

SIGMODON ALSTONI POTENCIAL RESERVORIO NATURAL DEL VIRUS GUANARITO (*)

R. Tesh (1), M. Wilson (1), R. Salas (2), D. Tovar (2), T. Ksiazek (3), N. Manzione (4), C.J. Peter (3), B. Ramos (2), M.E. Pacheco (2), C. Vásquez (2), J. Muñoz (2) y E. Miller (2).

RESUMEN

La Fiebre Hemorrágica Venezolana es una enfermedad severa causada por el virus Guanarito que aparece en forma endemo-epidémica en Venezuela a partir de 1989. Los Arenavirus utilizan como reservorio a los roedores para persistir en la naturaleza, siendo específicos para la especie que les sirve como hospedador. La infección del humano ocurre por contacto con secreciones de estos animales. Para conocer el reservorio natural del virus Guanarito, se capturaron 256 ejemplares de roedores en 5 áreas representativas de los tipos de hábitat del Municipio Guanarito del Edo. Portuguesa. Los animales fueron clasificados en 9 especies y se recolectaron muestras de sangre y bazo para realizar estudios virológicos. El macerado de cada bazo fue inoculado en células VERO E6 para aislamiento viral y en la sangre se determinaron anticuerpos específicos para el virus Guanarito por la técnica de IFI.

Los resultados indicaron una alta densidad de roedores en la Hoyada y la Arenosa donde las especies dominantes en orden de importancia fueron: *Zygodontomys brevicauda*, *Sigmodon alstoni*, *Rattus rattus*, *Proechymys guairae* y *Oryzomys fulvecens*.

Todas estas especies se encontraron susceptibles a la infección por el virus Guanarito; el mayor porcentaje de roedores infectados se encontró en la especie *Sigmodon alstoni* (52,6%) y *Zygodontomys brevicauda* (26,3%). De especial interés fue el hallazgo que 9 de 13 animales de esta última especie, excretaba virus en presencia de anticuerpos humorales.

Estos resultados indican que el virus Guanarito está ampliamente distribuido entre los roedores dominantes en esta zona del país, pero la especie *Sigmodon alstoni* es reservorio potencial del virus, las otras especies son reservorios transitorios que contribuyen a mantener el virus en la naturaleza y también constituyen una fuente de infección para el humano.

INTRODUCCION

La Fiebre Hemorrágica Venezolana (FHV) es una enfermedad febril severa causada por el Arenavirus Guanarito transmitido por roedores; esta enfermedad aparece por primera vez en 1989 afectando la población del Municipio Guanarito Estado

(1) Universidad de Yale; (2) Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"; (3) Centros para el Control de Enfermedades (CDC, Atlanta); (4) Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.

(*) Este trabajo se hizo acreedor a una mención honorífica del Premio otorgado por la Sociedad Científica del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", durante la celebración de la 54ava Semana Aniversaria del Instituto.

Portuguesa (1). Los informes epidemiológicos indican que desde su aparición hasta el presente se han registrado 93 casos con 33 muestras registrándose una mayor incidencia de casos durante los años 1990 y 1991 (2). Los Arenavirus, con excepción del virus Tacaribe están altamente adaptados a roedores produciendo una infección persistente caracterizada por viremia crónica durante la gestación o en el período neonatal (3). Otra característica biológica importante de la familia Arenaviridae es que son altamente selectivos para la especie de roedor que utiliza como reservorio natural, lo que determina en parte la distribución de estos virus tan restringida en áreas geográficas muy definidas (4).

El presente estudio tuvo por objetivo la identificación de la especie de reservorio natural del virus Guanarito.

MATERIALES Y METODOS

Áreas de estudio

Para el muestreo de roedores se seleccionaron cinco (5) áreas del Municipio Guanarito Estado Portuguesa, donde han ocurrido casos de FHV: La Hoyada, La Arenosa, Cogollal, Palmarito Curbeleño y Pirital; por otra parte se intentó evaluar distintos hábitats domésticos y peridomésticos, incluyéndose: campos de cultivo, campos de pastoreo de animales, campos no cultivados con maleza y bosques secundarios.

