

EL VIRUS ORPOUCHE. TRANSMISION EN EL LABORATORIO POR CULEX QUINQUEFASCIATUS¹

Alfred L. Hoch,² Francisco P. Pinheiro,³ Donald R. Roberts⁴
y Maria de Lourdes C. Gomes⁵

INTRODUCCION

En la actualidad el virus Orpouche (ORO) es la principal causa de epidemias de arbovirosis en la cuenca amazónica. Los resultados de detallados estudios epidemiológicos y entomológicos que se efectuaron durante varias epidemias de ese tipo, así como investigaciones sobre la transmisión realizadas en el laboratorio, demuestran claramente que *Culicoides (C.) paraensis* (Goeldi) es el principal vector de la fiebre de Orpouche en las zonas urbanas (1-6). El vi-

rus ORO es entonces el primer arbovirus de reconocida trascendencia para la salud pública transmitido por jevenes hematófagos del género *Culicoides*. Sin embargo, el aislamiento del virus ORO en tres grupos de especímenes de *Culex (Cx.) quinquefasciatus* Say y la presencia de casos de infección en el hombre en zonas urbanas con densas poblaciones de *C. paraensis* y *Cx. quinquefasciatus* señalaron la posibilidad de que este mosquito urbano común fuera un vector del virus ORO (1, 3, 6). En este artículo se informa sobre investigaciones que se efectuaron en el laboratorio para comprobar y cuantificar la eficacia de *Cx. quinquefasciatus* en la transmisión mecánica y biológica del virus ORO.

¹ Se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* Vol. 21, No. 1, 1987. Parte de este estudio se llevó a cabo con fondos provenientes del Programa Polamazonia de la Superintendencia de Desarrollo de la Amazonia. La investigación se efectuó en conjunto con el Proyecto BRA 4311 de la OPS y contó en parte con el apoyo del Comando de Desarrollo e Investigaciones Médicas del Ejército de los Estados Unidos de América. Oficina del Director de Servicios de Salud, Washington, DC, mediante el contrato para investigaciones DAMD 17-74-G-9387. Las opiniones aquí expresadas son las de los autores y no deben interpretarse como criterios oficiales o del Departamento del Ejército de los Estados Unidos. En el estudio descrito en este artículo, los investigadores aplicaron las normas establecidas en la *Guide for the Care and Use of Laboratory*

Animals del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigaciones. Las instalaciones cuentan con la aprobación plena de la Asociación Americana de Certificación del Cuidado de los Animales de Laboratorio.

² Unidad de Investigaciones Médicas del Ejército de los Estados Unidos de América, Brasília, Brasil. Dirección postal: APO Miami, Florida 34030-0008, EUA.

³ Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.

⁴ Uniformed Services University of the Health Sciences, Departamento de Medicina Preventiva y Biométrica, Bethesda, Maryland, EUA.

⁵ Ministério da Saúde, Fundação de Serviços de Saúde Pública, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil.

MATERIALES Y METODOS

Mosquitos

Durante 1975 y 1978 en diversos sitios de Belém, estado de Pará, Brasil, se recolectaron hembras adultas de *Cx. quinquefasciatus* que se emplearon en los estudios sobre la transmisión. Los dos primeros experimentos relacionados con la transmisión se efectuaron con especímenes de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de colonias obtenidas a partir de ejemplares capturados en su medio natural en 1975. El tercer experimento se llevó a cabo con poblaciones de laboratorio integrantes de la primera generación filial de hembras de esa especie capturadas sobre el terreno en 1978. Se conservaron todos los especímenes en el laboratorio a 26,5 °C, con una humedad relativa del 95% y períodos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A los ejemplares adultos de *Cx. quinquefasciatus* se les proporcionó una solución de sacarosa al 10%.

Tres o cuatro días después de llegar a la forma adulta, se permitió a los mosquitos alimentarse con la sangre de un hámster con viremia. Para esto, 24 horas antes de cada intento de que efectuaran la succión se retiraba la solución de sacarosa de la jaula que contenía los mosquitos. Los recipientes para oviposición también se retiraban durante los períodos destinados a la succión, pero estaban a disposición de las poblaciones de especímenes de prueba el resto del tiempo.

