

ENCUESTA SEROLOGICA SOBRE ARBOVIRUS REALIZADA EN ANIMALES DE LA PROVINCIA DE TUCUMAN, ARGENTINA

Aída P. de Ruiz Holgado,¹ José M. Raya,² Marta S. Sabattini,³
Olga R. M. de Nader,⁴ y Nelda R. de Castagnaro⁵

Pruebas de hemaglutinación-inhibición y de neutralización con sueros animales indican la presencia de arbovirus en especies animales de varias áreas de la Provincia de Tucumán y sugieren la posible existencia de esta actividad vírica en otras regiones poco estudiadas del país.

La actividad de los arbovirus en la Provincia de Tucumán ha sido muy poco estudiada hasta el presente; el único antecedente al respecto es la encuesta que realizaron Mettler y colaboradores con sueros humanos extraídos en 1961 (1).

El presente trabajo tiene por objeto demostrar la actividad de algunos arbovirus, mediante las pruebas de hemaglutinación-inhibición (HI) y de neutralización (NT) en sueros animales obtenidos en 1964 y procedentes de tres puntos diferentes de la Provincia de Tucumán: zona norte, Departamento de Trancas; zona este, Departamento de Cruz Alta (Ingenio Concepción), y zona sur, Departamento Graneros. Estas pruebas permitieron determinar aproximadamente la distribución de los arbovirus estudiados.

Materiales y métodos

Se examinaron en total 75 sueros procedentes de animales de las zonas indicadas en el cuadro 1, y extraídos por punción de la

CUADRO 1.—Sueros animales probados y su distribución por especie y departamento de procedencia.

Especie	Números de sueros			
	Dpto. Trancas	Dpto. Cruz Alta	Dpto. Graneros	Total
Equinos.....	10	8	10	28
Bovinos.....	10	5	10	25
Mulares.....	0	3	10	13
Porcinos. . .	0	4	0	4
Caprinos. . .	1	3	0	4
Asnales.....	0	0	1	1
Totales.....	21	23	31	75

vena yugular. Al llegar al laboratorio se separaron los coágulos de los sueros y estos fueron almacenados a -20°C hasta el momento de realizarse las pruebas. Antes de la prueba de HI se trataron todos los sueros con acetona para eliminar posibles inhibidores específicos (2), y con glóbulos rojos de ganso a fin de privarlos de los aglutinadores específicos.

Los glóbulos rojos de ganso fueron suspendidos en solución tope de pH y temperatura óptima para cada virus.

Los antígenos de virus empleados fueron:

Grupo A

- Encefalitis equina occidental (EEO), cepa Cba .87; 22 pasajes en ratón recién nacido (rrn).

¹ Directora del Instituto de Microbiología y Profesora titular de la Cátedra de Microbiología Humana, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (U.N.T.), Argentina.

² Profesor adjunto de la Cátedra de Microbiología Humana, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, U.N.T.

³ Investigadora y Profesora adjunta de la Sección Arbovirus, Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, Argentina.

⁴ Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología Humana, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, U.N.T.

⁵ Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, U.N.T.

- Aura, cepa BeAr 10315; 14 pasajes en rrn.
- Pixuna, cepa BeAr 35645; 22 pasajes en rrn.

Grupo B

- San Luis (SL), cepa BeAr 23379; nivel de pasajes igual a 14.
- Ilhéus, cepa BeH 7445; 16 pasajes.
- Bussuquara, cepa BeAn 4116; nivel de pasajes, 17.

Grupo fiebre de flebotomos

- Icoarací, cepa BeAn 24262.

No agrupados

- Tacaiuma, cepa BeAn 73.

Todos los antígenos se prepararon por el método de sacarosa acetona de Clarke y Casals (3).

Se utilizó la microtécnica de HI de Shope (4). Se consideraron positivos los sueros que en dilución 1/20, o más, inhibieron por lo menos 4 U.H. Las reacciones de neutralización se realizaron en rrn (2).

Se probaron sueros frente a los virus EEO, SL y Bussuquara. Para EEO y Bussuquara el material vírico fue una suspensión de cerebro de rrn infectado; en cambio, para SL se utilizó suero de rrn virémico. Una dilución de virus se mezcló con igual volumen de sueros sin diluir. Las mezclas, incubadas durante una hora a 37°C, se inocularon por vía intraperitoneal a un grupo de seis ratoncitos que se observaron durante 10 días para EEO, y 14 días para los otros virus.