Captura de animales

La captura de animales se realizó durante tres semanas consecutivas, colocando diariamente 200 trampas tipo sherman (para especies pequeñas) y tipo National (para especies grandes). Los animales fueron capturados vivos, anestesiados con cloroformo y se clasificaron en forma preliminar, luego fueron sacrificados y se recolectó sangre y bazo; las muestras fueron conservadas y posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Un representante de cada especie de roedor fue conservado en formol para su clasificación definitiva.

Estudios Viroológicos

Los estudios virológicos se basan en el aislamiento e identificación del virus Guanarito a partir del bazo y en la determinación de anticuerpos clase IgG específicos en las muestras de sangre.

Para el aislamiento del virus, se preparó suspensión al 2% de cada bazo en medio esencial mínimo suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% de estreptomycin y 1% de penicilina (MEM-SUP). Se inocularon 0,2 ml de cada suspensión de bazo en monocapas confluentes de células Vero E6 preparadas previamente en frascos de cultivo (Falcon TC-25) utilizando MEM-SUP, los cultivos inoculados fueron incubados a 37°C en atmósfera de 0,5% de CO₂ durante siete días. Posteriormente se realizó la detección del virus utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (5) para lo cual, se prepararon frotis a partir de suspensión de las células inoculadas en láminas portaobjetos; los frotis después de secarse se fijaron en acetona a 4°C, para la primera reacción antígeno-anticuerpo se utilizó una dilución óptima de líquido ascítico de ratón hiperinmune para el virus Guanarito (VHF-MAF-YARU), y para la segunda reacción se utilizó también una dilución óptima de conjugado antiratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (goat anti mouse anti IgG FIT label, Sigma). Se consideraron positivos para virus Guanarito aquellos cultivos inoculados en los cuales se obtuvo inmunofluorescencia específica.

Para la detección de anticuerpos clase IgG específica se realizó igualmente la técnica de IFI utilizando frotis sobre portaobjetos de células Vero E6 infectadas con virus Guanarito. La reacción antígeno anticuerpo se realizó utilizando la sangre de cada uno de los animales y la reacción se reveló con conjugado antiespecie marcado con fluoresceína (goat anti mouse IgG FIT-Label Sigma, y goat anti hamster IgG FIT-Label Sigma). Las reacciones positivas fueron consideradas aquellas donde se observó inmunofluorescencia específica.

RESULTADOS

Se capturaron un total de 253 animales de 11 especies diferentes, 9 de roedores y 2 de

marsupiales. El ratón de la caña de azúcar *Zygodontomys brevicauda* fue el roedor más abundante, capturándose 102 animales (45%) seguido del ratón algodónero *Sigmodon alstoni* con un total de 42 especímenes (16,6%), la tercera en importancia fue la rata negra *Rattus rattus* en un número de 32 (12,6%), luego *Proechymys guairae* con 25 (9,9%) y *Oryzomys fulvecens* con 21 (8,3%). Se encontraron otras cuatro especies en menor número que fueron: *Holochilus brasiliensis*, *Oecomys speciosus*, *Oecomys flavicans*, *Heteromys anomalus* y como se indicó anteriormente dos especies de marsupiales: *Marmosa robinsoni* y *Didelphis marsupialis*.

El análisis sobre densidad de roedores por localidad estudiada indicó que el mayor número de animales capturados fue en La Hoyada: 131 (52%), seguido por La Arenosa: 78 (31%) y Palmarito Curveleño 28 (11%), mientras que en Cogollal y Pirital sólo se capturaron 8 animales en cada localidad.

Las especies de roedores predominantes se encontraron en todos los hábitats peridomésticos pero el mayor número de capturas se obtuvo en los sitios donde se alternaba cultivos con maleza y como era de esperar la especie *Rattus rattus* sólo se encontró en las casas.

