

Libros de **Cátedra**

Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria

Volumen: Virología

Fabiana A. Moredo, Alejandra E. Larsen,
Nestor O. Stanchi (Coordinadores)

n

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL

PATOGENICIDAD MICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA

VOLUMEN: VIROLOGÍA

Fabiana A. Moredo
Alejandra E. Larsen
Nestor O. Stanchi
(Coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



CAPÍTULO 9

Togavirus

María Gabriela Echeverría, María Laura Susevich

La familia *Togaviridae* comprende virus de importancia en salud humana y animal y está formada por los géneros *Alfavirus* y el *Rubivirus*. En este capítulo haremos referencia a los *Alfavirus*, responsables de encefalitis en equinos principalmente y en el hombre y que son transmitidos por vectores, agrupándose por lo tanto dentro de los Arbovirus. El término Arbovirus (del inglés = *arthropod borne virus*) abarca un agrupamiento ecológico basado en su transmisión vectorial por artrópodos. Las familias pertenecientes a este grupo son *Asfarviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* y *Togaviridae*. Una amplia gama de artrópodos hematófagos, entre ellos: jejenes (*Ceratopogonidae*), chinches de cama (*Cimicidae*), mosquitos (*Culicidae*), flebótomos (*Psychodidae*, *Phlebotominae*) y garrapatas (*Ixodidae*, *Argasidae*) son vectores de este grupo viral. Los vectores adquieren el virus por vía oral mientras se alimentan del vertebrado virémico quien contiene una carga viral suficientemente alta para generar infección. Así, en el intestino del artrópodo, el virus infecta el epitelio intestinal y replica en células epiteliales. Superada la barrera física de la lámina basal se dirige vía hemolinfa a las glándulas salivales donde se replica y acumula, transmitiendo el virus a un nuevo hospedador por inoculación de saliva infectada. También existen vías de transmisión alternativas como la transmisión venérea (entre mosquitos en la reproducción) y transovárica (de la hembra a su progenie). Pueden actuar como amplificadores aves y mamíferos como: roedores, primates y equinos, entre otros. En estos hospedadores puede provocar fiebre, encefalitis, fiebres hemorrágicas, etc. Provocan enfermedad neurológica moderada a severa con una mortalidad del 90% en algunos casos y en la naturaleza ocurren ciclos alternados de replicación en mosquitos y en otros vertebrados. Los togavirus, son arbovirus asociados principalmente a mosquitos, aunque algunos han sido aislados ocasionalmente de ácaros.

Los *Alfavirus* además de producir encefalitis conocidas como del nuevo Mundo (Encefalitis equina del Este, Oeste y Venezuela), producen artralgias en el hombre conocidas como Chikungunya, O'nyong-nyong, Mayaro, Ross River, Sindbis y Selva de Semliki, entre otros.

Estructura y propiedades fisicoquímicas

Las partículas virales son esféricas con un diámetro aproximado de 70-80 nm. La cápside de simetría icosaédrica, mide aproximadamente 40 nm y contiene 240 copias de proteína C (30-33 kDa) y espículas externas organizadas en 80 trímeros compuestos por las glicoproteínas de transmembrana (E1-45 kDa- y E2-58 kDa-) y la proteína perisférica E (E3-10kDa-). Cada espícula está constituida por tres pares de E1-E2 y se proyecta aproximadamente 80 nm por sobre la envoltura y se conectan unas a otras de manera compacta, formando así una capa proteica continua alrededor del virión, brindándole un aspecto de virus no envuelto. La bicapa lipídica característica de los togavirus deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora y está fuertemente unida a la cápside, lo que le da aspecto de toga o manto, de donde recibe su nombre. Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los togavirus son sensibles a solventes orgánicos y detergentes. Los viriones son estables a temperaturas de 4°C pero pierden infectividad a 56 °C, mientras que son sensibles a pH ácidos. La densidad de flotación en sucrosa de los togavirus oscila entre 1,18-1,22 g/cm³ mientras que el coeficiente de sedimentación es de aproximadamente 280 S.