Resultados y comentarios

Todos los sueros se probaron contra todos los virus mediante la prueba de HI. Se observó inhibición sólo con los antígenos de los siguientes virus: EEO, SL, Bussuquara, Ilhéus y Tacaiuma. No fueron inhibidos los antígenos de los virus Aura, Pixuna e Icoarací.

En el cuadro 2 se observa que el mayor porcentaje de positividad corresponde al antígeno del virus SL, y le siguen en orden

CUADRO 2.—Resultado de la prueba de hemaglutinación-inhibición con 75 sueros animales.

Virus	Positivos X ^a	
	Números de sueros	Porcentajes
EEO	15	20
Aura	0	0
Pixuna	0	0
San Luis	25	33
Ilhéus	2	3
Bussuquara	11	15
Icoarací	0	0
Tacaiuma	5	7

^a Reaccionan a una dilución de suero 1/20 o mayor frente a 4 U.H.

los antígenos de EEO, Bussuquara, Tacaiuma e Ilhéus.

A continuación se analizan los resultados de cada grupo.

Virus del Grupo A

De los 15 sueros que resultaron positivos en la prueba de HI con antígeno de virus EEO, cuatro acusaron títulos de 1/80; uno, de 1/40, y el resto, de 1/20. Como se observa en el cuadro 3, estos sueros positivos correspondían a los tres departamentos ya citados.

Se realizó la prueba de NT en ratón incluyendo seis de los sueros positivos y cinco sueros negativos, según prueba de HI. Las dosis de virus incluidas fueron muy bajas, 25

CUADRO 3.—Títulos de los 15 sueros positivos según prueba de hemaglutinación-inhibición con antígeno del virus EEO.

Dpto.	Título	Especie	No. de animales	Total por Dpto.
Cruz Alta . . .	1/80	vacunos	2	2
Graneros . . .	1/80	vacunos	2	7
	1/40	vacunos	1	
	1/20	vacunos	4	
Trancas . . .	1/20	vacunos	3	6
	1/20	equinos	3	

DL₅₀; y aun así, sólo dos sueros protegieron esa dosis: uno de ellos fue un suero que no había inhibido al antígeno del virus EEO en la prueba de HI.

La falta de correlación entre las pruebas de HI y de NT con el virus EEO les resta especificidad a las inhibiciones halladas, que podrían ser causadas por otro virus del grupo. Sin embargo, el virus Aura, estrechamente relacionado con el virus EEO (5), no fue inhibido por ningún suero. Por otra parte, llama la atención que de los 15 sueros positivos, según prueba de HI con antígeno de virus EEO, 12 provenían de vacunos y sólo tres de equinos; los dos sueros que protegen 25 DL₅₀, según la prueba de NT en ratón, corresponden también a vacunos; esto puede apoyar la anterior hipótesis, aunque también puede deberse al escaso número de muestras probadas o a otras causas que, por el momento, escapan a nuestra interpretación.

Virus del Grupo B

Treinta y tres sueros fueron positivos en la prueba de HI para uno o más antígenos de este grupo. En el cuadro 4 se consignan los títulos de esos sueros frente a cada antígeno.

Se agruparon los sueros por Departamentos para analizarlos y establecer las diferencias según su procedencia.

Todos los sueros procedentes de Graneros, positivos para los virus del grupo B, lo eran también con el antígeno SL; los títulos fueron altos y variaban entre 1/20 y 1/320.

Los sueros 11 y 15 también fueron positivos con otros antígenos del grupo: el suero 11 fue positivo con los antígenos Bussuquara e Ilhéus con títulos bastante menores que para SL, por lo que se interpretaría como cruce inmunológico, y el suero 15 fue positivo con el antígeno Ilhéus dando un título algo mayor que con SL. Ningún suero de vaca del Departamento de Graneros presentó inhibición. Los sueros positivos procedían de caballos, mulas y asnos que en conjunto

presentaron un 62% de positividad para el antígeno SL.

De los sueros procedentes del Departamento de Trancas, cinco resultaron positivos en la prueba de HI con antígeno SL y ninguno con los otros antígenos; los títulos fueron muy bajos, 1/20 y 1/40.