Las especies de roedores susceptibles a la infección por virus Guanarito basado en el aislamiento de virus o la presencia de anticuerpos específicos se muestra en la Tabla, podemos ver que todas las especies de roedores predominantes en el Municipio Guanarito son susceptibles a infectarse por este Arnavirus encontrándose que en el 11,3% de los *Zygodontomys brevicauda* capturados se aisló el virus y el 15% tenían anticuerpos. De particular interés fue que en el *Sigmodon alstoni* se aisló virus en el 47,5% y sólo el 5,1% tenían anticuerpos; en el resto de las especies sólo se detectó anticuerpos: en *Rattus rattus* el 6,3%, *Proechymys guairae* 4,2% y *Oryzomys fulvecens* 9,5%.

La relación de roedores positivos por localidad estuvo (gráfico No. 1) directamente relacionada con la densidad de roedores predominantes: en La Hoyada y en La Arenosa donde se capturó el mayor número de roedores, se registraron los más altos

porcentajes de infección; Pirital y Cogollal fueron localidades con baja densidad de roedores y por tanto con bajos porcentajes de infección. El papel que juega la rata negra *Rattus rattus* requiere análisis posteriores ya que el porcentaje de animales infectados de esta especie no estuvo en relación directa con la cantidad de animales capturados en las distintas localidades.

Haciendo un análisis más detallado de la rata de infección y prevalencia de anticuerpos para el virus Guanarito en las dos especies de roedores predominantes *Sigmodon alstoni* y *Zygodontomys brevicauda* (gráfico No. 2), pudimos observar que de los 17 *Zygodontomys brevicauda* encontrados positivos el 35,2% se habían liberado completamente de la infección viral presentando sólo anticuerpos, el 17,6% estaban virémicos y el 47% presentaban infección activa en presencia de anticuerpos circulantes, por otra parte de los 22 *Sigmodon alstoni* positivos sólo el 9,1% tenían anticuerpos y el 90,9% presentaron infección activa en ausencia de anticuerpos. Este hallazgo es de considerable importancia.

TABLA: Rata de infección por virus Guanarito en roedores. Municipio Guanarito Estado Portuguesa. 1.992

ESPECIE	AISLAMIENTO VIRAL		ANTICUERPOS	
	# ANIMALES	% POSITIVOS	% ANIMALES	% POSITIVOS
<i>Zygodontomys brevicauda</i>	106	11,3	100	15
<i>Sigmodon alstoni</i>	40	47,5	39	5,1
<i>Rattus rattus</i>	34	0	32	6,3
<i>Proechymys guairae</i>	25	0	24	4,2
<i>Oryzomys fulvecens</i>	22	0	21	9,5
<i>Holochilus brasiliensis</i>	3	0	3	0
<i>Oecomys speciosus</i>	2	0	2	0
<i>Oecomys flavicans</i>	1	0	1	0
<i>Heteromys anomalus</i>	1	0	1	0
<i>Marmosa robinsoni</i>	16	0	0	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	2	0	0	0

