

# MECANISMOS DE MANTENIMIENTO DEL VIRUS GAMBOA EN EL MOSQUITO *AEDEOMYIA SQUAMIPENNIS*\*

Dr. Betsy E. Dutary<sup>1</sup>, Dr. John L. Petersen<sup>1</sup>, Dra. Pauline H. Peralta<sup>1</sup>,  
Dr. Pedro Galindo<sup>2</sup>, Dr. Robert B. Tesh<sup>3</sup>

De la División de Virología<sup>1</sup>, Consultor del Laboratorio Conmemorativo Gorgas<sup>2</sup>, Consultor del Yale Arbovirus Research Unit<sup>3</sup>.

Se examinó la hipótesis de que el mosquito *Aedeomyia squamipennis* mantenía al virus Gamboa (Bunyavirus) circulando en la naturaleza mediante transmisión transovárica (de la hembra infectada a su prole), sin la necesidad de un huésped amplificador. En estudios iniciados en Marzo de 1985 se procesaron 84,000 mosquitos capturados en el campo. El virus fue aislado de larvas y de pupas, de machos y de hembras. La tasa mínima de infección fue de 1:207. Los huevos de *Ad. squamipennis* fueron identificados por primera vez en este estudio. Se examinaron 1226 grupos de huevos y la tasa de aislamiento viral fue de 1:77. Las tasas de aislamiento mensuales fueron similares, como también lo fueron las encontradas en las diferentes etapas de evolución del mosquito, sugiriendo que la transmisión transovárica es uno de los

mecanismos de mantenimiento del virus Gamboa.

Uno de los aspectos incomprendidos en la biología de muchos virus transmitidos por artrópodos es el mecanismo de la sobrevivencia del agente etiológico durante condiciones climáticas adversas, tales como la estación seca en los trópicos o el invierno helado de las zonas templadas, cuando los vectores están inactivos o son escasos y, por esa razón, no parecen capaces de mantener la transmisión horizontal. También intriga la forma cómo pueden mantenerse los arbovirus en un mismo ecosistema, en ausencia de huéspedes susceptibles. La evidencia obtenida en estudios con virus de los serogrupos California y Fiebre Flebotómica (1,2) sugiere que la transmisión vertical o transovárica puede ser uno de los mecanismos mediante el cual

\* Presentado para publicación en julio de 1987. Estudio parcialmente financiado por el NIH Grant 22122.

estos agentes se mantienen en la naturaleza.

La evidencia a favor de la transmisión vertical de un arbovirus en mosquitos en los trópicos se ha obtenido solamente en el caso del virus Gamboa. El virus Gamboa, que pertenece a la familia Bunyaviridae, fue aislado por primera vez por Justine en Panamá en 1962, de mosquitos *Aedeomyia squamipennis* (3). El virus fue aislado nuevamente en 1977 en el lago Bayano, poco después de haber alcanzado su nivel (4), cuando ocurrió la proliferación de la lechuga de agua (*Pistia stratiotes*). Galindo y sus colaboradores notaron en esa oportunidad la persistencia de la infección viral a un nivel alto en la población de *Ad. squamipennis* y sugirieron que el virus se mantenía mediante transmisión vertical. El virus Gamboa se aisló de mosquitos adultos, hembras y machos, que nacieron en el laboratorio de pupas colectadas en el área de Bayano.

El mosquito *Ad. squamipennis* vive durante todo el año en los ríos, lagunas o lagos, corrientes o estancados y con abundante vegetación acuática que incluyen *Salvinia*, *Pistia*, *Ludwigia*, *Azolla*, etc. Esta especie de mosquito ha sido observada chupando sangre preferentemente en aves; y es un vector importante en la transmisión de la malaria aviaria en Venezuela (5).

Nuestra investigación examina en detalle la hipótesis de que el virus Gamboa se mantiene en la naturaleza mediante la transmisión transovárica, de mosquito a mosquito, sin necesidad de amplificación en un huésped vertebrado. En este informe presentamos los resultados obtenidos durante la primera fase del estudio, que consistió en determinar la presencia del virus en los diferentes estadios del vector, como prueba de que el virus pasa de la madre a su prole.

