

ASLAMIENTO DEL VIRUS MERMET EN GUATEMALA

Ernesto Gutiérrez V., M.D.¹, Charles H. Calisher, Ph.D.², Kathryn S. C. Maness, B.S.³
y Rexford D. Lord, Sc.D.⁴

En 1969 se aisló en Guatemala el virus Mermet de la sangre de un pájaro. Este es el sexto aislamiento del virus, proveniente de aves, informado hasta ahora en el Continente Americano, y el primero en el sur de Norteamérica.

Introducción

El virus Mermet, del grupo Simbú, en el supergrupo Bunyamwera, es un arbovirus que se aisló por primera vez de la sangre de una golondrina (*Progne subis*) capturada en Metropolis, Illinois, en 1964. En total se han aislado e identificado cinco cepas de este virus que se han informado en el mismo trabajo (1). No hay nada en la literatura que indique que el virus haya sido aislado de otros vertebrados o de mosquitos (2).

No se ha dado ninguna evidencia de infección en vertebrados en las encuestas serológicas efectuadas en el área donde se capturaron tres de los cinco pájaros a partir de los cuales se aisló el virus (1).

Este trabajo se refiere al aislamiento del virus Mermet de un pájaro no migratorio capturado en Zacapa, departamento de Zacapa, Guatemala.

Materiales y métodos

Como parte del trabajo de investigación ecológica llevado a cabo durante la epidemia de encefalitis equina venezolana (EEV) que surgió en Guatemala, en 1969, la Unidad de Ecología de Arbovirus del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EUA, capturó vertebrados y mosquitos en una zona descrita previamente (3).

En seis días se capturaron entre los vertebrados 24 especies de aves, que representaban 11 familias. Las aves fueron atrapadas con redes invisibles, tipo japonesa; sangradas de la vena yugular; marcadas y puestas en libertad, tal como se ha descrito antes (4). En total se capturaron 10 orioles Altamira Lichtenstein (*Icterus gularis*), tres de ellos el 13 de agosto, de un total de 22 aves capturadas ese día.

Igualmente se tomaron muestras de sangre de humanos en tres diferentes zonas de Guatemala. La sangre fue tomada por venipuntura antecubital dentro de un tubo estéril y al vacío. Luego las muestras fueron diluidas, centrifugadas y separadas en el campo, y los sueros se guardaron en hielo seco y se enviaron al CDC. Los especímenes fueron inoculados intracerebralmente en ratones lactantes (RL) de dos a cuatro días de edad para intentar el aislamiento de virus. Seis de seis ratones inoculados con 0.02 ml de suero de un *Icterus gularis* se encontraron postrados o muertos al quinto día. Se trataba de una hembra adulta que fue capturada el 13 de agosto de 1969. Este aislamiento fue denominado ZG-37.

Con una suspensión alcalina de los cerebros de todos los ratones afectados, se inoculó a otro grupo de RL, los cuales mostraron signos de enfermedad al tercer día. Después de un pase adicional en RL se cosechó una cantidad suficiente de cerebro de ratón infectado que sirvió para realizar pruebas de sensibilidad al éter y al deoxicolato de sodio DCS (5) así como para preparar antígeno extraído con sucrosa-acetona (6) y líquido ascítico inmune en ratón (7). En la prepara-

¹ Becario de la Organización Panamericana de la Salud en el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA. Jefe del Departamento de Virus, Instituto Nacional de Higiene "Leopoldo Izquieta Pérez", Guayaquil, Ecuador.

² Jefe, Arbovirus Reference Branch, Vector-Borne Diseases Division, Bureau of Laboratories, Centro para el Control de Enfermedades, Fort Collins, Colorado, EUA.

³ Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA.

⁴ Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO), Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.

ción del líquido ascítico se prescindió del uso del adyuvante porque este produce reacciones anticomplementarias en la prueba de FC (8).

El virus fue titulado en RL y en ratón adulto (RA) de tres semanas de edad por vías intracerebral e intraperitoneal. También se estudió su morfología y su tamaño con el microscopio electrónico.

Se realizaron pruebas de inhibición de hemaglutinación (IH) siguiendo el método en microtécnica de Clarke y Casals (6).

