

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
Sub-área Microbiología

PEDECIBA



**Estudio de la circulación de arbovirus en Uruguay**

Lic. Analía Burgueño

Orientador: Dra. Adriana Delfraro

Co-orientador: Dr. Juan Arbiza

Lugar de realización: Sección Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Fecha de defensa: 10 de diciembre de 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Al PEDECIBA, ANII y CSIC.

A Juan, por abrirme las puertas de la Sección Virología.

A Adriana, por orientarme todos estos años y darme su confianza.

Al tribunal, Adrián Díaz, Juan Cristina y Sandra Frabasile, por aceptar evaluar esta tesis y brindarme parte de su tiempo para las sugerencias y correcciones.

A Walter y Magdalena del Instituto de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, que pensaron que iban a entrenar sobre taxonomía de mosquitos a una bióloga y resulté ser bioquímica!

A María, por darme una mano siempre en clasificación de los mosquitos y por realizar muchas capturas manuales que utilicé en esta tesis.

A Marta, por abrirme las puertas del Laboratorio de Arbovirus y sentarse muy seguido a analizar las placas y tablas conmigo.

A Lore Spinsanti y Ladri por enseñarme el PRNT y por todas las horas que pasaron conmigo viendo los resultados!

A Brenda, Javier, Elisa, Laura y Merengue por prepararme las placas de células y por no odiarme cada vez que me anotaba en el cuadernito, pidiendo 6 u 8 placas por día!

A mis compañeros del Lab de Córdoba, a los amigos que hice!

Al "Chanchi", gran amigo y excelente compañero!! Por las milanesas napolitanas!

A mis compañeros del labo, Mabe, Ana, Sandra, Santi, Andre, Majo, Nati F, Nati H, Nati R, Martin, Pittini, Ceci, Tiby, Darío, Gaby, Albert, más especialmente a mis amigos: **DT, Brig, Lu, Vir, Lore y Vivi!!**

A mis compañeros del DLSP, son un montón por eso no lo escribo! Pero muy especialmente a mis amigas: Vivi, Noe, Mari, Leti, Dora, Vivi F

A Vane, por apoyarme y estar siempre, aguantar mis desapariciones por la tesis!

A Clau, la amiga que me dio la facultad!

A Vivi, por compartir la mayor parte del día conmigo y hacerlo más llevadero y divertido! Y por ser mi pilar este último tiempo...

A Seba, por apoyarme siempre y aguantarme (estoy insoportable), y a Pico!

Esta tesis está dedicada a mi familia, especialmente a mis padres.

## RESUMEN

---

Los arbovirus (*arthropod borne viruses*) son un grupo de virus que se mantiene en la naturaleza a través de la transmisión biológica entre hospedadores vertebrados susceptibles y artrópodos. Los arbovirus de importancia médica y veterinaria son transmitidos por artrópodos hematófagos y la mayoría de ellos pertenecen a tres familias: *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), *Togaviridae* (género *Alphavirus*) y *Bunyaviridae* (géneros *Bunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*). En la actualidad la emergencia y re-emergencia de los arbovirus es una problemática de gran importancia en salud pública, así como en la sanidad animal. En los países limítrofes hay una amplia circulación de *Flavivirus*, evidenciada por brotes del virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) en varias ciudades de Argentina y en San Pablo, Brasil, endemidad del virus Dengue (DENV) en ambos países, ocurrencia de brotes de fiebre amarilla (YFV) y la reciente circulación del virus West Nile (WNV). Los alphavirus causantes de encefalitis equinas (del este –EEEV-, del oeste –WEEV- y venezolana –VEEV-) también están presentes en la región, circulando en forma enzoótica y/o epizootica en Brasil y Argentina. En nuestro país la evidencia de circulación autóctona de arbovirus es escasa, registrándose casos esporádicos de síndrome febril y encefalitis por arbovirus, mientras que sólo se han registrado casos de Dengue clásico importados.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la circulación de los arbovirus en Uruguay en dos actores del ciclo de transmisión: vectores (mosquitos) y hospedadores finales (equinos), identificando y caracterizando los virus detectados.

