina venezolana, cepa V-38, subgrupo I-A (16, 17) enviada por el Instituto de Investigaciones Veterinarias, Maracay, Venezuela, mediante Protocolo 318 del 14-1-60, y mantenida por pasajes en cerebro de ratones.

Suero inmune.- Preparado en nuestro laboratorio mediante inoculación en conejos según técnica antes descrita (7). Otra muestra fue proporcionada por el Instituto de Investigaciones Veterinarias mencionado, y elaborado en ratones adultos.

Animales de experimentación.- Pollos de un día; una, dos y seis semanas de nacidos, vacunados contra ciertas afecciones propias de la especie, suministrados por Protinal C.A. de Valencia. Ratones blancos de 24 a 48 horas, criados en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Chupos (*Rhodnius prolixus*) de 4a. y 5a. muda, criados y mantenidos en la Cátedra de Parasitología de la misma Facultad.

Medio celular.- Línea estable de riñón de hámster joven (BHK-21/Cl 13), desarrollada en monocapa den-

tro de tubos de Leighton, y llevada a no más de 50 pasajes.

Virulentación vírica.- Efectuada por medio de pasajes del virus de la EEV en huevos embrionados (COFAL), hasta obtener un título de $10^{-8.25}$ DL50 (dosis letal media) en 0,02 ml por vía intracerebral (ic) en ratones recién nacidos, equivalente en ellos a $10^{-7.49}$ DL50 en 0,02 ml vía intraperitoneal, y a $10^{-8.0}$ DTC50/0,1 ml (dosis infectiva media) en cultivo de tejidos.

Infeciosidad del virus de la EEV en pollos.- Se inocularon tres grupos de 6 pollos de un día de nacidos, y de 1, 2 y 6 semanas, por vía subcutánea con 0,1 ml, equivalente a 10^4 DL/ic para ratones de 24-48 horas. Este ensayo se efectuó para comprobar la patogenicidad del virus hacia estas aves, así como también para determinar la aparición y duración de la fase virémica en ellos. La temperatura corporal era tomada por vía rectal dos veces diarias y se hacía extracción de muestra de sangre cada 24 horas. El pool de sueros diarios de cada grupo de aves, se inoculaba separadamente en camadas de ratones recién nacidos.

Primer ensayo para la transmisión del virus de la EEV por Rhodnius.- La alimentación de los insectos era practicada con grupos de chipos sobre pollos de 6 semanas (10 para cada uno) en fase virémica comprobada, durante 10 a 15 minutos. Los insectos se mantenían posteriormente en condiciones ambientales adecuadas de temperatura y humedad, y después se realimenta-

ban en ratones recién nacidos con el propósito de lograr la transmisión del virus adquirido del pollo. Esto último se efectuaba de la siguiente manera: sobre la gasa que cubría los frascos con grupos de 10 chipos, se colocaban los ratones y aquellos insectos que picaban eran retirados de inmediato para extraerles el tubo digestivo, incluyendo glándulas salivales, y comprobar en pools la existencia del virus de la EEV, lo que se hacía tratando el contenido digestivo en solución de Hanks con doble concentración de antibióticos, y posterior inoculación en ratones de 24-48 horas de nacidos. El material combinado se guardaba en refrigeración por 12 horas, y posterior centrifugación en frío a 3.500 rpm durante 20 min, para tomar el sobrenadante, el cual se sometía a control bacteriológico y micológico antes de su utilización. La muestra quedaba aproximadamente 1:10. Se hizo esta operación a las 6 horas, 1, 3, 4, 7, 10, 13 y 17 días después de la alimentación infectiva de los chipos en los pollos.

Los ratones picados por los chipos en la realimentación eran regresados a su camada, y tenidos en observación durante 20 días.

Segundo ensayo de transmisión.- En esta otra experiencia los insectos se alimentaban con sangre desfibrinada de pollo, añadida de virus para título de $10^{-6.0}$ en 0,02 ml/ic para ratones recién nacidos. El método utilizado fue el de la cámara artificial de goma (Torrealba JW: comunicación personal), con el propósito de garantizar una mayor

concentración vírica en el contenido digestivo en el insecto. También se empleó este sistema en el estudio de supervivencia vírica en el chipo, a los 2, 7 y 17 días, con igual dosis infectiva.