### Material y método

Iniciamos los estudios en marzo de 1985 y durante cuatro días de cada semana recogimos mosquitos adultos e inmaduros en la Estación de Campo de Juan Mina, situada en la margen sur del Río Chagres, Provincia de Panamá. Los métodos para recoger los mosquitos y las técnicas virológicas utilizadas fueron las convencionales (6). Los mosquitos se separaron en el laboratorio considerando su etapa evolutiva, la fecha y el lugar en que fueron recogidos; y cada grupo de diez era macerado en una suspensión. La ovipositora completa de una sola hembra era macerada, en una suspensión independiente. Utilizamos células Vero (riñón de mono *Cercopithecus*) para el aislamiento del virus. La identificación de los virus se hizo utilizando las pruebas de neutralización (7).

## Resultados y Comentarios

En este estudio, el virus Gamboa fue aislado de mosquitos *Ad. squamipennis*, hembras y machos, de pupas, larvas y huevos. El número total de mosquitos examinados fue de 84,000. La tasa mínima de infección (TMI) fue de un mos-

quito infectado por cada 207 examinados o de 4.9 mosquitos positivos por cada mil, asumiendo que un solo mosquito estaba infectado en cada suspensión positiva.

El virus Gamboa fue aislado durante cada uno de los meses del estudio (Tabla No. 1). Al

TABLA No. 1

DISTRIBUCION MENSUAL DE LOS MOSQUITOS  
*AEDEOMYIA SQUAMIPENNIS* INFECTADOS  
CON EL VIRUS GAMBOA  
ESTACION JUAN MINA, PANAMA

AÑO	MES	ADULTOS			INMADUROS		
		NM	SP	TMI+	NM	SP	TMI+
1985							
	MARZO	1042	5	4.8	-	-	-
	ABRIL	2626	17	6.5	-	-	-
	MAYO	2437	12	4.9	1998	5	2.5
	JUNIO	1568	5	3.2	2988	21	7.0
	JULIO	907	6	6.6	2426	14	5.7
	AGOSTO	664	0	0.0	4602	23	4.9
	SEPT.	1195	2	1.7	1523	7	4.6
	OCT.	1881	6	3.2	1831	10	5.5
	NOV.	3809	18	4.7	3013	19	6.3
	DIC.	2852	13	4.6	836	4	4.8
1986							
	ENERO	12209	31	2.5	1090	5	4.6
	FEB.	12518	54	4.3	1869	9	4.8
	MARZO	4626	48	10.4	1994	23	11.5
	ABRIL	1671	5	3.0	1407	11	7.8
	MAYO	1492	8	5.4	1341	4	3.0
	JUNIO	466	1	2.1	972	5	5.1
	JULIO	206	1	4.9	1231	1	8.1
	AGOSTO	514	4	7.8	809	2	2.5
	SEPT.	2272	8	3.5	547	1	1.8

NM = NUMERO DE MOSQUITOS.

SP = SUSPENSIONES POSITIVAS.

TMI+ = TASA MINIMA INFECCION CON VIRUS, POR CADA MIL MOSQUITOS.

comparar las TMI por mes notamos que el promedio fue de 5.0 por mil; y que solamente en el mes de marzo de 1986, las TMI fueron de 10.4 por mil para los mosquitos adultos y de 11.5 para los mosquitos maduros. Carecemos todavía de una explicación para este aumento del TMI durante el mes de marzo.

La Tabla No. 2 muestra la distribución de los mosquitos positivos según las etapas de evolución. La TMI se expresa en ambas formas, como el recíproco del número de suspensiones positivas sobre el total de mosquitos examinados y también como el número de suspensiones positivas por cada mil mosquitos.