La prueba de neutralización por reducción de la formación de placas en células Vero, línea estable de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fue efectuada en la modalidad virus constante-suero diluido. Se usaron aproximadamente 100 unidades formadoras de placas. Los sueros se inactivaron a 56°C por 30 minutos y luego se diluyeron desde 1:5 hasta 1:1,280. La mezcla suero-virus fue incubada a 37°C por 60 minutos y luego inoculada en cantidad de 0.1 ml por hoyo en paneles de seis hoyos. Se permitió que esta mezcla se absorbiera en la monocapa de células dejándolas a 35°C durante una hora. Después se agregó una primera capa de agarosa (50% de agarosa al 2% + 50% de medio de crecimiento con CO₂HNa al 7%). Tres días después de haberlas incubado a 35°C en atmósfera de CO₂ se agregó una segunda capa de agar (50% de agar Noble al 2% + 50% de medio de crecimiento con CO₂HNa al 7% y rojo de neutral 1:30,000). Después de 24 horas de incubación a 35°C en atmósfera de CO₂ se leyeron los resultados y se consideró como significativa la reducción de la formación de 90% o más de las placas.

En la Unidad de Investigación de Arbovirus de la Universidad de Yale (YARU) se efectuaron pruebas FC por el método de Casals (9).

Resultados y discusión

Los títulos de la cepa ZG-37 en RL, por vías intracerebral e intraperitoneal, y en RA por las mismas vías, fueron respectivamente:

9.8, 6.7, 7.7 y 6.3 por ml DL₅₀. Como puede observarse, se obtuvieron títulos más altos por vía intracerebral que por la intraperitoneal.

El virus fue sensible al éter y al DCS. El índice de sensibilidad fue de 2.6 en la primera prueba y de 3.6 en la segunda.

Las observaciones hechas por el Dr. Frederick A. Murphy, de la Sección de Viropatología del CDC, con el microscopio electrónico, mostraron que el virus tenía morfología compatible con el supergrupo Bunyamwera.

Estudios histopatológicos de ratones infectados, realizados por el Dr. Martin D. Hicklin, Unidad de Patología del CDC, revelaron células necróticas individualizadas en la corteza cerebral, hemorragia en la médula espinal a nivel torácico y encefalitis difusa de bajo grado.

El antígeno extraído con sucrosa-acetona produjo hemaglutinación de los glóbulos rojos de un ganso hembra (*Anser cinereus*) hasta una dilución de 1:60 con un pH óptimo de 6.0 tanto a 4°C como a 37°C.

Una primera prueba de IH contra los siguientes antisueros dio resultados negativos: grupo A, grupo B, encefalitis equina del este (EEE), encefalitis equina del oeste (EEO), San Luis (ESL), fiebre amarilla, Ilheus, Guama, Bussuquara, Bunyamwera, Nilo occidental y Sindbis.

Una prueba de FC con antisueros de los grupos más representativos dentro de los arbovirus (A, B, C, California, Guama, Simbú, Bunyamwera, Turlock, Tacaribe, Palyam, Capim, Tete, estomatitis vesicular (VSV), Bwamba y Eretmapodites) y también rabia, coriomeningitis linfocítica y un polivalente rabdovirus, mostró una franca reacción positiva (1:32) tanto con el grupo Simbú como con el líquido ascítico homólogo. Todos los demás fueron negativos. La prueba fue duplicada con el antígeno diluido 1:4 y 1:16 y los sueros lo fueron desde 1:4 hasta 1:32.

Conocida la ubicación del virus dentro del

CUADRO 1—Resultados de la prueba de fijación del complemento entre el líquido ascítico ZG-37^a contra todos los antígenos del grupo Simbú y su homólogo ZG-37.

Antígenos ^b	Resultados
Aino	0
Akabane	0
Buttonwillow	0
Ingwavuma	1:16
Manzanilla	1:64
Mermet	1:32
Oropouche	1:8
Sabo	0
Sango	0
Sathuperi	0
Shamonda	0
Shuni	0
Simbú	0
Thimiri	0
Utinga	0
Yaba 7	0
ZG-37	1:32

^a Líquido ascítico diluido desde 1:8 hasta 1:256.