Para ello se realizaron capturas de mosquitos en los sitios más probables de circulación de los arbovirus en el país. Se utilizó captura manual y trampas tipo CDC adicionadas con CO<sub>2</sub>. Los ejemplares se clasificaron manteniendo la cadena de frío y se agruparon en *pooles* para su posterior procesamiento. Con el fin de detectar y caracterizar la presencia de flavivirus y alphavirus en mosquitos colectados, se extrajo ARN total y se llevaron a cabo múltiples ensayos de RT-PCR. Los fragmentos genómicos obtenidos se secuenciaron y se caracterizaron mediante análisis filogenético. Para los estudios serológicos en equinos se analizaron sueros provenientes de diferentes departamentos del país mediante ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT) contra los siguientes virus: EEEV, WEEV, VEEV, RNV, PIXV, SLEV y WNV.

Se procesaron un total de 3329 mosquitos agrupados en 244 *pooles*, de los cuales 5, pertenecientes a *Culex pipiens*, resultaron infectados con *Culex Flavivirus* (CxFV). Los mosquitos infectados fueron colectados en los barrios Cerrito y Villa García (Montevideo), en las ciudades de Paysandú y Salto. Se construyeron filogenias a partir de secuencias de diferentes regiones del gen NS5, resultando todas ellas consistentes en su topología. Los flavivirus detectados agruparon en el clado CxFV, formando parte a su vez de un subclado junto con CxFV provenientes de México y Uganda.

El estudio de anticuerpos neutralizantes en equinos demostró una amplia circulación de SLEV en los 18 departamentos relevados, presentando una prevalencia del 50,1%. Para WNV se detectaron anticuerpos inicialmente en 8 sueros, de los cuales una única muestra podría ser considerada positiva, ya que presentó un título mayor en comparación con SLEV. Para alphavirus se realizó un tamizaje inicial para los virus EEEV, WEEV y VEEV y RNV. Luego de las titulaciones las prevalencias encontradas fueron del 1,18% para EEEV, 0,23% para WEEV, 2,12% para VEEV, 0,23% para PIXV y 4,23% para RNV.

La detección de CxFV en tres departamentos de Uruguay (Montevideo, Paysandú y Salto) presentados en este trabajo, más el detectado en el año 2007 en Colonia (Burgueño, 2007), demuestran que el virus circula en el país y que presenta una distribución relativamente amplia (principalmente en el litoral y la zona sur del país). Varios autores han postulado que la presencia de CxFV en el mosquito puede tener un efecto sobre la capacidad vectorial a arbovirus como WNV, no habiéndose demostrado hasta el momento que la infección con CxFV excluya una infección secundaria con otro flavivirus. Por lo que este hallazgo podría tener implicancias en la dinámica de transmisión de arbovirus presentes en el país.

Los resultados obtenidos del estudio serológico muestran la primera evidencia de circulación de SLEV y la posible circulación de WNV en caballos en el país. Se evidenció además la circulación de varios alphavirus, aunque los mismos presentaron prevalencias bajas en comparación con otros estudios previos en la región.

En el marco de este trabajo se realizó además el estudio de un caso fatal de encefalitis viral ocurrido en 2009. Los análisis realizados pudieron identificar al WEEV como el agente etiológico. Este resultado es de gran importancia epidemiológica, ya que es el primer reporte de WEEV en el país, y el primer caso en la región identificado por métodos moleculares.

En resumen, nuestros resultados sugieren que varios alphavirus se encuentran circulando en nuestro país. Algunos como WEEV y EEEV lo harían a baja intensidad a juzgar por los valores de seroprevalencia en equinos detectados en el presente estudio, pero provocando casos esporádicos de encefalitis en humanos. En cuanto a los flavivirus, el SLEV circula en el país presentando una amplia distribución y prevalencia elevada en equinos, lo que coincide con los casos documentados de encefalitis en humanos.