Cepas de virus y ensayos

En informes anteriores (1, 4, 7), se han indicado los métodos utilizados para aislar e identificar los virus y para las pruebas serológicas. En todas las pruebas se usó el prototipo Belém del virus ORO (Be An 19991). Ya se han presentado en otro informe los datos concernientes a esta cepa, incluso los relacionados con los países (5).

Transmisión biológica

Se incitó a hembras adultas de *Cx. quinquefasciatus* a alimentarse con sangre infectante colocando un hámster con viremia inmovilizado en una jaula de 28,3 dm³ de capacidad, que contenía entre 200 y 350 mosquitos adultos. Después de 90 minutos de exposición, se retiró el hámster y se reunieron y colocaron en una jaula distinta los mosquitos atiborrados de sangre. Todos los intentos de que se efectuara la succión se realizaron durante el período de 12 horas de oscuridad. Nunca se mezclaron los grupos de mosquitos alimentados con la sangre de distintos hámsters con viremia y se consideró que estaban potencialmente infectados todos los especímenes que chuparon esa sangre.

Para comprobar la transmisión del virus se emplearon hámsters dorados de Siria jóvenes (de 21 a 23 días de edad), que fueron expuestos en forma individual a las picaduras de uno o más mosquitos entre tres y 21 días después de que estos succionaran sangre infectante. Los mosquitos usados en cada prueba de transmisión se conservaron congelados a -70 °C y más tarde se investigó en ellos la presencia de virus. Los hámsters de experimentación se utilizaron solo una vez durante la serie de pruebas de transmisión. Después del período de exposición, se aislaron y observaron durante 21 días con el fin de detectar signos de enfermedad en aquellos hámsters que habían

sido picados por mosquitos potencialmente infectados. Mediante la prueba de neutralización y reducción en placas, se trató de detectar la presencia de anticuerpos contra el virus ORO en los ejemplares que sobrevivieron después del período de observación.

Transmisión mecánica

Se efectuaron dos pruebas para comprobar la transmisión mecánica del virus ORO por especímenes de *Cx. quinquefasciatus*. El procedimiento consistió en aspirar una gran cantidad de mosquitos (>100) posados sobre un hámster con viremia antes de que completaran la succión de sangre y transferirlos a una jaula. Durante una hora se expuso un hámster sensible al virus a esta población de mosquitos inmediatamente después de transferirlos a la jaula; después se retiró este hámster y se colocó otro que permaneció en la jaula hasta la mañana siguiente. Con la ayuda de una linterna, se efectuaron observaciones para verificar que los mosquitos potencialmente infectantes se alimentaban con la sangre de cada hámster receptor o, al menos, los picaban. Se observaron los

hámsters durante 21 días y se efectuaron pruebas con muestras de su sangre para detectar anticuerpos neutralizantes contra el virus ORO.

RESULTADOS

Transmisión biológica

En el primer experimento se incluyeron dos grupos de *Cx. quinquefasciatus* (cuadro 1). Estos grupos de mosquitos se alimentaron con la sangre de hámsters que contenía una dosis de virus ORO letal para ratones lactantes, en una proporción de 50% por ml (DLRL₅₀/ml) de 10^{9.9} DLRL₅₀/ml en el caso del primer grupo, y de 10^{9.7} DLRL₅₀/ml en el caso del segundo grupo. Ninguno de los hámsters receptores picados por los mosquitos dio muestras de enfermedad y en solo uno de los 16 animales se produjeron anticuerpos neutralizantes. Este único caso de seroconversión había sido

CUADRO 1. Resultados de intentos de transmitir en el laboratorio el virus oro de hámsters infectados a otros sanos usando *Culex quinquefasciatus* (primer experimento)

Días posteriores a la ingestión de sangre infectante	Titulación de virus en la sangre infectante ingerida			
	10 ^{9.9} DLRL ₅₀ /ml		10 ^{9.7} DLRL ₅₀ /ml	
	Número de mosquitos que ingirieron sangre	Resultados de la transmisión (+ o -)	Número de mosquitos que ingirieron sangre	Resultados de la transmisión (+ o -)
3	14	-	17	-
4	24	-	30	-
6	28	-	33	-
8	21	+	19	-
10	4	-	8	-
12	5	-	14	-
14	17	-	23	-
16	9	-	13	-

picado por 21 mosquitos ocho días después de que ingirieran sangre infectante.