GRAFICO Nº 1

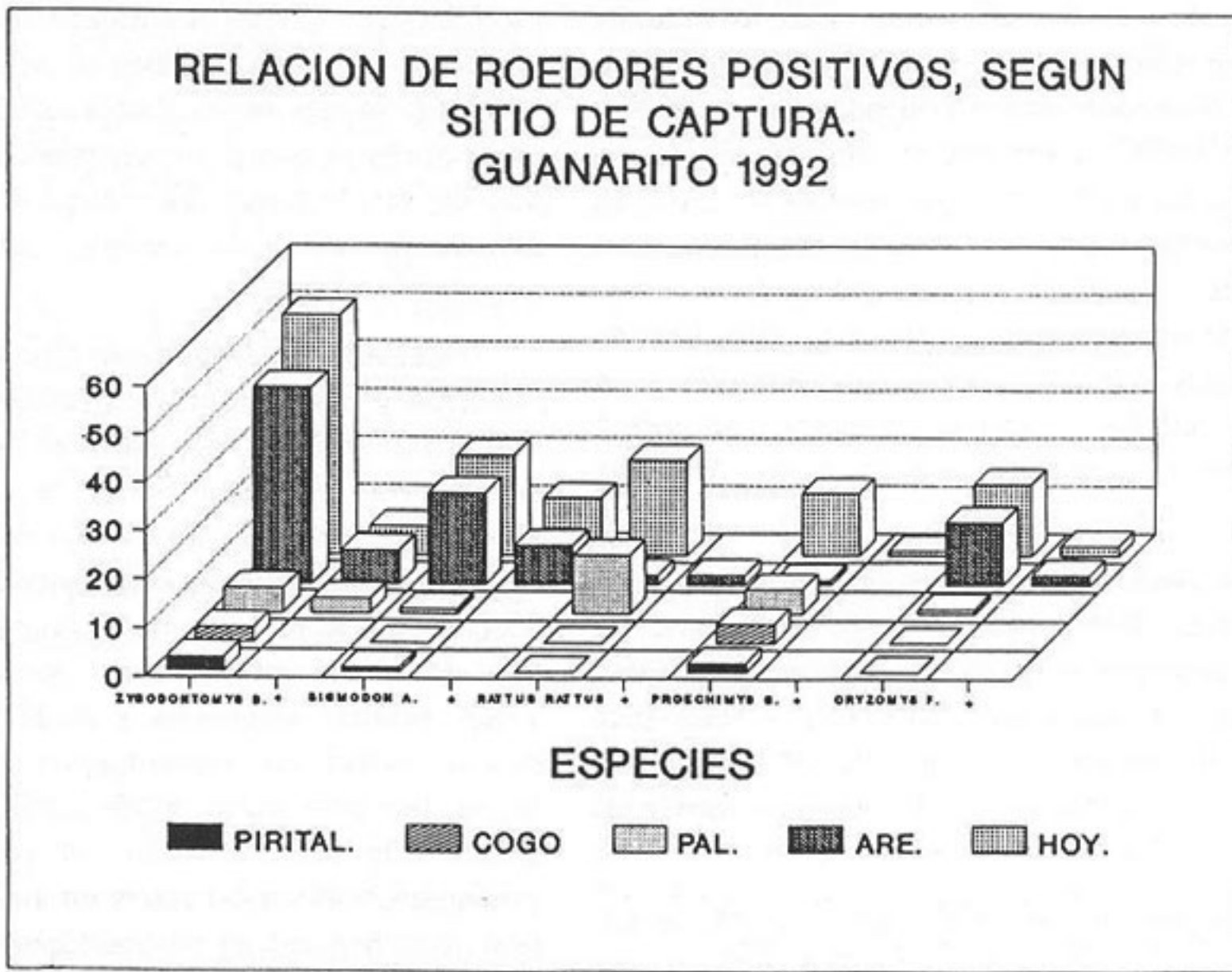