El genoma está compuesto por ARN de cadena simple no segmentado y de polaridad positiva, formado por aproximadamente 11700 nucleótidos que codifica para 4 proteínas no estructurales (NSP1 -NSP4) y entre 4 a 5 proteínas estructurales (proteína de la nucleocápside C, proteínas de espícula E1 y E2 y en algunos géneros E3 y una proteína pequeña de transmembrana 6K). El extremo 5' del genoma posee un Cap y en el 3' una región poliA. Las proteínas C, E1, E2 y E3 son las responsables de la especificidad viral.

Mecanismo de replicación viral

La proteína E2 o la E1 son las responsables de la adsorción y penetración viral en el ciclo infectivo. Luego de la adsorción viral al receptor celular (identificado hasta el momento como glicolípidos o heparán sulfato, lectinas, integrinas y lamininas) y en un evento mediado por la región más externa de la E2, se forma un poro y la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma (evento mediado por E1) permitiendo a la nucleocápside liberarse al citoplasma a consecuencia de la disminución del pH que provoca un cambio conformacional irreversible en las proteínas E1-E2 debilitando su unión. Una vez que se libera el ARN en el citoplasma, se produce la replicación del genoma y la síntesis de proteínas. El genoma contiene 2 ORFs (del inglés= *open reading frame*), el primero de los cuales es traducido directamente del ARN genómico y codifica para las proteínas no estructurales requeridas para la síntesis de ARN viral (evento temprano). Estas proteínas no estructurales actúan como helicasas, trifosfatasa, proteasas, y adicionan Cap al 5' del ARN genómico y subgenómico. El segundo ORF se transcribe a través de un ARNm subgenómico formado de la cadena de ARN negativo que actúa como intermediario replicativo y codifica para las proteínas estructurales. Esta cadena subgenómica de ARN positivo se traduce a una poliproteína que luego será clivada en las

proteínas de la cápside y precursores: C, Pe2, 6K y E1 para finalmente clivarse en E1 y E2 (evento tardío) (Figura 1). Posteriormente las proteínas E1 y E2 clivadas son transportadas al retículo endoplásmico, glicosiladas y procesadas a través del aparato de Golgi y subsecuentemente migran a la membrana celular. La cápside se forma por asociación de proteína C y la incorporación del ARN genómico formando la nucleocápside que se alinea a las regiones de la membrana plasmática que contienen los heterodímeros E1-E2, liberando finalmente las partículas virales por gemación.

Los togavirus replican *in vitro* en cultivos primarios o en diversas líneas celulares provenientes de mosquito (C6/36), aves, peces, reptiles y mamíferos (BHK-21, Vero). Las infecciones producen un extenso efecto citolítico en líneas celulares derivadas de vertebrados y un efecto poco evidente en líneas derivadas de invertebrados caracterizado por persistencia viral. *In vivo* se utilizan ratón lactante, pollitos, o huevos embrionados. Este amplio rango de hospedadores refleja el mantenimiento de los alfavirus en la naturaleza por alternar ciclos de replicación en mosquitos y vertebrados.

Patogénesis viral

El modo primario de transmisión de los alfavirus a aves y mamíferos es mediante los mosquitos, los cuales se infectan al picar un hospedador infectado en estado de viremia. Así, el virus replica primariamente en el intestino medio, se transporta luego por hemolinfa hacia las glándulas salivares donde replica nuevamente (entre 4 a 10 días después de su ingestión) y genera el estado de persistencia en el mosquito pudiendo transmitirse a aves y otros mamíferos (Figura 1). Posteriormente a la picadura, el virus se introduce en los capilares y replica en el endotelio vascular, células dendríticas y en los monocitos, para luego diseminarse por vía sanguínea (viremia) circulando libre en plasma y replicar en músculos, articulaciones, piel o cerebro. La neuroinvasividad es una propiedad de ciertas cepas virales resultando en necrosis neuronal con neuronofagia e infiltración mononuclear. El virus puede migrar hacia el sistema nervioso central (SNC) por distintos medios: difusión a través el endotelio vascular; replicación en endotelio vascular; invasión viral de líquido cefalorraquídeo; transporte mediante células inflamatorias que migran al parénquima; replicación en epitelio respiratorio y vía axonal migra al bulbo olfatorio y a cerebro, y una vez que el virus alcanza el SNC no vuelve a sangre.