En el segundo experimento, un grupo de *Cx. quinquefasciatus* de cuatro días de edad se alimentó con la sangre de un hámster que contenía una titulación de virus de $10^{9.5}$ DLRL₅₀/ml, y otro grupo de mosquitos de tres días de edad ingirió la sangre de un hámster cuya concentración de virus era de $10^{9.7}$ DLRL₅₀/ml (cuadro 2). Se permitió que uno o ambos grupos se alimentaran con la sangre de hámsters sanos los días 15o., 16o. y 21o. posteriores a la ingestión de sangre de hámsters vírémicos. Se recuperó el virus Oropouche en un hámster que había sido picado por 33 mosquitos en el día 21o. No resultó infectado ningún otro hámster expuesto a cualquiera de los dos grupos de mosquitos. Inmediatamente después de la segunda exposición de los hámsters a las picaduras y 16 días después de que los mosquitos ingirieran sangre infectante, se tomaron 30 especímenes de estos hematófagos potencialmente infectados y se los sometió a pruebas individuales para detectar la presencia del virus; solamente en uno de ellos se recuperó el virus Oropouche. En el día 22o. se efectuaron pruebas con otros 15 mosquitos, pero no se logró aislar el virus.

En el tercer experimento (cuadro 3), se usaron mosquitos provenientes de la primera generación filial de *Cx. quinquefasciatus* atrapados en su medio natural, con el fin de evitar cualquier modificación genética en cuanto a sensibilidad que pudiera resultar de una colonización prolongada. Tres grupos de mosquitos ingirieron sangre de hámsters con titulaciones de virus ORO de $10^{6.3}$, $10^{7.0}$ y $10^{7.1}$ DLRL₅₀/ml. En los días 7o., 14o. y 21o. después de la ingestión, los mosquitos potencialmente infectados picaron a hámsters sanos. Un total de 29 hámsters sanos estuvieron expuestos a las picaduras del grupo de mosquitos alimentados con la sangre con menor titulación de virus ($10^{6.3}$ DLRL₅₀/ml). Se permitió a los otros dos grupos de mosquitos ingerir sangre de 59 hámsters sanos. El número de picaduras recibidas por los hámsters varió entre una y 12, y la mayoría de ellos recibió más de cinco picaduras. Ninguno de estos animales mostró signos de infección vírica y no se detectó seroconversión mediante pruebas de neutralización y reducción en placas. También se efectuaron pruebas para aislar el virus ORO en 282 mosquitos alimentados con sangre de los hámsters no infectados. Se aisló el virus en un grupo de ocho mosquitos que habían picado al hámster con viremia con una titulación de $10^{6.3}$ DLRL₅₀/ml.

CUADRO 2. Resultados de intentos de transmitir en el laboratorio el virus oro de hámsters infectados a otros sanos usando *Culex quinquefasciatus* (segundo experimento)

Días posteriores a la ingestión de sangre infectante	Titulación de virus en la sangre infectante ingerida			
	$10^{9.7}$ DLRL ₅₀ /ml		$10^{9.5}$ DLRL ₅₀ /ml	
	Número de picaduras	Resultados de la transmisión (+ 0 -)	Número de picaduras	Resultados de la transmisión (+ 0 -)
15	49	-	0	-
16	0	-	50	-
21	10	-	33	+ ^a

^a La infección por virus ORO se confirmó mediante el aislamiento del virus y la identificación serológica.