## ÍNDICE

---

1. Introducción	1
1.1 Introducción a los arbovirus y su transmisión	2
1.2 Factores asociados a la emergencia de los arbovirus	4
1.3 Arbovirus pertenecientes a la familia <i>Flaviviridae</i>	5
1.3.1 Generalidades de la familia <i>Flaviviridae</i>	5
1.3.2 Generalidades de los Flavivirus	7
1.3.3 Principales Flavivirus que circulan en América del Sur	8
1.3.3.1 Virus de la encefalitis de San Luis	9
1.3.3.2 Virus West Nile	10
1.3.3.3 Virus Dengue	11
1.3.3.4 Virus de la fiebre amarilla	13
1.4 Flavivirus endógenos	15
1.5 Arbovirus pertenecientes a la familia <i>Togaviridae</i>	16
1.5.1 Generalidades de la familia <i>Togaviridae</i>	16
1.5.2 Generalidades de los Alphavirus	19
1.5.3 Principales Alphavirus que circulan en América del Sur	21
1.5.3.1 Virus de la encefalitis equina del este	21
1.5.3.2 Virus de la encefalitis equina del oeste	22
1.5.3.3 Virus de la encefalitis equina venezolana	23
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Materiales y métodos	27
3.1 Estudios moleculares en mosquitos	28
3.1.1 Selección de las áreas y métodos de trapeo de los mosquitos	28
3.1.2 Clasificación y procesamiento de los mosquitos	28
3.1.3 Extracción de ARN total y RT-PCRs	29
3.1.3.1 Extracción de ARN total	29
3.1.3.2 RT-PCR para Flavivirus ( <i>Flaviviridae</i> )	29
3.1.3.2.1 RT-PCR anidada genérica, gen NS5 (fragmento de 143pb)	29
3.1.3.2.2 RT-PCR semi-anidada genérica, gen NS5 (fragmento de 262pb)	30
3.1.3.2.3 RT-PCR genérica, gen NS3 (fragmento de 452 pb)	31
3.1.3.2.4 RT-PCR anidada para Culex Flavivirus, gen NS5 (fragmento de 206pb)	31
3.1.3.2.5 RT-PCRs anidadas para Culex Flavivirus, gen NS5 (fragmento de 1934pb)	32
3.1.3.3 RT-PCR genérica anidada para Alphavirus ( <i>Togaviridae</i> ), gen NSP4 (fragmento de 195pb)	34
3.1.4 Clonaje del fragmento de 143pb de flavivirus en el plásmido CloneJet	35
3.1.5 Secuenciación y análisis filogenético	36
3.2 Estudios serológicos en equinos	36
3.2.1 Selección de muestras	36
3.2.2 Preparación de los sueros	37
3.2.3 Tamizaje de los sueros por test de neutralización por reducción de placas (PRNT) para los virus SLEV, WNV, EEEV, WEEV, VEEV y RNV	37
3.2.4 Titulación de los sueros por PRNT para los virus SLEV, WNV, EEEV, WEEV, VEEV, RNV y PIXV	38
3.3 Estudio de un caso fatal de encefalitis viral	38
3.3.1 Extracción de ARN	38
3.3.2 RT-PCR para Flavivirus ( <i>Flaviviridae</i> )	39
3.3.3 RT-PCR para Alphavirus ( <i>Togaviridae</i> )	39
3.3.3.1 RT-PCR Genérica (fragmento de 195pb del gen NSP4)	39

3.3.3.2 RT-PCR Múltiplex (gen NSP1)	39
3.3.4 Secuenciación y análisis filogenético	40
4. Resultados	41
4.1 Resultados obtenidos en mosquitos	42
4.1.1 Captura de mosquitos	42
4.1.2 Detección de flavivirus en mosquitos	50
4.1.3 Comparación de secuencias y análisis filogenético	53
4.2 Resultados obtenidos en equinos	56
4.2.1 Tamizaje y titulación de sueros para Flavivirus	56
4.2.2 Tamizaje y titulación de sueros para Alphavirus	58
4.3 Estudio de un caso fatal de encefalitis viral	61
5. Discusión	63
5.1 De los resultados obtenidos en mosquitos	64
5.2 De los resultados obtenidos en equinos	66
5.3 De los resultados del estudio de un caso fatal de encefalitis viral	68
6. Conclusiones	70
7. Perspectivas	72
8. Bibliografía	74
9. Anexos	86
9.1 Tabla general de los pooles de mosquitos procesados	87
9.2 Tabla general con los resultados del procesamiento de los sueros de equinos	94
9.3 Artículo del caso fatal de WEEV	102
9.4 Artículos en proceso de redacción	105

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### **1.1 Introducción a los arbovirus y su transmisión.**

Los arbovirus (arthropod borne viruses) son un grupo de virus que se mantiene en la naturaleza a través de la transmisión biológica entre hospedadores vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos (mosquitos, flebótomos, garrapatas) (Organización Mundial de la Salud -OMS-, 1985).