La situación con los sueros procedentes de Cruz Alta cambiaba con respecto a los que procedían de los otros dos departamentos. Sometidos a la prueba de HI, tres sueros resultaron positivos solamente con antígeno SL (22 y 23 con título de 1/20, y 29 con título de 1/80), otros ocho resultaron positivos sólo para Bussuquara, con títulos también de 1/20 y 1/80, y otros dos (21 y 31) resultaron positivos con ambos antígenos, en un caso con igual título y en el otro con una sola dilución a favor de SL.

Los positivos sólo para SL eran sueros pertenecientes a una vaca, un caballo y una mula, respectivamente. Los positivos sólo para Bussuquara se distribuían entre cabras, cerdos y caballos. De estos, una de las cabras y dos cerdos tenían un año o menos de edad.

Para confirmar los hallazgos de la prueba de HI se realizaron pruebas de NT con virus SL y Bussuquara.

Se probaron tres sueros positivos de título elevado y tres negativos para SL en la prueba de HI frente a 125 DL₅₀ del mismo virus. Los tres sueros positivos y uno de los negativos protegieron esa dosis, mientras que los dos sueros negativos restantes no lo hicieron, datos que corroboran en cierto modo los hallazgos de la prueba de HI.

Se sometieron a la prueba de NT con virus Bussuquara cuatro sueros que habían resultado positivos y dos negativos en la prueba de HI: ninguno de ellos protegió completamente ni aun las 20 DL₅₀ de virus incluidas en la prueba.

Los resultados de las pruebas de NT podrían confirmar la actividad del virus SL u otro estrechamente relacionado; por el contrario, la prueba de NT con Bussuquara no lo logra, pero los resultados de las pruebas

CUADRO 4—Títulos de los sueros positivos en la prueba de hemaglutinación-inhibición con antígenos del grupo B y su distribución por antígeno y departamento.

Departamento	Suero No.	Títulos			No. de sueros positivos sólo para SL	No. de sueros positivos para SL, y otros del grupo	No. de sueros positivos sólo para Bussuquara	Total de sueros por Depto.
		Antígeno SL	Antígeno Bussuquara	Antígeno Ilhéus				
Graneros	1	1/80	—	—	13	2	0	31
	2	1/160	—	—				
	3	1/160	—	—				
	4	1/320	—	—				
	5	1/80	—	—				
	6	1/160	—	—				
	7	1/80	—	—				
	8	1/160	—	—				
	9	1/160	—	—				
	10	1/80	—	—				
	11	1/320	1/20	1/40				
	12	1/20	—	—				
	13	1/20	—	—				
	14	1/20	—	—				
	15	1/20	—	1/40				
Trancas	16	1/20	—	—	5	0	0	21
	17	1/20	—	—				
	18	1/20	—	—				
	19	1/20	—	—				
	20	1/40	—	—				
Cruz Alta	21	1/20	1/20	—	3	2	8	23
	22	1/20	—	—				
	23	—	1/80	—				
	24	—	1/40	—				
	25	—	1/80	—				
	26	—	1/40	—				
	27	—	1/40	—				
	28	—	1/40	—				
	29	1/80	—	—				
	30	—	1/40	—				
	31	1/80	1/40	—				
	32	—	1/40	—				
	33	1/20	—	—				

de HI, concentrados en una sola zona, podrían por sí solos sugerir la actividad de otro agente del grupo B no incluido en este trabajo.

En suma, se puede suponer que más de un virus del grupo B estaría activo en Tucumán, que en la zona de Cruz Alta actuaría un agente que aparece relacionado con Bussuquara en las pruebas de HI y que esa actividad sería reciente por la edad de algunos de los animales implicados.

Tienen mayor significación los resultados obtenidos en sueros procedentes de Graneros sometidos a prueba para virus SL porque se han alcanzado títulos elevados en pruebas de HI, pero se ha logrado confirmación en las pruebas de HI y de NT por Mettler (1) y Sabattini (6) con virus SL. Estos investigadores trabajaron con sueros humanos procedentes de Tucumán, Mendoza y Buenos Aires (1) y sueros humanos y animales procedentes de la Provincia de Córdoba (6).

Por el contrario, en esos trabajos no se habían hallado mediante pruebas de HI sueros sólo positivos para Bussuquara, en cambio, sí se hallaron entre los sueros procedentes de Cruz Alta.

