

COMUNICACIÓN CORTA

Estudio de Fiebre Amarilla en primates en áreas de brote de los departamentos de San Pedro y Central del Paraguay

Study of Yellow Fever in primates in outbreaks areas of the departments of San Pedro and Central in Paraguay

***Roig C^I, Miret J^{II}, Rojas A^I, Guillén Y^I, Aria L^I, Mendoza L^{IV}, Acosta ME^I, Meza T^I, Sosa L^{III}, Echagüe G^{III}, Müller VV^V, Vera de Bilbao N^I, Schinini A^{II}, Rodas JH^{VI}, Aquino VH^V**

^IDepartamento de Producción Bioquímica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

^{II}Departamento de Medicina Tropical. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

^{III}Departamento de Análisis Clínicos y Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

^{IV}Departamento de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

^VLaboratorio de Investigación en Virología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo. Brasil

^{VI}Dirección. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA). Paraguay

RESUMEN

La Fiebre Amarilla (FA) es una de las más importantes zoonosis que afecta a poblaciones humanas. La FA silvestre es imposible de ser erradicada, manteniéndose activa en zonas tropicales en África y Sudamérica. Todas las especies de primates son susceptibles y se consideran reservorios en el medio silvestre. La mortalidad es baja, se desconoce su valor con precisión, sin embargo existen epizootias con alta mortalidad, en humanos varía entre 20-50%. El objetivo de este trabajo fue buscar evidencias de FA en primates capturados en áreas de brote de FA de los departamentos de San Pedro y Central del Paraguay mediante la técnica de Neutralización por reducción de placas para FA cepa vacunal 17 D. Los resultados en los 35 primates estudiados fueron negativos, quizás por lo tardío del momento en la toma de muestras y bajo número de primates capturados.

Palabras claves: Fiebre Amarilla, primates, anticuerpos.

Abstract

Yellow Fever (YF) is one of the most important zoonotic diseases affecting human population. It is impossible to eradicate wild YF remaining active in tropical zones of Africa and South America. All species of primates are susceptible and are considered reservoirs in wild regions. Mortality is low and its precise value is unknown though there are epizootics with high mortality rates and in humans varies between 20-50%. The objective of this study was to search for evidence of YF in primates caught in YF outbreaks areas of the departments of San Pedro and Central in Paraguay through the neutralization technique by plates reduction for YF vaccine strain 17 D. The results in the 35 primates studied were negative, perhaps because of the lateness of the time sampling and the low number of captured primates.

Keywords: Yellow Fever, primates, antibodies.

* Autor correspondiente: **Bioq. Carmen Roig**. Dpto. de Producción Bioquímica. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay
Email: melliroig7@hotmail.com, croig@eticos.com.py, produccion@iics.una.py