^b Antígenos diluidos 1:8 y 1:32.

grupo Simbú se procedió a buscar la identificación definitiva.

En el cuadro 1 se dan los resultados de la prueba de FC en que el líquido ascítico ZG-37 fue probado contra todos los antígenos del grupo Simbú y su homólogo.

Los resultados indicaron que la cepa ZG-37 podría corresponder a Manzanilla o a Mermet, virus que están muy relacionados antigénicamente. Igual relación existe entre los dos mencionados e Ingwavuma (1). La reacción con Oropouche fue más débil; sin embargo, era necesario aclarar el papel que pudiera desempeñar este virus en la identificación de la cepa.

CUADRO 2—Reacciones cruzadas en la prueba de fijación del complemento entre la cepa ZG-37 y algunos arbovirus del grupo Simbú.

Antígenos	Anticuerpos a:			
	ZG-37	Mermet	Manzanilla	Oropouche
ZG-37	32	>1024	16	0
Mermet	64	512	16	0
Manzanilla	32	≥1024	16	0
Oropouche	0	32	0	32

0 = <8.

CUADRO 3—Reacciones cruzadas en la prueba de inhibición de hemaglutinación entre la cepa ZG-37 y algunos arbovirus del grupo Simbú.

Antígenos	Anticuerpos a:			
	ZG-37	Manzanilla	Mermet	Oropouche
ZG-37	160	80	<10	<10
Manzanilla	160	80	<10	<10
Mermet	80	40	160	80
Oropouche	160	<10	320	320

El cuadro 2 muestra los resultados de la prueba de FC en "tablero de ajedrez" (titulación en cajón) con los virus Mermet, Manzanilla, Oropouche y la cepa ZG-37. No se incluyó Ingwavuma porque se consideró que, de acuerdo con la distribución de los arbovirus del grupo Simbú en las diferentes zonas zoogeográficas del globo (10), no correspondía al Continente Americano.

Esta prueba mostró una reacción un poco más fuerte con Mermet que con Manzanilla, especialmente antisuero Mermet versus antígeno ZG-37 en relación con antisuero Manzanilla versus antígeno ZG-37.

Sin embargo, en la prueba de IH, también titulación en cajón, tal como se muestra en el cuadro 3, la reacción fue evidentemente positiva entre la cepa ZG-37 y el virus Manzanilla.

La prueba de neutralización, cuyos resultados se señalan en el cuadro 4, aclaró el problema en forma definitiva. La reacción fue más fuerte en ambas direcciones entre

CUADRO 4—Reacciones cruzadas en la prueba de neutralización por reducción de la formación de placas en células Vero entre la cepa ZG-37 y algunos arbovirus del grupo Simbú.

Virus	Anticuerpos a:			
	ZG-37	Mermet	Manzanilla	Ingwavuma
ZG-37	640	1280	320	5
Mermet	1280	1280	1280	320
Manzanilla	40	80	320	<5
Ingwavuma	40	160	40	80

Observación de las placas: 4^o día.

la cepa ZG-37 y el virus Mermet que entre aquella y el virus Manzanilla.

Este aislamiento amplía el espectro de distribución geográfica del virus Mermet hasta los 15° de latitud norte y señala su presencia en la zona neotropical. Todos los aislamientos anteriores procedían de los Estados Unidos, de lugares ubicados entre los 38 y 33° de latitud norte (1).

Desde el punto de vista de las condiciones ecológicas, estas son diferentes en Zacapa, donde predomina una vegetación xerofítica, de aquellas que existen en los lugares donde el virus Mermet se había aislado antes (11). Sin embargo, las capturas de aves se hicieron con preferencia en árboles tropicales de unos seis metros de altura y en arbustos que crecen en los barrancos de un riachuelo que cruza la zona. Más allá de los barrancos crecen los cactus y espinales propios de la vegetación xerofítica.

Los resultados del trabajo de laboratorio con mosquitos y vertebrados capturados en Zacapa y otras zonas de Guatemala en 1969 (3) no habían mostrado aislamientos de virus diferentes del venezolano. El informe de dos aislamientos de un virus del grupo Anopheles A en dos caballos sangrados en diferentes zonas de Guatemala como parte del mismo trabajo de campo que se menciona aquí, será objeto de otra publicación.