Virus no agrupados

El 7% de los sueros de vacas, caballos, cabras y mulas de los tres Departamentos fue positivo para el antígeno del virus Tacaiuma, distribuidos según se observa en el cuadro 5. Los sueros dieron títulos de 1/20, 1/40 y, en un caso, 1/40 o mayor.

Resumen

Si bien es cierto que, como base para determinar la distribución de los arbovirus, es mejor el aislamiento de estos que el descubrimiento de sus anticuerpos, los hallazgos serológicos aportan firmes indicios de que varios de estos virus han estado probablemente en actividad en regiones hasta ahora poco estudiadas, como la Provincia de Tucumán.

CUADRO 5—Resultado de la prueba de hemaglutinación-inhibición con sueros animales positivos al antígeno del virus Tacaiuma.

Departamento	Título	Especie	No. de animales	Totales
Cruz Alta...	1/40	Caprino	2	2
Graneros...	1/40	Mular	1	1
	1/20	Equino	1	2
Trancas....	1/20	Bovino	1	1

En la encuesta serológica para determinar la presencia de sustancias inhibitoras en sueros de animales de esta provincia, según las pruebas de hemaglutinación-inhibición (HI) y de neutralización (NT), se llegó a las siguientes conclusiones:

1) En sueros animales de la Provincia de Tucumán se encuentran sustancias inhibitoras y neutralizantes para algunos arbovirus.

2) El mayor número de sustancias inhibitoras para el virus de encefalitis equina occidental (EEO) se descubrió en vacunos y equinos, y los resultados de la prueba de NT no guardan relación con los de la prueba de HI, por los que su interpretación es difícil.

3) En los sueros de animales de Tucumán existen sustancias inhibitoras y neutralizantes para el virus San Luis (SL), lo que indica probablemente la actividad de este agente, u otro estrechamente relacionado, en esta provincia.

4) El virus SL, u otro estrechamente relacionado, está distribuido en los tres departamentos estudiados—Graneros, Trancas y Cruz Alta—pero en Graneros se encuentra con títulos más elevados y en mayor porcentaje.

5) Se sospecha la presencia en Cruz Alta de un virus serológicamente relacionado con el virus Bussuquara por los resultados de la prueba de HI no confirmados por la prueba de NT.

6) Se constata la presencia de sustancias inhibitoras en sueros animales, según la prueba de HI, para el virus Tacaiuma. □

REFERENCIAS

- (1) Mettler, N.E., Parodi, A.S. Casals, J. "Survey for Antibodies against Arthropodborne Viruses in Man in Argentina". *Amer J Trop Med* 12:653-656, 1963.
- (2) Instituto de Virología de Córdoba: *Procedimiento y técnica del Laboratorio Viroológico*. Universidad Nacional de Córdoba, 1964.
- (3) Clarke, D.H. y Casals, J. "Technique for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses." *Amer J Trop Med* 7:561-573, 1958.
- (4) Shope, R.E. "The Use of a Micro Hemagglutination-Inhibition Test to Follow Antibody Response after Arthropod-Borne Virus Infection in a Community of Forest Animals." *An Microbiol (Rio)* 11 (Parte A): 167-171, 1963.
- (5) Causey, O.R., Casals, J., Shope, R.E. y Suchinda Vdomasakdi "Aura and Una, Two New Group A Arthropod-Borne Viruses". *Amer J Trop Med* 12:777-781, 1963.
- (6) Sabattini, M.S., Shope, R.E. y Vanella, J.M. "Serological Survey for Arboviruses in Córdoba Province, Argentina". *Amer J Trop Med* 14:1073-1078, 1965.

Serological Investigation for Antibodies against Arboviruses in Animals of the Province of Tucumán, Argentina (Summary)

In attempting to determine the distribution of arboviruses it is preferable to isolate these rather than attempt to discover their antibodies. Nevertheless serological research, based on hemagglutination-inhibition (HI) and neutralization tests (NT), indicates that a number of these viruses have been active in regions, such as the Province of Tucumán, to which little study has so far been devoted.

The following conclusions were reached in a serological investigation to determine the presence of inhibiting substances in animal sera in this province:

1) Substances that have an inhibiting and neutralizing effect on some of the arboviruses have been found in animal sera in the Province of Tucumán.

2) The majority of the substances that have an inhibiting effect on the virus of western equine encephalitis were found in cattle and

horses and the results of the NT test were inconsistent with those of the HI test, so it is difficult to interpret them.