INTRODUCCIÓN

La Fiebre Amarilla (FA) es una de las más importantes zoonosis que puede afectar a las poblaciones humanas (1). Es una enfermedad causada por un arbovirus del género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. La FA silvestre es imposible de ser erradicada, manteniéndose activa en zonas tropicales de África y América del Sur. En el ciclo silvestre en las Américas los mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes* son los principales responsables de la transmisión de la enfermedad. En el ciclo urbano, el mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de la enfermedad (2). La zona de ocurrencia de casos de FA selvática sigue restringida a la región norte del continente sudamericano e incluye la Guyana Francesa, Suriname, Guyana, Venezuela, Trinidad y Tobago, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, y la región Centro Oriental del Brasil. En el período comprendido entre 1985 y septiembre de 2004 se han notificado a la OPS un total de 3.559 casos de FA selvática que dejaron un saldo de 2.068 defunciones (3). En el Brasil, la enfermedad ocurre principalmente entre leñadores, campesinos, vaqueros, mineros, cazadores, ribereños y turistas debido a la mayor exposición a la picadura de los mosquitos (4). En Panamá, Colombia, Brasil, Trinidad y Tobago se han reportado muertes masivas y esporádicas de monos silvestres, debido a FA, particularmente *Alouatta spp* (5,6). Estudios laboratoriales realizados en las provincias de Corrientes y Chaco (Argentina) en 7 monos *Alouatta caraya* dieron resultados negativos para FA, sin embargo presentaron resultados positivos para otros *flavivirus* y *alphavirus* (7). Monos *Alouatta caraya* provenientes de la Provincia de Corrientes, Argentina y del Dpto. de Itapúa, Paraguay presentaron una prevalencia del 73% (61/84) por la técnica de neutralización de anticuerpos para el virus UNA (*alphavirus; Togaviridae*) (8). El Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del Paraguay reportó del 17 de Enero al 13 de Marzo del 2008 un total de 24 casos confirmados de FA en humanos y 8 muertes en los Departamentos de San Pedro, Caaguazú y Central en el área urbana de Laurety, San Lorenzo. Más de 1.5 millones de personas fueron vacunadas contra la FA en el país, y la campaña de vacunación masiva continúa con el fin de prevenir los casos en áreas donde los vectores están presentes (9). Las autoridades de salud deben instar a la población a notificar la muerte de monos, debido a que la verificación de una epizootia puede representar la circulación del virus de FA, en cuyo caso se debe iniciar inmediatamente la vacunación de los residentes y viajeros que penetran en la zona además de intensificar la vigilancia de casos sospechosos y de casos de fiebre e ictericia (3). Todas las especies de primates neotropicales son muy susceptibles y se consideran reservorios en el medio silvestre; la enfermedad suele ser fatal en muchas especies, siendo especialmente reportada la respuesta serológica, enfermedad clínica y muerte espontánea en *Alouatta spp*, y especies de *Callitrichinae* y *Pitheciidae* (6, 10). Aunque los primates del género *Aotus spp* también son susceptibles, probablemente sufren menos la enfermedad por su actividad nocturna (11). *Cebus spp*, *Atheles spp* y *Saimiri spp*, parecen ser más resistentes, aunque otros estudios indican que en este último la enfermedad es severa (12). Se estima que las epizootias son cíclicas con intervalos regulares de aparición, por lo que se considera al periodo inter epidémico como el tiempo requerido para la reconstitución de poblaciones de primates susceptibles (7). No se indica predisposición por sexo, así como también por grupo etéreo; aunque en los primates del Viejo Mundo y en los humanos la enfermedad clínica suele ser más frecuente y severa en juveniles (13,14). La mortalidad es baja aunque se desconoce el valor con precisión, en humanos varía entre el 20-50%, sin embargo también se indican epizootias con alta mortalidad. El diagnóstico de la FA se realiza según la historia, los factores epidemiológicos asociados y los signos clínicos. La técnica de neutralización por reducción de placas (TNRP) es una herramienta útil para el diagnóstico de la enfermedad (15-19). La detección precoz de FA en primates es importante para evidenciar actividad selvática viral y constituir un sistema de alerta temprana a fin de intensificar las medidas de control correspondientes. El objetivo de este estudio observacional, descriptivo y de corte transversal, fue buscar evidencias de Fiebre

Amarilla en primates capturados en áreas de brote de los departamentos de San Pedro y Central de Paraguay, mediante la técnica de Neutralización por reducción de placas para FA cepa vacunal 17 D. La captura de primates y toma de muestras se realizó en áreas de brote de FA en los departamentos de San Pedro y Central, el procesamiento de muestras se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de Universidad Nacional de Asunción del Paraguay (IICS-UNA) y la TNRP fue realizada en el Laboratorio de Investigación en Virología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo - Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población: Durante los meses de febrero y abril de 2008 se capturaron 35 primates en áreas rurales y urbanas de los Departamentos de San Pedro y Central del Paraguay, de los cuales, 31 primates pertenecían al género *Cebus sp.* y 4 a *Alouatta caraya*; 13 se encontraban cautivos y 22 en zonas selváticas; en cuanto a la edad, 24 eran adultos, 7 sub-adultos, 3 juveniles y 1 infantil; con respecto al sexo 21 eran machos y 14 hembras.