El ciclo replicativo es dependiente del hospedador, evidenciado por el hecho que los alfavirus provocan enfermedad aguda en los vertebrados y en los invertebrados infección persistente.

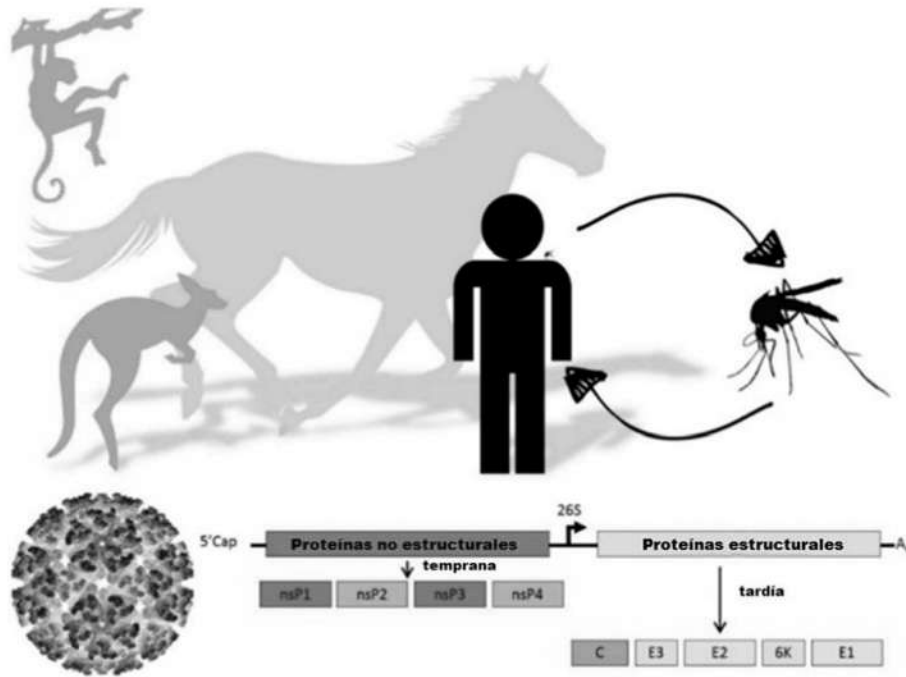


Figura 1: (arriba) representación esquemática del ciclo de transmisión de los alfavirus; (abajo) partícula viral y esquema de la organización genómica. La traducción de las proteínas no estructurales ocurre inmediatamente desde el genoma viral mientras que la traducción de las proteínas estructurales ocurre más tarde a través de un RNA mensajero subgenómico (Adaptada de Fros y Pijlman, *Virus* 2016)

Signos clínicos

La enfermedad puede ser clínica o subclínica dependiendo de la sensibilidad del hospedador, serotipo viral, dosis infectante, vía de infección, competencia y eficacia del vector. El período de incubación es de 3-12 días y se presenta clínicamente con fiebre, disfagia, anorexia, trastornos neurológicos como excitación, hiperestesia, movimientos en círculos, depresión, parálisis de labios y miembros. La respuesta febril durante la viremia es de menor magnitud con Oeste y de magnitud mediana en Este y Venezuela. La muerte puede ocurrir entre 12 horas y 10 días pos-infección. En la observación histopatológica aparece degeneración neuronal, meningoencefalitis con destrucción neuronal, neuronofagia, gliosis con infiltración de linfocitos y neutrófilos e inflamación en el endotelio vascular. Todas las áreas del cerebro están afectadas en distintos grados. En el hombre, se acompaña de fiebre, dolor occipital y retroorbital, anorexia, mialgia, artralgia. En pocos casos se presentan síntomas nerviosos (fotofobia, rigidez de nuca, convulsiones y parálisis). El hombre puede infectarse con los virus Este, Oeste y Venezuela tanto selvático como enzoótico.