Setenta y siete sueros humanos divididos en dos grupos, uno procedente del departamento de Santa Rosa y otro del departamento de Jutiapa, fueron probados contra la cepa ZG-37. Se utilizó la prueba de neutralización por reducción de la formación de placas en células Vero. Ambos grupos incluyeron individuos de ambos sexos y de diferentes edades. Ninguno de ellos mostró anticuerpos contra ZG-37.

Este aislamiento confirma el aserto (1) de que las "aves parecen ser huéspedes vertebrados significativos" del virus Mermet.

Resumen

Se da cuenta del aislamiento del virus Mermet de la sangre de un oriol Altamira Lichtenstein (*Icterus gularis*) capturado en Zacapa, Guatemala, en 1969.

La captura se efectuó como parte del trabajo de campo realizado por la Unidad de Arbovirus del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EUA, durante la epidemia de encefalitis equina venezolana de ese año.

Como sistema de aislamiento se empleó el ratón lactante. Se realizaron pruebas de sensibilidad al éter y al deoxicolato de sodio (DCS). Se prepararon, asimismo, antígeno extraído con sucrosa-acetona y líquido ascítico inmune en ratón. Para identificar la cepa se realizaron pruebas de inhibición de hemaglutinación, fijación del complemento y de neutralización por reducción de la formación de placas en cultivo de tejidos.

Esta cepa, denominada ZG-37, fue sensible al éter y al DCS. El antígeno produjo hemaglutinación de los hematíes de ganso. La prueba de neutralización permitió su identificación como correspondiente al virus Mermet.

Este es el primer aislamiento del virus Mermet fuera de los Estados Unidos y el primero, también, en la región neotropical.

Este aislamiento ratifica el papel de las aves como huéspedes vertebrados importantes del virus Mermet y de los arbovirus en general. □

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Sra. Laura Edwards por su ayuda en el aislamiento de la cepa; a la Srta. Donna Sasso por su colaboración al realizar ciertas pruebas de laboratorio, y al Dr. Roy Chamberlain por su asistencia editorial. Asimismo expresan profunda gratitud a los Dres. Robert E. Shope y Jordi Casals por su valiosa cooperación y orientación para identificar la cepa.

REFERENCIAS

- (1) Calisher, C. H.; R. H. Kokernot; J. F. de Moore; K. R. Boyd; J. Hayes, y W. A. Chapell. Arbovirus studies in the Ohio-Mississippi basin, 1964-1967. VI. Mermet: a Simbu-group arbovirus. *Am J Trop Med Hyg* 18: 779-788, 1969.
- (2) *Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World*. Washington, D. C.: U. S. Govt. Printing Office, 1972.
- (3) Sudia, W. D.; R. D. Lord; V. F. Newhouse; D. L. Miller, y R. E. Kissling. Vector-host studies of an epizootic of Venezuelan equine encephalomyelitis in Guatemala, 1969. *Am J Epidem* 93:137-143, 1971.
- (4) Calisher, C. H. K.; S. C. Maness; R. D. Lord, y P. H. Coleman. Identification of two South American strains of Eastern equine encephalomyelitis virus from migrant birds captured on the Mississippi Delta. *Am J Epidem* 94:172-178, 1971.
- (5) Hammon, W. McD. y G. E. Sather. Arboviruses. En *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*. Pág. 250, 4a ed. 1969.
- (6) Clark, D. H. y J. Casals. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7:561-573, 1958.
- (7) Tikasingh, E. S.; L. Spence, y W. G. Downs. The use of adjuvant and sarcoma 180 cells in the production of mouse hyperimmune ascitic fluids to arboviruses. *Am J Trop Med Hyg* 15: 219-226, 1966.
- (8) Shope, R. E. Comunicación personal.
- (9) Casals, J. Immunological techniques for animal viruses. En *Methods in Virology* 3:113-198, 1967.
- (10) Theiler, M. y W. C. Downs. *The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates*. Pág. 243, Yale University, 1973.
- (11) Kokernot, R. H. y C. A. Brandly. Arbovirus studies in the Ohio-Mississippi basin, 1964-1967. I. Introduction. *Am J Trop Med Hyg* 18:743-749, 1969.