Metodología: La captura de los animales se realizó mediante la utilización de trampas. Los animales primeramente fueron examinados para determinar la presencia de signos asociados a FA tales como: letargia, escalofríos, vómitos con o sin sangre, orina de color amarillo intenso a verdoso e ictericia (10). Posteriormente fueron anestesiados con Clorhidrato de Ketamina 10 mg/kg por inyección intramuscular (18) y sometidos a una segunda exploración clínica para evaluar parámetros que no pueden ser estudiados si el animal no se encuentra anestesiado (evaluación de mucosas, temperatura, aparato digestivo, respiratorio).

A los primates de hasta 3 kg de peso, se les extrajo de 2-6 ml de sangre, por encima de los 3 kg de 6-10 ml de sangre de la vena femoral o braquial utilizando una jeringa y aguja compatible con el tamaño del animal y del calibre de los vasos sanguíneos.

Diagnóstico serológico:

Cultivo celular: El linaje celular Vero E6 proveniente de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fue mantenido en medio Leivobitz-15 (L-15) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) a 37° C.

Técnica de Neutralización por reducción de placas para virus de la fiebre amarilla.

Se prepararon las diluciones de las muestras (1:5) y controles positivos (líquido inmune ascítico de ratón 1:5000 y 1:10000) y se pusieron en contacto con el virus de fiebre amarilla (cepa vacunal 17 D del Brasil) en proporción (1:1) y se incubó a 37°C por una hora, se agregó 200 µL de estas diluciones en los orificios de la placa en contacto con la monocapa de células Vero E6, se incubó a 37°C por una hora, con agitación cada 15 min., luego se agregó 1 ml de overlay (49% de medio L-15, 49 % de solución de Carboximetilcelulosa, 2% de suero fetal bovino) por orificio, se incubó por 72 horas a 37°C. Finalmente se aspiró el sobrenadante y se le adicionó 200 µL de colorante Naftol Blue black, se dejó agitando por 40 min. con agitador horizontal, luego se desechó el exceso de colorante y se observó el efecto citopático en las células.

Consideraciones Éticas

Este estudio fue aprobado bajo Constancia de la Dirección de Vida Silvestre (DVS N° 02/08), y la fiscalización de la Secretaría del Medio Ambiente (SEAM).

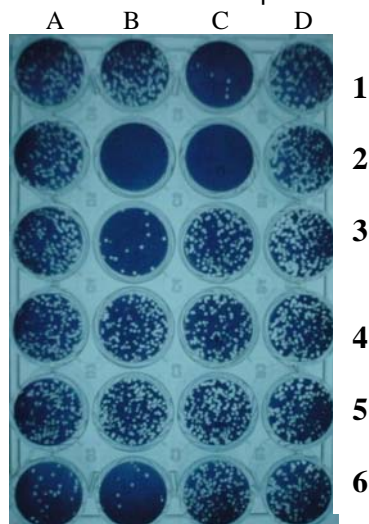
El protocolo de este estudio (P03/08) fue aprobado por los Comité Científico y Ético del IICS-UNA. Los primates capturados fueron cuidados, alimentados y manipulados considerando la Guía Internacional de utilización de animales de experimentación CIOMS-1985 (21).

RESULTADOS

Fueron evaluados clínicamente 35 primates procedentes de los Departamentos de San Pedro y Central, encontrándose que todos se hallaban sanos con temperatura de 37°C,

respiración, mucosa y conjuntiva normales. Las muestras de suero de estos primates se analizaron por la técnica de neutralización por reducción de placas para el virus de FA cepa vacunal 17 D, obteniéndose para todas resultados negativos para anticuerpos anti-FA. (Figura 1)