La transmisión biológica puede ser vertical u horizontal. La transmisión vertical involucra el pasaje del virus de un vector infectado a la descendencia, tanto hembras como machos. La transmisión horizontal puede ser venérea u oral, la primera es de un macho previamente infectado a una hembra, y la segunda de una hembra infectada a un hospedador vertebrado a través de la saliva durante la ingesta de sangre. Esta última forma de transmisión es la más común para la mayoría de los arbovirus, mientras que los demás mecanismos los presentan sólo algunos arbovirus y son críticos para la perpetuación del virus especialmente bajo condiciones adversas (Kuno y Chang, 2005; Weaver y Reisen, 2010).

La transmisión biológica de los arbovirus por artrópodos ocurre en varios pasos: 1) ingestión de sangre de un hospedador virémico; 2) infección de las células epiteliales que limitan el mesenterio (intestino medio); las garrapatas se alimentan de sangre por un largo período de tiempo y los mosquitos lo hacen por un corto período, por esta razón la infección requiere que el volumen de sangre ingerida contenga una concentración de virus mayor en los últimos (Kuno y Chang, 2005); 3) liberación del virus desde el epitelio del intestino medio hacia el hemocele; 4) transporte a las glándulas salivales a través de la hemolinfa, ya sea directamente o luego de una amplificación secundaria en otro tejido, también a través de la hemolinfa; 5) infección y amplificación viral en las glándulas salivales. A partir de aquí ocurrirá la transmisión viral cuando el artrópodo se alimente nuevamente. El período comprendido entre la alimentación del vector de un hospedador virémico hasta que el mismo se torna infeccioso se llama período de incubación extrínseco (Torres-Estrada y Rodriguez, 2003).

No todos los artrópodos que ingieran sangre de un hospedador virémico se infectarán ni todos los artrópodos infectados desarrollarán una infección en la glándula salival y la habilidad de transmitir el virus. Muchos arbovirus infectan preferencialmente un rango determinado de especies de mosquitos, ésta especificidad por el hospedador tiene un rol muy importante en la distribución geográfica del virus. La competencia vectorial, definida como la capacidad particular del artrópodo de transmitir el virus de un hospedador a otro, está determinada por factores intrínsecos al vector (interacción vector-virus). Mientras que la capacidad vectorial, definida como el conjunto de características que hacen al artrópodo un buen vector, está influenciada por la genética del virus, la genética del vector y las condiciones ambientales (interacción vector-virus-hospedador) (Knipe y Howley, 2007).



Taxonómicamente, los arbovirus son un grupo de virus heterogéneo. Actualmente el Catálogo Internacional de Arbovirus contiene 545 virus, de los cuales 134 causan enfermedad en humanos. Los arbovirus de importancia médica y veterinaria son transmitidos por artrópodos hematófagos y la mayoría de ellos pertenecen a tres familias: *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), *Togaviridae* (género *Alphavirus*) y *Bunyaviridae* (géneros *Bunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*). También hay arbovirus en las familias *Rhabdoviridae* (género *Vesiculovirus*), *Reoviridae* (género *Orbivirus*), *Orthomyxoviridae* (género *Thogotovirus*) y *Asfaviridae* (género *Asfivirus*). Todos los arbovirus, excepto el virus de la fiebre suina africana (*Asfaviridae*, *Asfivirus* –virus con genoma ADN-) contienen genoma de ARN, aunque con distintos tipos de genoma y estrategias de replicación, este hecho sugiere que la estrategia de transmisión a través de artrópodos ha surgido varias veces durante la evolución de los virus ARN (Miller, 2008; Weaver y Reisen, 2010).

Las enfermedades que pueden causar los arbovirus en humanos se clasifican arbitrariamente en tres grupos: síndrome febril sistémico, meningitis y/o encefalitis y fiebre hemorrágica. A su vez, estos síndromes representan un amplio espectro de severidad, desde infecciones asintomáticas hasta muerte. La gravedad diferencial de enfermedad depende de la edad y el estado inmune del paciente, la dosis de virus inoculado y la patogenicidad de la cepa viral (Miller, 2008).