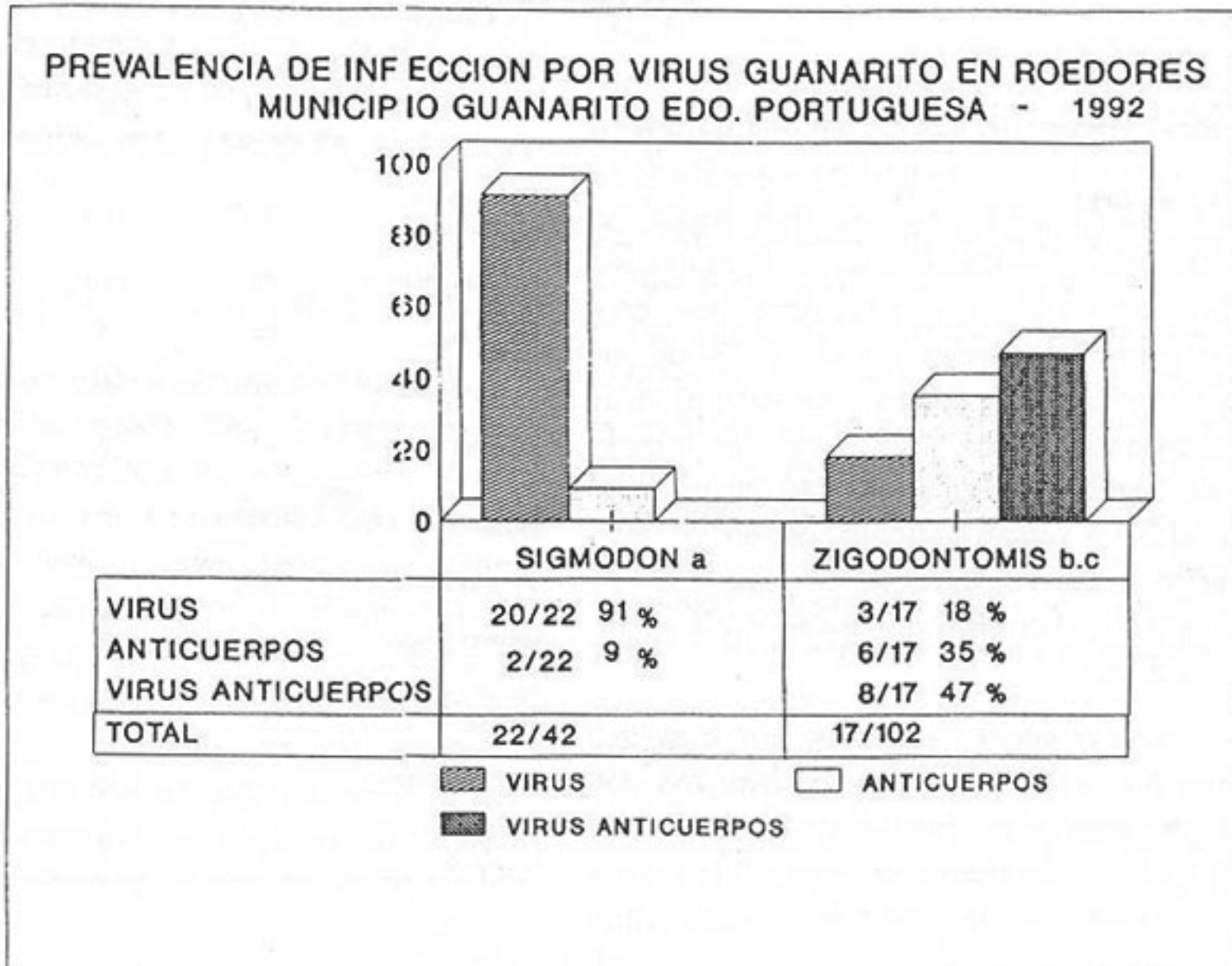