Isolation of the Mermet virus in Guatemala (Summary)

The article gives an account of the isolation of the Mermet virus from the blood of an Altamira Lichtenstein oreole (*Icterus gularis*) captured at Zacapa, Guatemala, in 1969.

The bird was caught as part of the field work carried out by the Arbovirus Unit of the Center for Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia, U.S.A., during the 1969 Venezuelan equine encephalitis epidemic.

For the isolation procedure, suckling mice were used. Tests of sensitivity to ether and to sodium deoxycholate were made, and antigen extracted with sucrose-acetone and mouse immune ascitic fluid were prepared. To identify the strain, tests of hemagglutination inhibition,

complement fixation and neutralization by reduction of plate formation in tissue cultures were carried out.

The strain, ZG-37, was sensitive to ether and to sodium deoxycholate. The antigen produced hemagglutination in goose erythrocytes. The neutralization test confirmed its identification as belonging to the Mermet virus.

This is the first time that the Mermet virus has been isolated outside the United States, and the first time also in the Neotropical region. The discovery confirms the role played by birds as important vertebrate hosts of the Mermet virus and of arboviruses in general.

Isolamento do vírus Mermet na Guatemala (Resumo)

Os autores dão conta do isolamento do vírus Mermet do sangue de um papa-figo Altamira Lichtenstein (*Icterus gularis*) capturado em Zacapa, na Guatemala, em 1969.

A ave foi capturada como parte do trabalho de campo realizado pela Unidade de Arbovírus do Centro de Controle de Enfermidades (CDC) de Atlanta, Geórgia, Estados Unidos da América, durante a epidemia de encefalite equino-venezuelana verificada naquele ano.

Como sistema de isolamento foi empregado o

rato lactante. Foram realizadas provas de sensibilidade ao éter e ao dexicolato de sódio (DCS). Foram também preparados antígeno extraído com sacarose-acetona e líquido ascítico imune em rato. Para identificar a variedade, realizaram-se provas de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e neutralização mediante a redução da formação de placas em cultura de tecidos.

A variedade em questão, denominada ZG-37, mostrou-se sensível ao éter e ao DCS. O antígeno

produziu hemaglutinação das hemácias de ganso. A prova de neutralização permitiu identificá-la como correspondente ao vírus Mermet.

Foi essa a primeira vez que se isolou o vírus

Mermet fora dos Estados Unidos, e também a primeira numa região neotropical.

O isolamento referido confirma o papel das aves como hóspedes vertebrados importantes do vírus Mermet e dos arbovírus em geral.

Isolement du virus Mermet au Guatemala (Résumé)

Le présent article fait état de l'isolement du virus Mermet dans le sang d'un loriot Altamira Lichtenstein (*Icterus gularis*) capturé à Zacapa, Guatemala en 1969.

La capture eut lieu dans le cadre du travail sur le terrain réalisé par l'Unité des Arbovirus du Centre de lutte contre les maladies (CDC), Atlanta, Géorgie, Etats-Unis d'Amérique, pendant l'épidémie d'encéphalite équine qui sévit cette année-là.

Pour l'isolement, on recourut à la ratte grvide. Les intéressés effectuèrent des épreuves de sensibilité à l'éther et au déoxycolate de sodium (DCS). Ils préparèrent également un antigène extrait avec de l'acétone et du liquide acétique immun chez la ratte. Pour identifier la

souche, ils firent des épreuves d'inhibition par hémagglutination, de fixation du complément et de neutralisation par réduction de la formation de plaques en culture de tissus.

Dénommée ZG-37, cette souche fut sensible à l'éther et au DCS. L'antigène produisit l'hémagglutination des hématies de l'oie. L'épreuve de neutralisation permit de l'identifier comme correspondant au virus Mermet.

C'est la première fois que le virus Mermet a été isolé en dehors des Etats-Unis et de la région néotropicale.

Cet isolement montre bien le rôle que jouent les oiseaux comme hôtes vertébrés importants du virus Mermet et des arbovirus en général.