La mayoría de los arbovirus son zoonóticos, excepto los virus Dengue y Fiebre Amarilla que utilizan a los humanos como hospedadores de amplificación. Para el resto de los arbovirus, los humanos son considerados hospedadores finales (del inglés, *dead-end hosts*) ya que las viremias desarrollados por éstos no son suficientemente elevadas como para infectar al vector y no son preferidos como fuente de alimento frente a otros vertebrados (aves y mamíferos) (Knipe y Howley, 2007). Epidemiológicamente, los arbovirus zoonóticos pueden ser enzoóticos y epizoóticos, los enzoóticos son transmitidos entre los hospedadores amplificadores y mosquitos, mientras que los virus epizoóticos son transmitidos por otras especies de mosquitos y producen brotes en los hospedadores finales.

Los arbovirus tienen distribución mundial y presentan dos patrones de transmisión en función del clima. En áreas tropicales, debido a la estabilidad de las poblaciones de vectores, el virus circula gran parte del año, coincidente con la estación lluviosa, presentando a menudo un pico estacional amplio. Mientras que en climas templados, la transmisión vectorial del virus se ve afectada por la disminución de las poblaciones del vector durante la época invernal. En aquellos ecosistemas templados donde el virus es detectado anualmente pueden operar diversos mecanismos de *overwinter*, como la transmisión vertical, permanencia del virus en mosquitos hibernantes no diapausantes, reintroducción anual desde otros sitios con actividad viral, presencia de vectores alternativos (garrapatas) y/o reactivación de infecciones en hospedadores (Kuno y Chang, 2005). A su vez, muchos arbovirus tienen una distribución geográfica focalizada, limitada

por factores ecológicos que rigen su ciclo de transmisión. En general, los factores limitantes son: temperatura, patrones de precipitación y humedad, los que a su vez influyen sobre los patrones de vegetación y otros parámetros ecológicos que determinan la distribución geográfica de los vectores y de sus hospedadores (Gubler, 2002).

## **1.2 Factores asociados a la emergencia de los arbovirus.**

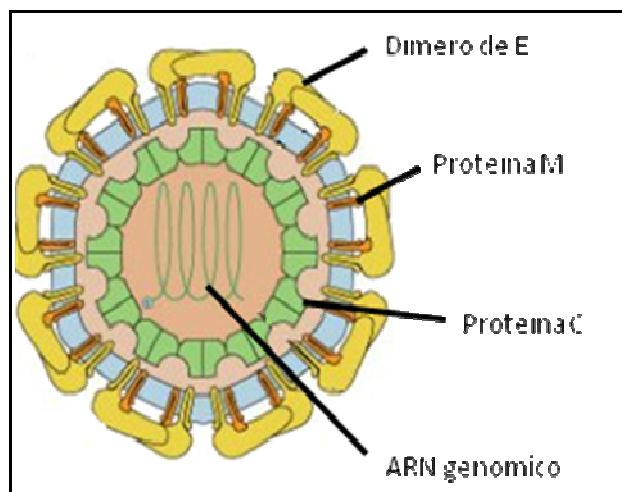
En los últimos 50 años, la emergencia y re-emergencia de nuevos arbovirus se ha convertido en un tema de gran importancia en la salud pública. Actualmente, los arbovirus representan el 23% de las enfermedades infecciosas emergentes (Jones y cols., 2008). Una visión más realista de las enfermedades infecciosas emergentes requiere una perspectiva integral que incorpora factores tanto sociales como físicos, químicos, biológicos y dimensiones de los sistemas de nuestro planeta (Wilcox y Colwell, 2005).