CUADRO 3. Síntesis de los intentos de transmitir el virus oro a hámsters sensibles usando *Culex quinquefasciatus*

Días posteriores a la ingestión de sangre infectante	Número de hámsters sensibles expuestos	Número de mosquitos que picaron a los hámsters sensibles	Resultados de la transmisión del virus oro (+ 0 -)
7	27	86	-
14	33	55	-
21	28	141	-

Transmisión mecánica

En dos pruebas que se realizaron por separado se trató de comprobar la transmisión mecánica del virus ORO de hámsters virémicos a otros sanos. Los dos hámsters infectados por el virus presentaban viremias con concentraciones del virus de $10^{8.7}$ y $10^{9.2}$ DLRL₅₀/ml. Una gran cantidad de mosquitos potencialmente infectados (> 50) picó o ingirió la sangre de cada uno de los cuatro hámsters sensibles. No obstante, ninguno de estos mostró signos de infección vírica y no se detectaron anticuerpos contra el virus ORO en las muestras de sangre tomadas 21 días después de la exposición a los mosquitos potencialmente infectados.

DISCUSION

Se ha especulado mucho acerca de la función de *Cx. quinquefasciatus* como vector del virus ORO, fundamentalmente sobre la base de observaciones efectuadas durante investigaciones epidemiológicas. En consecuencia, se llevaron a cabo estudios sobre la transmisión para evaluar la capacidad de ese mosquito como vector en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos constituyen la primera comprobación de que *Cx. quinquefasciatus* puede efectuar la transmisión del virus ORO de un ani-

mal a otro. Teniendo en cuenta el bajo porcentaje de transmisión y las escasas infecciones en los mosquitos en condiciones óptimas, no se ha demostrado que sea un vector eficiente en el laboratorio. Se documentó que se produjo la transmisión del virus ORO en dos de 108 intentos y se recuperó el virus en solo dos de 327 mosquitos que ingirieron sangre de los hámsters virémicos. Este último dato indica un índice mínimo de infección por el virus ORO en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* incluidas en las pruebas, con un valor de 1:163. Como las titulaciones de virus ORO en los hámsters usados como donantes en general fueron mucho más elevadas que las que se han encontrado en personas infectadas por fiebre de Oropouche (entre $10^{5.2}$ y $10^{7.3}$ DLRL₅₀/ml), sería razonable suponer que los índices mínimos de infección en el caso de las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* que existen en medios naturales serán mucho más bajos que los índices obtenidos en estos experimentos (8). De hecho, se estima que el índice mínimo de infección durante epidemias, calculado a partir de datos no publicados provenientes de actividades de vigilancia, es de 1:18 037 (2/36 074).

Se ha documentado la existencia de índices elevados de infección en el hombre durante epidemias de fiebre de Oropouche (1, 2). Como no se produce la transmisión de persona a persona (1), un índice elevado de ataque implica que existe 1) transmisión biológica eficaz, 2) transmisión mecánica o 3) una combinación de transmisión biológica y mecánica. De acuerdo con la información obtenida en estos experimentos, es muy poco probable que *Cx. quinquefasciatus* pueda ser el principal vector del virus ORO en las epidemias urbanas. Por otra parte, el fracaso del intento de comprobar la transmisión mecánica en dos pruebas de laboratorio distintas, indica que *Cx. quinquefasciatus* probablemente no sea un transmisor mecánico del virus en el medio natural. También se obtuvieron resultados negativos en pruebas similares con *C. paraensis* (5). Por consiguiente, la transmisión mecánica no es una explicación de los elevados índices de ataque durante las epidemias de fiebre de Oropouche.

En síntesis, se comprobó que *Cx. quinquefasciatus* es un vector ineficiente del virus ORO y esto concuerda con la hipótesis de que *C. paraensis* es el principal vector de ese virus en las zonas urbanas de la cuenca amazónica.