RESULTADOS

En cuanto a la infecciosidad del virus de la EEV en pollos, se pudo comprobar por medición de la temperatura corporal, un alza moderada a las 24 y 48 horas de la inoculación, que varió de 0,4 a 1,1 grados centígrados, con una media $0,73^{\circ}\text{C}$ para los pollos de 2 semanas o menos edad, y de $0,4^{\circ}\text{C}$ para los de 6 semanas. Esta subida de temperatura coincidió con la presencia de virus en la sangre, que solo se pudo apreciar por un día y a las 48 horas de la inoculación. Por lo tanto, la viremia fue breve y de bajo título ($10^{-1.0}$ para ratones de 24 horas). Los pollos inoculados no mostraron otra sintomatología y el apetito se mantuvo constante.

En lo relativo al primer ensayo de transmisión del virus de la EEV por chipos (*Rhodnius prolixus*), alimentados sobre pollos y realimentados sobre ratones recién nacidos, no se pudo detectar en ninguna ocasión que el virus existente en el tubo digestivo de los insectos fuese comunicado al ratón; pese a que las pruebas realizadas inmediatamente después de la realimentación con el contenido digestivo, indicaron la existencia del virus de la EEV hasta 10 días después de la alimentación infectiva en el pollo, por aislamiento

efectuado e identificación serológica practicada. No se detectó virus en el material extraído de los chipos con 13 y 17 días de alimentados. La concentración vírica no pasó de la dilución original, aproximadamente $10^{-1.0}$, matando en ocasiones al 100% de ratones inoculados y en otras un 40-60%

El segundo ensayo de transmisión con chipos alimentados artificialmente con sangre adicionada de virus de la EEV, no demostró diferencia básica alguna en sus resultados al primer ensayo, pese al alto contenido vírico en la sangre de alimentación, y en el material extraído a las 48 horas del tubo digestivo de los insectos, que indicó un título de $10^{5.2}$ /ic en ratones. La seroneutralización específica para esta muestra dió un índice de neutralización de 2,87 log 10.

Los ensayos de persistencia del virus en el chipo a los 2, 7 y 17 días, mostraron que el título de la sangre infectiva de alimentación de $10^{6.0}$ /ic para ratones recién nacidos, bajó a $10^{-3.3}$ a los 7 días, y fue negativo a los 17 días.

DISCUSION

Como se pudo apreciar por los resultados en pollos, los mismos difieren en cuanto a la susceptibilidad señalada por Briceño-Rossi (3) para los pollos de muy corta edad, puesto que todos los animales inoculados (1 día, 1, 2 y 6 semanas), sobrevivieron sin manifestación clínica alguna, salvo una ligera alza de temperatura. Fue interesante comprobar

lo corto, apenas 1 día, de la fase virémica y el bajo tenor vírico ($10^{-1.0}$) encontrado a las 48 horas de inoculado el animal. Si bien algunos autores (10) consideran este último hecho, también observado por ellos, como carentes de importancia epidemiológica, la presencia de virus en el contenido digestivo de chipos alimentados durante la viremia en los pollos, debe tener alguna significación en dicha área. La prueba de neutralización indicó la identidad del virus EEV encontrado en las distintas muestras procesadas, para asegurar así contra cualquier contingencia que pudiera ocurrir.

Los ensayos de transmisión vinieron a confirmar lo comprobado por Mangiafico y col (12) para el virus de la encefalitis equina del oeste (EEO), en cuanto a la no transmisión del virus por triatomas. Si bien, él anuncia de un caso de transmisión con *Rhodnius prolixus*, apunta que fue posible luego de romper por punción mecánica la barrera gástrica para que el virus se propagara por todo el cuerpo del insecto. Este procedimiento artificial lo justifica por la posibilidad de que tal cosa pueda suceder en la naturaleza cuando chipos no alimentados practiquen canibalismo (Brumpt) sobre otros chipos repletos de sangre de los cuales se nutren.