Mientras algunas variables que contribuyen a la epidemiología de cada virus son únicas, existen factores comunes que contribuyen a la emergencia/re-emergencia de los arbovirus: socio-económicos, ambientales y ecológicos. La conducta humana ha jugado un papel importante también, la facilidad y rapidez de los viajes internacionales y del intercambio de mercancías ha permitido la diseminación y colonización de especies vectores en nuevos sitios. El desarrollo de la agricultura, la expansión urbana y el crecimiento de la población han aumentado también el contacto entre humanos y vectores. La urbanización no planificada, acompañada por condiciones de hacinamiento, insuficiencia en la gestión de agua y residuos ofrece criaderos ideales para los mosquitos. Por último, el cambio climático ha jugado un papel muy importante en la emergencia/re-emergencia de los arbovirus, a través de una mayor duración del clima cálido, creando condiciones propicias para el desarrollo y la propagación de los vectores (Hollidge y cols., 2010), distribución geográfica y dinámica temporal de los vectores, los patrones de dispersión de los arbovirus y la eficiencia con la que ellos son transmitidos (Elliott, 2009). El mayor efecto del cambio climático sobre las enfermedades de transmisión vectorial se presenta en los extremos del intervalo de temperatura requerido para la transmisión: 14-18°C como límite inferior y 35-40°C como límite superior. Por otro lado, la modificación del régimen de precipitaciones también tiene efecto sobre los vectores, ya que aumenta el número y la calidad de criaderos de los mismos. La densidad de vegetación también está influenciada por el régimen de precipitaciones, permitiendo un mayor número de lugares donde puedan posarse los vectores (Githeko y cols., 2000).

### 1.3 Arbovirus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*

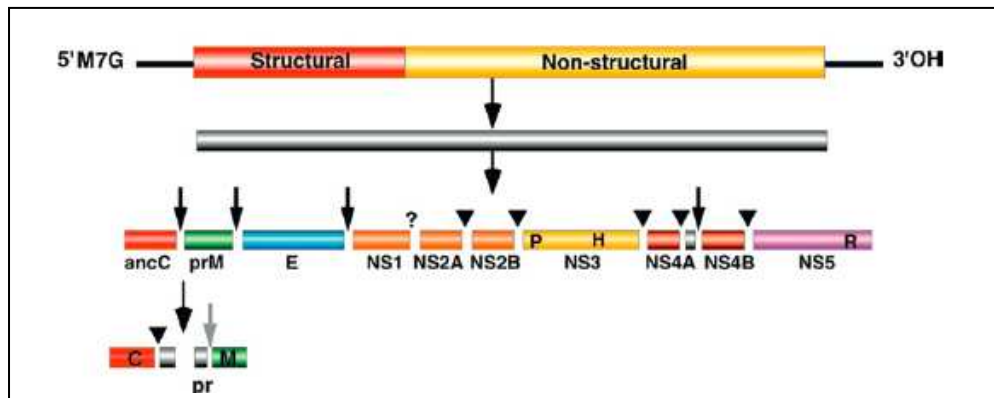
#### 1.3.1 Generalidades de la familia *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* consta de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Los *Flavivirus* son el género más grande de la familia e incluye a los arbovirus causantes de encefalitis y fiebres hemorrágicas. Los *Pestivirus* presentan un rango de hospedadores que incluye cerdos y rumiantes, mientras que los *Hepacivirus* causan enfermedad hepática grave en humanos (Mahy and van Regenmortel, 2008). Son virus envueltos con genoma ARN. La envoltura está compuesta por una bicapa lipídica con dos tipos de proteínas virales, la proteína de envoltura (E), en forma de dímeros, y la proteína de membrana (M). La glicoproteína E es el principal determinante antigénico, media la unión y fusión del virus a la célula hospedadora. La proteína M se produce durante la maduración de las partículas virales en la vía secretoria de la célula hospedadora. Debajo de la envoltura está la cápside, constituida por la proteína de cápside (C) y una única molécula de ARN genómico (figura 1).



**Figura 1.** Esquema del virión de *Flavivirus*. Modificado de Education expasy, Viral Zone 2010, [http://education.expasy.org/images/Flaviviridae\\_virion.jpg](http://education.expasy.org/images/Flaviviridae_virion.jpg).