Los ciclos epidémicos de Este y Oeste son mantenidos en la naturaleza en ciclos selváticos o enzoóticos entre mosquitos ornitofílicos y aves paseriformes quienes actúan como reservorios naturales y huéspedes amplificadores del virus. Cuando el ciclo endémico es interrumpido se transmiten a equinos y hombre por los mosquitos causando epidemias, aunque estos mamíferos se consideran hospedadores terminales ya que no desarrollan una elevada

viremia. Esa diferencia hace que los casos en humanos de Este y Oeste en América latina sean esporádicos, no así los casos de Venezuela. En aves se pueden producir los mismos signos nerviosos.

Respuesta inmune

La infección por alfavirus resulta en la inducción de una robusta respuesta inflamatoria tanto en humanos como animales. El heterodímero E1-E2 es altamente inmunogénico e induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores. Se desarrollan tanto la respuesta inmune del tipo humoral y celular. En la inmunidad humoral, los anticuerpos IgM específicos son detectados de manera temprana en la infección mediante las técnicas de ELISA o virusneutralización (VN), mientras que los anticuerpos neutralizantes y hemaglutinantes de tipo IgG se desarrollan entre los 10 y 14 días pos-infección y persisten meses luego de la infección. Respecto a la respuesta inmune celular, los linfocitos T citotóxicos intervinientes secretan perforinas para aumentar la permeabilidad de las células infectadas lo que conlleva a la muerte de las mismas. Del mismo modo, las células NK intervienen en la lisis celular de las células infectadas. La exposición natural conlleva a una inmunidad prolongada. Si bien la vacunación en Argentina está autorizada en equinos y personal de laboratorio involucrado, únicamente con vacuna inactivada conteniendo virus del Este y Oeste, en el año 2016, el SENASA autorizó la vacunación voluntaria frente a estas enfermedades. La inmunidad pasiva mediante calostro de yeguas madres recobradas o recién vacunadas es recomendable en casos de enfermedad clínica. En estudios realizados en alfavirus productores de artralgias se observó que la fase aguda de la infección se caracteriza por las concentraciones elevadas de factores proinflamatorios de la inmunidad innata como IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IP-10 y MCP-1 que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos, mientras que la IL-2 e IL-9 implicadas en la estimulación de la proliferación celular, están significativamente elevadas en la etapa convaleciente y permanecen en esos niveles hasta los 3 meses pos-infección. Durante el año pos-infección la respuesta inmune se caracteriza por concentraciones elevadas de IL-1 β , IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN γ y TNF α .

Profilaxis y control

La prevención de los alfavirus debe ser acompañada principalmente de la eliminación de los vectores mediante campañas masivas de eliminación por insecticidas o larvicidas químicos. En Argentina la vacunación voluntaria es bivalente (Oeste y Este), producida en cultivos celulares e inactivada con formalina. En adultos se recomienda administrar 2 dosis anuales y en hembras preñadas se recomienda vacunar a los 9 meses de gestación. A los potrillos de madres vacunadas es recomendable administrar 2 dosis y realizar la revacunación anual. La vacuna contra el virus Venezuela es a virus activo y en Argentina está prohibida.