RESUMEN

Se efectuaron investigaciones experimentales para determinar el potencial de *Culex quinquefasciatus* Say como vector del virus Oropouche (ORO). Se permitió que mosquitos de una colonia de laboratorio y otros nacidos de los huevos de hembras capturadas en su medio natural se alimentaran con la sangre de hámsters con viremia. Para comprobar la transmisión del virus, después de la ingestión de sangre infectante se retuvo a los mosquitos durante diversos períodos y luego se les dejó picar a hámsters sanos. La eficacia de la transmisión fue escasa. Se expusieron 108 hámsters sanos a las picaduras de mosquitos potencialmente infectados y se recuperó el virus ORO en solo uno de ellos; además, se produjo la seroconversión únicamente en un hámster. El índice mínimo de infección en los mosquitos *Cx. quinquefasciatus* que ingirieron sangre de hámsters con titulaciones de virus ORO equivalentes a $10^{6.3}$ – $10^{9.9}$ de la dosis letal para ratones lactantes en una proporción de 50% por ml fue de 1:163 (2/327). No se pudo comprobar la transmisión mecánica del virus ORO de hámsters infectados a otros sanos mediante el método de ingestión interrumpida de la sangre de los animales. □

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo brindado por Raimundo Pio Girard Martins, José Bento Pereira Lima, Maria Teresinha de Jesus Silva de Souza, José Luis da Costa Baía y Francisco Ferreira de Carvalho, todos ellos técnicos del Instituto Evandro Chagas.

REFERENCIAS

- 1 Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. A., Travassos da Rosa, J. F., Ishak, R., Frietas, R. P., Gomes, M. L. C., LeDuc, J. W. y Oliva, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):153-164, 1981.
- 2 Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. A., Travassos da Rosa, J. F. y Bensabath, G. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarem, Para, Brazil. *Trop Med Parasitol* 27:213-223, 1976.
- 3 Pinheiro, F. P., Pinheiro, M., Bcnsabath, G., Caucy, O. T. y Shope, R. E. Epidemia de virus Oropouche en Belém. *Rev Serv Esp Saude Publica* 12:15-23, 1962.
- 4 Dixon, K. E., Travassos da Rosa, A. P. A., Travassos da Rosa, J. F. y Llewellyn, C. H. Oropouche virus. II. Epidemiological observations during an epidemic in Santarem, Para, Brazil in 1975. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):165-168, 1981.
- 5 Pinheiro, F. P., Hoch, A. L., Gomes, M. L. C. y Roberts, D. R. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):176-180, 1981.
- 6 Roberts, D. R., Hoch, A. L., Dixon, K. E. y Llewellyn, C. H. Oropouche virus. III. Entomological observations from three epidemics in Para, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):169-175, 1981.
- 7 Hardy, J. L., Reeves, W. C. y Sjogren, R. D. Variations in the susceptibility of field and laboratory populations of *Culex tarsalis* to experimental infections with western equine encephalomyelitis virus. *Am J Epidemiol* 103:498-505, 1976.
- 8 Pinheiro, F. P., LeDuc, J. W., Travassos da Rosa, A. P. A., Gomes, M. L. C. y Hoch, A. L. Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science* 215:1251-1253, 1982.

SUMMARY

LABORATORY TRANSMISSION OF OROPOUCHE VIRUS BY *CULEX QUINQUEFASCIATUS* SAY

Experimental studies were conducted to determine the vector potential of *Culex quinquefasciatus* Say for Oropouche (ORO) virus. Mosquitoes from a laboratory colony and mosquito offspring of field-collected adults were allowed to feed on viremic hamsters. The mosquitoes were held for various intervals of time following the infectious blood meal and were then fed on normal hamsters.

The efficiency of virus transmission by this method was low. Despite the fact that 108 normal hamsters were exposed to potentially infected mosquitoes, ORO virus was recovered from only one hamster; another hamster experienced seroconversion to ORO virus. The minimal infection rate of *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes that fed on hamsters circulating $10^{6.3}$ to $10^{9.9}$ suckling mouse 50% lethal doses of ORO virus per ml was found to be 1:163 (2/327). Tests using the interrupted blood meal method failed to demonstrate mechanical transmission of ORO virus from infected to normal hamsters.