El ARN genómico, infeccioso por sí solo, es de simple hebra y polaridad positiva, mide 10,8 kb de largo aproximadamente y presenta CAP tipo I (m<sup>7</sup>GpppAmpN<sub>2</sub>) en su extremo 5'. Codifica un único marco de lectura abierto (ORF), flanqueado en sus extremos por regiones no codificantes 3' y 5'. El ORF codifica una única poliproteína, la cual, mediante procesamiento proteolítico, dará lugar a las proteínas estructurales y no estructurales. El extremo N-terminal de la poliproteína contiene las proteínas estructurales (C-prM-E), seguido de las proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5). El procesamiento proteolítico de C/prM, prM/E, E/NS1 y 2K/NS4B es llevado a cabo por proteasas del hospedador. Una serinproteasa codificada por el virus es responsable del procesamiento de las proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y NS4B/NS5. Se desconoce la enzima responsable de la escisión NS1-2A (figura 2).

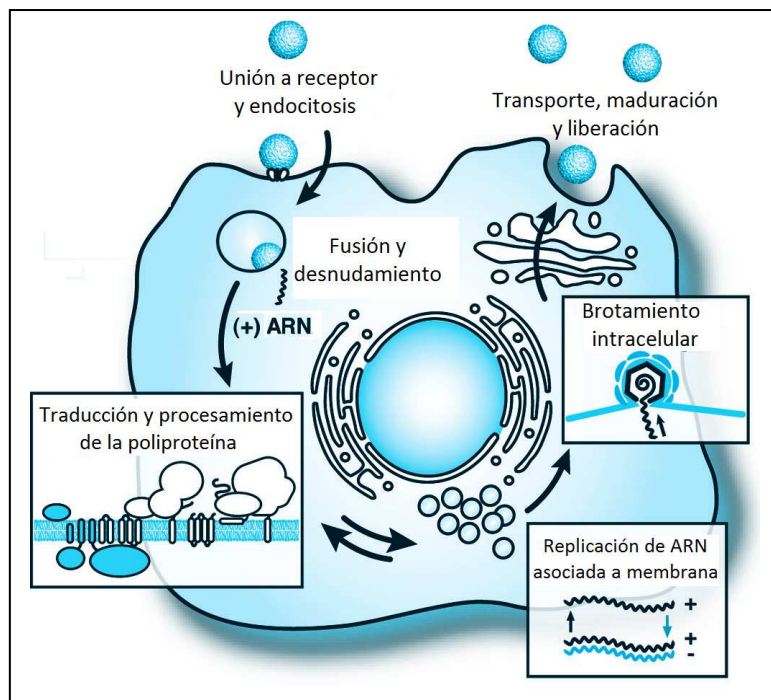


**Figura 2.** Esquema de la estructura genómica y procesamiento de la poliproteína del género *Flavivirus*. En negro se representan las regiones del genoma que no se traducen. Los marcos de lectura abiertos en color amarillo codifican proteínas no estructurales y los de color rojo codifican las estructurales. M<sub>7</sub>G representa la estructura CAP en 5'. En la parte inferior se presenta el esquema de clivaje de la poliproteína. ancC: Precursor de la proteína de cápside; prM: precursor de la proteína de membrana; M: proteína de membrana; E: proteína de envoltura; NS: proteínas no estructurales; P (NS3): proteasa; H (NS3): helicasa; R (NS5) ARN polimerasa. Tomado de *Flaviviridae* (MacLachlan y Dubovi, 2011).

En cuanto a las funciones de las proteínas no estructurales, NS1 participa en la replicación del ARN, aunque el mecanismo no está totalmente dilucidado. Esta proteína se localiza en los sitios de replicación del ARN y la mutación de los sitios de glicosilación del N-terminal de NS1 lleva a defectos en la replicación del ARN y en la producción de progenie viral. NS2A se localiza también en los sitios de replicación del ARN e interactúa con los componentes de la replicasa (NS3 y NS5), probablemente coordinando la transición de empaquetamiento a replicación del ARN. NS2B está asociada a membrana y forma complejos con NS3, actuando como co-factor de la serinproteasa NS2B-NS3. NS3 es una gran proteína multifuncional, contiene varias actividades necesarias para el procesamiento de la poliproteína y para la replicación del ARN. Su extremo N-terminal es el dominio catalítico de la serinproteasa NS2B-NS3, procesando las uniones entre las proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 y generando el extremo C-terminal de la proteína C madura y NS4A. Además es responsable del procesamiento de sitios internos en NS2A y NS3. NS4A interactúa con NS1 formando complejos de replicación, mientras que NS4B co-localiza con NS3 y el ARN intermediario de doble hebra en los complejos de replicación. Finalmente, NS5 es la proteína de mayor tamaño del virus, está altamente conservada y tiene función metiltransferasa y ARN polimerasa ARN dependiente.