3) Substances that have an inhibiting and neutralizing effect on the St. Louis virus exist in the sera of animals in Tucumán, which indicates that this agent, or one closely related to it, is active in this province.

4) The SL virus, or a virus closely related to it, exists in the three departments—Graneros, Trancas and Cruz Alta—covered by the study, although its incidence is greater and its existence more fully substantiated in Graneros.

5) The existence in Cruz Alta of a virus serologically related to the Bussuquara virus is suspected since the results of the HI test were not confirmed by the NT test.

6) The existence in animal sera of substances having an inhibiting effect, according to the HI test, on the Tacaiuma virus is confirmed.

Levantamentos Sorológicos sobre Arbovírus Realizado em Animais na Província de Tucumán, Argentina (Resumo)

Para determinar a distribuição dos arbovírus, o isolamento é melhor método que a pesquisa de anticorpos. Os achados sorológicos, porém, obtidos pelas provas de hemaglutinação-inibição (HI) e de neutralização (NT), constituem indícios seguros de que esses vírus têm estado ativos, provavelmente, em regiões até agora mal estudadas, como a Província de Tucumán.

Em levantamento sorológico levado a efeito para determinar a presença de substâncias inibidoras em sôros de animais da referida província, chegaram os autores às seguintes conclusões:

1) Há substâncias inibidoras e neutralizadoras para alguns arbovírus em sôros de animais da Província de Tucumán.

2) O maior número de substâncias inibidoras para o vírus da encefalite equino ocidental (EEO) foi encontrado em gado vacum e equino e os resultados da prova de NT não têm

relação com os da prova de HI, o que dificulta sua interpretação.

3) Nos sôros de animais de Tucumán existem substâncias inibidoras e neutralizadoras para o vírus São Luis (SL), o que indica atividade desse agente ou de agente afim, na referida província.

4) O vírus SL ou vírus afim está distribuído nos três departamentos estudados—Graneros, Trancas e Cruz Alta—mas em Graneros encontram-se títulos mais elevados e em maior percentagem.

5) Suspeita-se da presença em Cruz Alta de um vírus sorologicamente relacionado com o vírus Bussuquara, à vista dos resultados da prova de HI, não confirmados pela prova de NT.

6) Registrou-se a presença de substâncias inibidoras em sôros animais, mediante a prova de HI, para o vírus Tacaiuma.

Enquête sérologique sur le virus transmis par les arthropodes effectuée chez des animaux de la province de Tucumán, Argentine (Résumé)

Pour déterminer la répartition des virus transmis par les arthropodes, il est préférable de les isoler plutôt que de dépister leurs anticorps. Cependant, les constatations sérologiques, d'après les épreuves d'hémagglutination-inhibition (HI) et de neutralisation (NT) fournissent

des indications très nettes qu'un certain nombre de ces virus ont probablement été actifs dans des régions peu étudiées jusqu'à présent, comme la province de Tucumán.

L'enquête sérologique destinée à déterminer la présence de substances inhibitives dans les

sérums des animaux de cette province a permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

1) Dans les sérums animaux de la province de Tucumán, on trouve des substances inhibitives et neutralisantes pour plusieurs virus transmis par les arthropodes.

2) Le plus grand nombre de substances inhibitives pour le virus de l'encéphalite équine occidentale (EEO) est décelé chez les bovins et les équins, et les résultats de l'épreuve de NT n'ont pas de rapport avec ceux de l'épreuve de HI du fait que leur interprétation est difficile.

3) Il existe dans les sérums des animaux de Tucumán des substances inhibitives et neutralisantes pour le virus San Luis (SL), ce qui indique probablement l'activité de cet agent ou

d'un autre étroitement apparenté dans cette province.

4) Le virus SL, ou un autre étroitement apparenté, est répandu dans les trois départements étudiés—Graneros, Trancas et Cruz Alta—mais dans celui de Graneros, on le rencontre avec des titres moins élevés et dans un plus grand pourcentage.

5) On soupçonne la présence dans le département de Cruz Alta d'un virus sérologiquement apparenté au virus de Bussuquara d'après les résultats de l'épreuve de HI non confirmés par l'épreuve de NT.

6) On constate la présence de substances inhibitives dans les sérums animaux, suivant l'épreuve de HI, pour le virus Tacaiuma.