Justines y col (11) reproducen el ensayo de Mangiafico y sugieren que en triatomas infectados por tripanosomas, estos últimos al lesionar la pared del tubo digestivo del huésped, crean una vía que aprovecharía el virus para llegar a la hemolinfa y

glándulas salivales. Tal mecanismo simula a la punción artificial.

En nuestra opinión, después de los prolijos ensayos realizados con la cepa V-38, opinamos que la misma no fue transmitida por el chipo y que el papel de estos insectos en el ciclo epidemiológico de la EEV sea nulo o muy restringido a otros aspectos relacionados más que todo a la persistencia del agente infectivo en ellos, y posible dispersión viral por otros medios.

Las experiencias de sobrevivencia del virus de la EEV en el chipo, vinieron a demostrar menor viabilidad y pérdida creciente del título, difiriendo ello a los hallazgos de mayor persistencia, 25 días, encontrado por Mangiafico y col (12) para el virus de la encefalitis equina del oeste.

AGRADECIMIENTOS

Se manifiesta sincero agradecimiento a las Dras. Julieta de Siger, del Instituto de Investigaciones Veterinarias, y Dora de Piñero, de la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Carabobo, y a los Laboratorios PFIZER CA y PROTINAL CA, por la invalorable colaboración en la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AVILAN RJ: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. Rev SAS 29: 235-321, 1964.
- 2- AVILAN RJ: Los brotes de EEV en Venezuela durante 1962 a 1964. Rev Vlana SAS 31: 787- 805, 1966.
- 3- BRICEÑO-ROSSI AL: Estudio del virus encefalomiéltico equino venezolano. Rev Vlana SAS 29: 351-437, 1964.
- 4- CANSECO GC, BAEZ FM, RODRIGUEZ M: Investigación de la encefalitis equina en reservorios silvestres. Salud Pub de Mexico 14: 515-520, 1972.
- 5- DICKERMAN RW, BAKER GJ, ORDÓÑEZ JV, SCHERER WF: Venezuelan equine encephalomyelitis: viremia and antibody responses of pigs and cattle. Am J Vet Res 34: 357-361, 1973.
- 6- DICKERMAN RW, SCHERER WF, MOORHOUSE AS, TOAZE E, ESSEX ME, STELE RE: Ecologic studies of Venezuelan encephalitis in Southeastern Mexico. VI. Infection of wild birds. Am J Trop Med Hyg 21: 66-78, 1972.
- 7- DIVO A, BENAVIDES G: Las inmunofluorescencia en ayuda diagnóstica de la encefalitis equina venezolana. Laboratorio 58: 525-531, 1974.
- 8- GRAYSON MA, GALINDO P: Experimental transmission of Venezuelan equine encephalitis virus by *Deinocerites pseudus*. Dyar and Kanab, 1909. J Med Entomol 9: 196-200, 1972.
- 9- GROOTH, MORALES A, VIDALES H: Virus isolations from forest mosquitoes in San Vicente de Chucurí, Colombia. Am J Trop Med Hyg 10: 397-402, 1961.
- 10- HRUSKOVA J, RYCHTEROVA V: Infection of chicks with Venezuelan

-
- equine encephalomyelitis virus. *Acta Virol* 15: 324- 325, 1971.
- 11- JUSTINES G, SOUSA OE: Survival of arboviruses in trypanosome infected triatomines. *Am J Trop Med Hyg* 26: 326-328, 1977.
- 12- MANGIAFICO JA, WHITMAN L, WALLIS RC: Survival of Western equine encephalitis virus in Triatominae. *J Med Entomol* 5: 469-473, 1968.
- 13- QUIROZ C: Historia de la encefalitis equina en Venezuela. *Rev Vlana SAS* 31: 831-839, 1966.
- 14- RYDER S, FINOL LT, SOTO-ESCALONA A: Encefalitis equina venezolana. Comentarios acerca de la epidemia ocurrida en el Estado Zulia, Venezuela, a fines de 1969. *Invest Clín* 12 (39): 52- 63, 1971.
- 15- SELLERS RF, BERGOLD GH, SUAREZ OM, MORALES A: Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela, 1962-1964. *Am J Trop Med Hyg* 14: 460-469, 1965.