Algunos alfavirus productores de artralgias en el hombre, fiebre y eritema, están relacionados serológicamente con las encefalomyelitis Este, Oeste y Venezuela, y tienen distinta distribución geográfica son los siguientes: Chikungunya (África y Asia), O'nyong-nyong (África), Mayaro (América del Sur y Central), Ross River (Australia), Sindbis (Europa-África y Asia-Australia) y Selva de Semliki (África-Asia). También involucran animales salvajes, aves, primates y mosquitos.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico presuntivo puede realizarse en base a los signos clínicos neurológicos coincidiendo con épocas calurosas. Las técnicas serológicas recomendadas son la seroprotección en ratones o huevos embrionados o la virusneutralización en cultivos celulares (VN), la inhibición de la hemaglutinación (IHA), la inmunofluorescencia y la neutralización de placa. La confirmación serológica requiere del incremento o disminución de 4 diluciones del título de anticuerpos en muestras pareadas tomadas con 15 días de diferencia preferentemente. Para el aislamiento viral, se recomienda utilizar tejidos del sistema nervioso central o plasma de animales con pico febril, los cuales deben ser obtenidos en forma estéril y ser enviados refrigerados si van a recibirse dentro de las 48 horas de extraídas. Se pueden inocular por vía intracerebral ratones adultos y lactantes, pollitos y cobayos, o en cavidad alantoidea o saco vitelino de embriones de pollo. En cualquiera de los casos, se produce la muerte. También, las muestras procesadas se inoculan sobre monocapas de cultivos primarios de embriones de pollo o pato o de riñón de hámster o en células de línea como Vero, BHK-21, RK13 o HeLa. Las líneas celulares de mosquito también pueden utilizarse pero en ellas no se produce un efecto citopático (ECP) marcado, sino que se establece por lo general persistencia viral. Además, puede utilizarse la hemadsorción para determinar células infectadas. Para el relevamiento de mosquitos puede utilizarse ELISA de captura o RT-PCR, al igual que para confirmar la sospecha o aislamiento positivo. Debido a la importancia de las encefalomyelitis como zoonosis, el diagnóstico de laboratorio se realiza únicamente en laboratorios con cabina de seguridad 3 y con personal inmunizado. Es muy importante realizar además un diagnóstico diferencial con otras encefalomyelitis producidas por intoxicación, leucoencefalomalacia, botulismo, rabia o encefalitis producidas por protozoos.

Encefalomyelitis equina

La enfermedad está producida por tres virus antigénicamente distintos: el virus del Oeste, el del Este y Venezuela los cuales formaron parte del grupo A de la clasificación original de los arbovirus. Las tres especies virales pueden diferenciarse y subtipificarse a su vez por la reactividad en distintas pruebas de IHA, VN o mediante el uso de anticuerpos monoclonales

como así también mediante secuenciación. Sin embargo, a modo de facilitar la comprensión es que se describen como un complejo viral que se diferencia principalmente por su localización geográfica. Son enfermedades de presentación estacional en climas templados o tropicales, que se desarrollan en condiciones ideales para la replicación viral y donde la población de mosquitos es elevada. El ciclo endémico (enzoótico) de las encefalomyelitis involucra la replicación en vectores (mosquitos) y reservorios como aves (Este y Oeste) y mamíferos roedores (Venezuela). En períodos epidémicos (epizoóticos) pueden infectarse los hospedadores naturales equino y hombre. Estos alfavirus existen en hábitat geográficos definidos mediante ciclos de transmisión entre hospedadores artrópodos y vertebrados que contribuyen a la persistencia viral, distribución geográfica y amplificación.

Encefalomyelitis del Este: esta enfermedad es producida por un virus altamente patógeno para humanos y equinos que se distribuye en la costa este de América, desde Canadá hasta Argentina. En América del Sur fue aislado por primera vez de equinos en Argentina durante un brote ocurrido en 1936. Por otro lado, en el año 1988 se registró el último brote en nuestro país.

Puede producir encefalitis en hombre, equino, paloma y faisán. Muchas otras aves son susceptibles a la infección que permanece en forma asintomática a pesar de la viremia prolongada. Se han descrito otros mamíferos reservorios como roedores, marsupiales y aves migratorias y en menor frecuencia reptiles y anfibios. Principalmente el ciclo primario está mantenido en pantanos donde habitan los vectores y reservorio. En América Central y del Sur, los mosquitos implicados en este ciclo son del género *Culex* subgénero *Melanoconion*.

Las epizootias pueden ocurrir aproximadamente cada 5 o 10 años coincidiendo con temporadas de lluvias. La mayoría de las infecciones en el hombre son subclínicas o producen solo un leve aumento de la temperatura. Aun siendo el más virulento de los alfavirus, en pocos casos suelen producirse síntomas de encefalitis en el hombre, que en caso de manifestarse solo el 20 % de estos pueden ser mortal. Sin embargo, en equinos con signología la mortalidad alcanza aproximadamente al 90 %. Dentro de los virus Este, existen también dos variables antigénicas diferenciables por pruebas de IHA que tienen una distribución geográfica particular, tipo norteamericano (más patogénicas para el hombre y equino) y tipo sudamericano.