Figura 1. Técnica de Neutralización por Reducción de Placas



Los orificios B2 y C2 corresponden a Controles Positivos de FA a diluciones 1:10.000 y 1:5.000 respectivamente, en los cuales se aprecia la monocapa de células intactas, debido a que hubo neutralización completa del virus por los anticuerpos anti-FA. Los orificios A6, B6, B3 y C1 corresponden a Controles Virales, en los mismos se observa el efecto citopático producido en las células por el virus de FA (placas), debido a que no hubo neutralización del virus por los anticuerpos anti-FA. Los orificios restantes corresponden a las muestras, donde se observa la presencia de gran cantidad de placas debido a que tampoco hubo neutralización, el exceso de placas comparando con los Controles Virales puede deberse a la presencia de anticuerpos sub-neutralizantes, que no son anticuerpos anti-FA y facilitan la entrada del virus a la célula, provocando la formación de una mayor cantidad de placas.

DISCUSIÓN

De enero a marzo del año 2008 en Paraguay se reportaron 28 casos confirmados y 8 muertes provocadas por el virus de FA en humanos, esto motivó a la realización de este estudio, con la intención de encontrar evidencias de FA en primates capturados en áreas de brote de los departamentos de San Pedro y Central. Se obtuvieron resultados negativos para anticuerpos anti-FA en las muestras de primates examinadas, coincidiendo con los resultados encontrados por *Bottinelli y col.* en el año 2001 en Argentina (7), y con otro estudio realizado por *Contigiani y col.* en el año 2000 donde tampoco constataron títulos de anticuerpos indicativos de infección por FA en 105 primates *Alouatta caraya* en Argentina (22). Por el contrario, en Colombia en el año 2004 *Méndez y col.* detectaron virus de FA en primates silvestres, con la diferencia de que en dicho estudio se procesaron muestras de tejido hepático de primates encontrados muertos en territorio selvático (20). En el 2008 fueron notificadas aproximadamente 40 muertes de primates por FA en el Brasil, ocurriendo varias de estas muertes en los estados brasileiros fronterizos con el Paraguay (19). Así mismo, entre 2007 y 2009 en la Argentina se reportaron 12 epizootias por FA en primates en las provincias de Misiones y Corrientes (23).

CONCLUSIÓN

No se encontró infección en primates con el virus de la Fiebre Amarilla en las zonas estudiadas de brotes de los Departamentos de San Pedro y Central del Paraguay, debido probablemente al bajo número de primates capturados en el momento del estudio y a que los mismos no presentaban signos de infección por FA. Con estos resultados no podemos descartar la actividad local del virus, debido a la notificación de epizootias por FA en primates en áreas de Brasil y Argentina cercanas a la frontera con Paraguay; por ello, es necesario fortalecer la vigilancia de epizootias a través de la denuncia de la mortandad de primates a las autoridades sanitarias y el monitoreo de poblaciones de primates para medir la actividad viral y establecer rutas de las ondas epizooticas a fin de implementar medidas de control y prevención contra esta enfermedad.