TABLA No. 2

DISTRIBUCION DE LOS MOSQUITOS INFECTADOS  
CON EL VIRUS GAMBIA SEGUN LAS  
ETAPAS DE EVOLUCION  
ESTACION JUNIA MINA, PANAMA

ETAPA-EVOLUCION	NME	NSP	TMI	
			1:1000	MOSQ
Hembras Adultas	53638	234	1:229	4.4
Machos Adultos	1317	10	1:132	7.6
PUPAS	4173	28	1:149	6.7
LARVAS - IV	15261	89	1:171	5.8
LARVAS - III	3670	16	1:229	4.4
LARVAS - II	5278	24	1:220	4.5
LARVAS - I	987	6	1:165	6.6
HUEVOS (MASAS)	1226	16	1:77	13.1

NME = NUMERO DE MOSQUITOS EXAMINADOS.  
NSP = NUMERO DE SUSPENSIONES POSITIVAS.  
TMI = TASA MINIMA DE INFECCION.

Observamos que la TMI fue de 1:229, en los mosquitos adultos

hembras; y de 1:132, en los machos adultos. Al comparar estas tasas en tablas de contingencia 2 x 2 se nota que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los adultos. Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando analizamos las etapas inmaduras entre sí, utilizando una prueba de contingencia de 5 x 2.

La tasa de detección viral para los adultos, hembras y machos combinados, fue de 4,4 positivos por cada mil mosquitos examinados; mientras que la tasa de todas las fases inmaduras unidas, excluyendo los huevos, fue de 5.5 positivos por cada mil. Al comparar los adultos con las etapas inmaduras se observa una diferencia que resulta estadísticamente significativa ( $p = 0.03^*$ ).

Analizamos estos resultados, separando los adultos según el método usado para recogerlos. Los mosquitos capturados durante toda la noche con trampas de luz permanecían hasta diez horas en la trampa, antes de ser recogidos; muchos murieron antes de ser procesados; su TMI fue de 4.4. Al contrario, los mosquitos capturados con cebos (aves) resistían vivos hasta las horas tempranas de la mañana, en que eran recogidos y procesados. Los mosquitos capturados como pupas emergían como adultos en el laboratorio y eran procesados de inmediato. Estos

dos últimos grandes grupos en conjunto tuvieron un TMI de 5.6, muy similar al de las fases inmaduras, que también eran procesados vivos. Parece probable que la TMI, significativamente más baja en los adultos recogidos en trampas de luz, se debía al manejo excesivo que recibían. Si excluimos este grupo, podemos afirmar que es similar la cantidad de virus que circulaba en cualquiera de las etapas evolutivas del *Ad. squamipennis*, posterior a los huevos.

En las suspensiones que contenían la ovipostura de una sola hembra, la tasa de infección era una masa infectada por cada 77 examinadas, o de 13 por mil.

Durante este estudio se identificaron, por primera vez, los huevos de *Ad. squamipennis*. Lo observamos en enero de 1986 cuando mantuvimos hembras adultas, que habían chupado sangre de aves que colocamos como cebo, en jaulas que contenían platos con vegetación acuática. Cinco días después encontramos huevos aglutinados en una masa y colocados sobre la superficie superior de las plantas. El tamaño y la forma de las masas de huevos resultó específico para la especie, lo que hace posible diferenciarlos en el campo de los huevos de mosquitos *Mansonia* y *Culex*, presentes en el mismo habitat.

Se disectaron bajo el microscopio 125 masas de huevos

colectados en el campo y de ellas se obtuvo un promedio de 157 huevos por grupo. También se disectaron 93 hembras grávidas; se contaron las ovario-las de cada una y se observó un promedio de 154 ovario-las por hembra. Como los datos obtenidos con ambos métodos coincidían, era posible asumir que cada hembra depositaba todos los huevos en una sola masa. Los huevos se encontraban en la masa en filas irregulares y sobrepuestas, adheridos al substrato en un ángulo oblicuo, en la superficie superior de la vegetación acuática, y cubierta la superficie de la masa de huevos con una película acuosa.