Encefalomyelitis del Oeste: integra un complejo antigénico constituido por seis especies virales. Circula desde el Ártico hasta Argentina; es la más frecuente en centro y oeste de EE.UU. y la de predominio en Argentina. También puede producir encefalitis en hombre y equino aunque en menor frecuencia respecto a los virus Este y con una mortalidad en equinos de hasta el 50 %. En algunas regiones de América del Sur, la mayoría de los mosquitos de los que se aisló este virus, se alimentan principalmente de pequeños mamíferos, existiendo evidencia serológica que la infección natural puede producirse en ratas y conejos; además en pollos y faisanes. Existen 3 variantes distribuidas en Sudamérica que tienen reducida patogenicidad con respecto a las que actúan en América del Norte. En Argentina podemos mencionar dos tipos de ciclos; uno que se podría denominar primario de mantenimiento del

cual se desconocen sus componentes y que se correspondería al demostrado en Estados Unidos entre *Culex tarsalis* y gorriones (*Passer domesticus*). El otro sería el ciclo amplificador entre *Aedes albifasciatus* y mamíferos de las familias *Cavidae* y *Leporidae* u otros mamíferos.

Encefalomiелitis Venezuela: se distribuye en toda América desde EE.UU. hasta Perú y Brasil y las epizootias ocurren cada 10 años aproximadamente. También se infecta al hombre y el equino pero las cepas enzoóticas producen solo en estos últimos una infección de tipo asintomática que inmuniza y protege ante la infección de cepas epizoóticas y no producen un alto porcentaje de encefalitis. El hombre y los equinos actúan como amplificadores ya que desarrollan elevada viremia por lo tanto, se puede transmitir la enfermedad vía picadura de mosquitos a otros equinos y hombres (ciclo mosquito-equino-mosquito). También están involucrados roedores y aves como reservorios. El ciclo selvático que involucra a mosquitos y roedores, no causa enfermedad clínica en equinos. Sin embargo estimulan la producción de anticuerpos y pueden proveer inmunidad cruzada protectora ante una infección subsecuente con virus epizoótico. La incidencia de encefalitis en humanos infectados es de hasta el 5 %, con una mortalidad menor a 1 %. En equinos, la mortalidad puede alcanzar hasta el 80 %. Los virus Venezuela poseen 6 subtipos principales (I a VI) que varían en su patogenicidad para equinos debido principalmente a diferencias antigénicas. Además, varían de acuerdo al tamaño de las placas líticas en células Vero y a su capacidad hemaglutinante a pH de 6 o 6,5.

Referencias

- Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setién A. Alphaviral equine encephalomyelitis (Eastern, Western and Venezuelan). *Revue Scientific Technical Office International Epizooties* 2015, 34: 491-501.
- Berón CM. Investigaciones sobre mosquitos de Argentina / Corina M. Berón ... [et al.] ; compilado - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2016. Archivo Digital: descarga y online. ISBN 978-987-544-721-9
- Flaviviridae. En Fenner's Veterinary Virology 4th edition, MacLachlan J and Duvovi E eds, Academic Press 2011, 476-481
- Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses* 2016, 8, 166; doi:10.3390/v8060166
- Griffin D. Alphaviruses. En: Knipe DM, Howley PM (Eds.). *Fields Virology* 5ta. Edición. 31 New York, 2007 pp 1024-1067.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- OIE Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapters 2.5.3 y 2.5.12. 2004
- Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology* 2015, 96: 2483-2500
- Samuel M, Diamond M. Pathogenesis of West Nile Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *Journal of Virology* 2006 80: 9349-9360
- Santiago FW, Halsey ES, Siles C, Vilcarrero S, Guevara C, Silvas JA, Ramal C, Ampuero JS, Aguilar PV. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Proinflammatory Cytokine Response. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2015, 1-14
- Togaviridae. En Fenner's Veterinary Virology 4th edition, MacLachlan J and Duvovi E eds, Academic Press 2011, 455-465.