GRAFICO Nº 2



DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el virus Guanarito está ampliamente distribuido entre los roedores salvajes y domésticos de la región lo que indica que el humano está en constante riesgo de infección por la gran variedad de hábitats en que se encuentran roedores infectados; sin embargo este riesgo se incrementa cuando aumenta la población de roedores y por lo tanto es necesario conocer el comportamiento de las poblaciones para introducir las medidas de control efectivas.

En el presente trabajo se encontró una alta rata de animales virémicos, en la especie *Sigmodon alstoni*, y sólo un bajo porcentaje, había desarrollado infección inmunizante, lo cual sugiere que esta especie sea el reservorio principal del virus Guanarito. Además la especie *Zygodontomys brevicauda*, puede ser un huésped secundario importante en la conservación del virus en la naturaleza, debido a la proporción de animales que estaban virémicos, en presencia o no de anticuerpos.

Estudios realizados en condiciones naturales y experimentales demuestran que diferentes especies de roedores pueden ser susceptibles a la infección por un determinado Arenavirus, pero sólo una especie en particular y en hábitats muy específicos, sirven como reservorios naturales (4,6). Por ejemplo: se ha demostrado que la especie *Calomys musculinus* es el principal reservorio natural del virus Junin porque estos animales típicamente desarrollan infección crónica con viremia y viriuria persistente, mientras que otras 6 especies de roedores comunes en el área endemo-epidémica de fiebre hemorrágica Argentina son susceptibles a infectarse, tres de ellas: *Balomys* sp., *Clomys laucha* y *Akodon azarae*, desarrollan infecciones subagudas caracterizadas por viremia y viriuria por períodos de 30-60 días post-infección, luego estos animales desarrollan respuesta inmune efectiva en la eliminación del virus del organismo. Estas especies se consideran como reservorios transitorios del virus Junin y juegan un papel importante en la cadena de transmisión del virus (6).

Los estudios sobre la distribución geográfica de las especies *Sigmodon alstoni* y *Zygodontomys brevicauda* indican que el primero está distribuido en: Llanos Occidentales, estados Anzoátegui, Sucre y Bolívar de Venezuela, región este de las Guayanas y norte de Brasil y el *Zygodontomys brevicauda* tiene una distribución más amplia: desde el sur de Costa Rica hasta el norte de la América del Sur (7), sin embargo hasta la fecha todos los casos de la FHV se han confinado al Municipio Guanarito del Estado Portuguesa y áreas adyacentes al Estado Barinas. Para determinar con exactitud la distribución geográfica del virus Guanarito se requiere conocer la prevalencia de infección de las dos especies *Sigmodon alstoni* y *Zygodontomys brevicauda* en áreas fuera de la zona endémica ya que se ha demostrado para el virus Junin niveles bajos de infección en especies diferentes del reservorio natural: *Calomys musculinus* fuera del foco endémico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos los más sinceros agradecimientos a la Dra. María Carmona de Chacón y su cuerpo gerencial del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" por su activo soporte para la realización de este estudio; al Dr. Francisco Pinheiro de la PAHO por su asistencia profesional durante el desarrollo del trabajo. También expresamos nuestra gratitud a los Dres. José Anselmi y Francisco Araoz por facilitar las labores de campo y a las Sras. Iris Rojas y Máxima Rojas por su asistencia técnica.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue soportado por: (1) Soporte financiero del National Institute of Health R37A110984-20 bajo el nombre "Support for World Reference Center for Arbovirus", a nombre del Dr. Robert Tesh Universidad de Yale y (2) Organización Panamericana de la Salud.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Salas, R.; Manzione, N.; Tesh, R.; Rico-Hesse, R.; Shope, R.; Betancourt, A.; Godoy, O.; Bruzual, R.; PAcheco, M.; Ramos, B.; Taibo, M.; Tamayo, J.; Jaimes, E.; Vásquez, C.; Araoz, F.;

- Querales, J. "Venezuelan hemorrhagic fever". *The Lancet* 338: 1033-1036. 1991.
- (2) Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Dirección de Epidemiología y Programas de Salud. División de Enfermedades Transmisibles. Boletín Epidemiológico Semanal. Sept. 1989 - Junio 1992.
- (3) Johnson, K. *Field's Virology* Cap. 44: "Arenavirus", 2a Edición, Eds. Bernard N. Fields. Raven Press. 1991.
- (4) Childs, J. and Peter, C.J. *Ecology and Epidemiology of Arenavirus and their host in the Arenaviridae*. Academic Press. 1992
- (5) Riggs, J. *Immunofluorescent staining in diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections*. Ed. E. Lennette and Schmidt. APHA. 1979.
- (6) Mills, J.; Ellis, B.; Mckee, K., Zsiazek, T.; Barrera, J.; Maiztegui, J.; Calderón, G.; Peter, C.J.; Childs, E. "Junin virus activity nonendemic loci in central Argentina". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44 (6): 589-597. 1991.
- (7) Eisenberg, J. *Mammals of the neotropics* Vol. 1 pág. 383 y 385 Chicago ed. 1989.