Una vez que determinamos la tasa de infección en las masas de huevos, nuestro paso siguiente era encontrar el porcentaje de infección en la prole depositada por cada hembra. Para ello cultivamos las familias en vasijas individuales; cuando las larvas habían llegado a la segunda fase de evolución las macerábamos individualmente y las examinábamos para determinar la presencia del virus Gamboa. Los resultados preliminares indicaron que una familia era positiva entre las 150 examinadas; y que el 58% (18/31) de las larvas de esta familia, en la segunda fase de evolución, resultaron positivas para el virus Gamboa. Existen modelos matemáticos (8) que

nos permiten calcular, una vez tengamos las tasas de infectividad de las familias positivas, si es posible el mantenimiento del virus Gamboa mediante la transmisión transovárica solamente.

La presencia de anticuerpos contra el virus Gamboa en algunas especies de aves examinadas por nosotros nos obliga a considerarlas como posibles amplificadoras del virus; es por ello que, en otra fase de nuestro estudio, estamos dilucidando esta posibilidad.

Por lo anteriormente expresado podemos decir que hemos demostrado la infección persistente del virus Gamboa en una población de mosquitos *Aedeomyia squamipennis*; que el virus Gamboa se aisló en cada uno de los meses de estudio; y que las tasas de aislamiento no fueron significativamente diferentes, en 18 de los 19 meses reportados. Además, que el virus Gamboa se aisló en cada una de las etapas y no hubo diferencia significativa entre machos y hembras, pupas o larvas, en cualquiera de sus cuatro fases, demostrando que

no aumentó el número de positivos al chupar sangre infectada. Estos hallazgos dilucidan la hipótesis de que la transmisión transovárica es una de las formas en que el virus Gamboa puede mantenerse en los trópicos.

### Summary

We hypothesize that Gamboa virus (*Bunyavirus*) is maintained in nature by transovarial transmission alone and to test this, have conducted continuous field studies since March 1985. Gamboa virus has been isolated from field-collected *Aedeomyia squamipennis* larvae, pupae, adult males and adult females. The overall minimum infection rate was 1:207 for 84,000 mosquito processed. Eggs of *Ad squamipennis* were identified for the first time; the isolation rate was 1:77 for 1226 clutches examined. Isolation rates were constant throughout the year and rates for larvae, pupae, and adult mosquitoes were not significantly different suggesting that infection rates also remain constant throughout the developmental cycle.

### AGRADECIMIENTO

Agradecemos a N. Guerrero, V. Herrera y J. Montenegro por su esmero en el trabajo de campo; a O. de Torres y C. Luna por su eficiente trabajo entomológico; y a L. Blake, J. Cisneros y R. Vilchez por su exactitud en la aplicación de las técnicas virológicas.

1. Watts DM, Fantuwatana S, DeFoliart GR, Yuill TM, Thompson WH: Transovarial transmission of LaCrosse virus (California Encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*. Science 182 (Dec): 1140-1141, 1973
2. Tesh RB, Chaniotis BN, Peralta PH, Johnson KM: Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies. Am J Trop Med Hyg 26 (March): 282-287, 1974
3. Justines G: International Catalogue of Arboviruses, 3ed, San Antonio, Texas, Am Soc Trop Hyg, 1985, p 409
4. Annual Report of the Gorgas Memorial Laboratory, Fiscal Year 1978 -1979, Government Printing Office, Washington, p 23-24
5. Gabaldon A, Ulloa G, Pulido J: Distribución geográfica, ecología y etiología de *Aedeomyia squamipennis*, importante vector natural de malaria aviaria en Venezuela. Boletín de la Dir. de Malariología y Saneamiento Ambiental 21: 103-113, 1981
6. Dutary B, Peralta PH, Petersen JL: Estudios Biológicos del Virus de la Encefalitis de San Luis en Maje, Bayano. Rev Med Panamá 9(3):200-211, 1984
7. Earley E, Peralta PH, Johnson KM: A plaque neutralization method for arboviruses. Proc Soc Exp Biol Med 125(4):741-747, 1967
8. Fine PE: Vectors and vertical transmission: An epidemiological perspective. Ann NY Acad Sci 266:173-194, 1975