Agradecimientos

Agradecemos al Tec. Oscar Riveros del Departamento de Producción Bioquímica del IICS por su colaboración en el procesamiento de las muestras, a la Sra. Mercedes Bogado y al Sr. Cecilio Lezcano del Bioterio y Colonia de Primates del IICS por su valiosa colaboración en el manejo y toma de muestras de los animales. Este trabajo fue financiado por el IICS-UNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Strano AJ, Dooley JR, Ishak KG. Manual sobre la Fiebre Amarilla y su diagnóstico diferencial histopatológico. Washington, USA: OPS; 1975. Publicación científica: 299.
2. Vasconcelos PF. Yellow fever: reflections on the disease, prospects for the century and risk of re-urbanization. Rev Bras Epidemiol 2002; 5(2): 244-58.
3. OPS. Control de la Fiebre Amarilla: Guía Práctica. Washington, USA: OPS; 2005. Publicación científica y técnica: 603.
4. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implication of climatic alterations in disease spread. J Med Virol 2001; 65(3):598-604.
5. Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud de Colombia. Investigación de campo caso fiebre amarilla. Boletín Epidemiológico semanal SIVIGILA [en línea] 2002 Agosto 24 [fecha de acceso 13 de mayo de 2008]; URL disponible en: http://www.col.ops-oms.org.sivigila/2002/BOLE34_02htm.
6. Bryant J, Wang H, Cabezas C, Ramírez G, Watts D, Russel K, et al. Enzootic transmission of yellow fever virus in Peru. Emerg Infect Dis 2003; 9: 923-33.
7. Bottinelli O, Paz V, Enria D, Sabattini M, Solís G, Pedroni E. Infecciones por flavivirus y alphavirus en monos *Alouatta caraya* del Nordeste Argentino, año 2001. XXIII Sesión de comunicaciones científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste; Corrientes, Argentina; 2002.
8. Díaz LA, Díaz MP, Almirón WR, Contigiani MS. Infection by UNA virus (*alphavirus; Togaviridae*) and risk factor analysis in black howler monkeys (*Alouatta caraya*) from Paraguay and Argentina. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 101: 1039-41.
9. WHO. Outbreak News: Yellow Fever, Paraguay. Weekly Epidemiological Record 2008; 83: 105-8.
10. Varela, N. Consideraciones Clínicas sobre Fiebre Amarilla en los Primates Neotropicales. Boletín GEAS 2004; 6(4):13-17.
11. Ott-Joslin JE. Viral diseases in nonhuman primates. En: Fowler ME, ed. Zoo and Wildlife Animal Medicine. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co;1986. p. 674-97.
12. Ritcher CB, Lehner NDM, Henrickson RV. Primates. En: Fox J.G, Cohen B.J, Loew F.M., eds. Laboratory Animal Medicine. San Diego, United States of North America: Academic Press Inc; 1984. p. 287-383.
13. Adams SR, Muchmore E, Richardson JH. Biosafety. En: Benett T, Abee C, Henrickson R, eds. Nonhuman Primates in Medical Research, biology and management. San Diego: Academic Press Inc; 1995. p. 375-420.
14. Singh MK, Brillman J. Yellow Fever e Medicine World Medical Library [en línea] 2001 Septiembre 25 [fecha de acceso 10 de mayo de 2008]; URL disponible en: <http://www.emedicine.com/emerg/topic645.htm>.

15. Wallach J, Boever W. Primates. En: Wallach J and Boever, W. Diseases of exotic animals. Philadelphia: WB Saunders Co; 1983. p.3-133.
16. Ramsay E, Montali RJ. Viral hepatitis in new world primates. En: Fowler M.E, ed. Zoo and Wild Life Medicine. Current therapy 3. Philadelphia: WB Saunders Co; 1993. p. 355-58.
17. Berge E, Finch J, Heidt O, Kaup FJ, Peretta G, Verscheure B, Wolfensohn S. Health monitoring in non-human primates colonies. Laboratory animals 1999; 33 Supl 1 : 3-18.
18. Ministério da Saúde. DF. Brasil. Manual de Vigilância de Epizootias em Primatas Não-humanos. Brasília. Brasil: Ministério da Saúde; 2005.
19. Ministério da Saúde. DF. Brasil. Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil ano 2007-2008. Brasília. Brasil: Ministério da Saúde; 2008.
20. Méndez J, Parra E, Neira M, Rey G. Detección por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa del virus de la fiebre amarilla en monos silvestres: una herramienta sensible para la vigilancia epidemiológica. Biomédica 2007; 27: 461-7.
21. CIOMS. International guiding principles for biomedical research involving animals. En: Smith J, Boyd K, ed. Lives in Balance. New York: Oxford University Press; 1985. p. 259.
22. Contigiani MS, Fernández C, Spinsanti LI, Díaz GE. Prevalence of Flavivirus antibodies in *Alouatta caraya* primate autochthonous of Argentina. Medicina 2000; 60(3):348-50.
23. Argentina. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Situación de la Fiebre Amarilla en la República Argentina. Riesgo para residentes y viajeros a zonas de transmisión actual. Buenos Aires. Argentina: Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación de la República Argentina; 2009.