La replicación viral comienza con la unión de la partícula viral a la célula a través de la proteína E. La entrada a la célula hospedadora es por endocitosis mediada por receptor. El bajo pH endosomal induce la fusión de la envoltura viral con las membranas de la vacuola endocítica. A continuación se produce el desnudamiento de la nucleocápside y el ARN genómico es liberado al citoplasma. El ARN genómico cumple tres funciones en el ciclo

viral: como ARN mensajero para la traducción de proteínas virales, como molde durante la replicación y como material genético a ser empaquetado en las nuevas partículas virales. La traducción del ARN lleva a la síntesis de una única poliproteína de más de 3000 aminoácidos, la cual será procesada por proteasas virales y celulares. La replicación del genoma ocurre en complejos replicativos citoplasmáticos, asociados a membranas perinucleares y es a través de la síntesis de un ARN intermediario de polaridad negativa. La progenie de viriones se produce por brotamiento al retículo endoplásmico, allí continúan transitando por la vía secretoria de la célula hasta su liberación en la superficie celular (figura 3) (Knipe y Howley, 2007).



**Figura 3.** Esquema de la replicación viral de la familia *Flaviviridae*. Modificado de *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication* (Knipe y Howley, 2007).

### 1.3.2 Generalidades de los *Flavivirus*

El género *Flavivirus* consiste en más de 70 virus y la mayoría de ellos son transmitidos a los humanos a través de artrópodos (Knipe y Howley, 2007). Más específicamente, el 50% de los flavivirus es transmitido por mosquitos, el 28% por garrapatas y el 22% son de vector artrópodo desconocido o transmitidas por roedores o murciélagos (Barrett, 2001). La mayoría de las infecciones por flavivirus son asintomáticas, y la enfermedad que producen se puede clasificar en: fiebre, encefalitis o fiebre hemorrágica.

La mayoría de los flavivirus son virus zoonóticos, se mantienen en ciclos de transmisión enzoótica que involucran aves, roedores o primates no humanos como hospedadores,

siendo generalmente los seres humanos los hospedadores finales. El virus Dengue y de la Fiebre Amarilla son la excepción, debido a su adaptación a los seres humanos y al mantenimiento en ciclos de transmisión urbana (Mahy y van Regenmortel, 2008).

Los flavivirus han sido denominados “galería de espejos antigénica” debido a la gran reactividad serológica cruzada que presentan entre ellos. Mediante pruebas de neutralización cruzada en cultivos celulares se han identificado ocho serogrupos: Encefalitis transmitida por garrapatas, Rio Bravo, Encefalitis japonesa, Tyuleni, Ntaya, Uganda S, Dengue y Modoc (tabla 1) y cols., 1989).

**Tabla 1.** Complejos antigénicos del género *Flavivirus* (Calisher y cols., 1989).

Complejo antigénico	Miembros más representativos
<b>Encefalitis transmitida por garrapatas</b>	Encefalitis central europea Encefalitis de Europa oriental
<b>Rio Bravo</b>	Rio Bravo
<b>Encefalitis japonesa</b>	Encefalitis japonesa Kunjin Encefalitis del valle Murray Encefalitis de San Luis West Nile
<b>Tyuleni</b>	Tyuleni
<b>Ntaya</b>	Ntaya
<b>Uganda S</b>	Uganda S
<b>Dengue</b>	Dengue serotipo 1 Dengue serotipo 2 Dengue serotipo 3 Dengue serotipo 4
<b>Modoc</b>	Modoc
<b>Sin agrupar</b>	Fiebre amarilla

A nivel molecular, el género *Flavivirus* es un grupo monofilético que está dividido en tres clados: transmitidos por garrapatas, transmitidos por mosquitos y de vector desconocido. Se postula que el grupo de los transmitidos por garrapatas divergió primero, seguido del de los transmitidos por mosquitos (Kuno y cols., 1998). A su vez, el grupo de los transmitidos por mosquitos está subdividido en dos clados: clado *Culex* y clado *Stegomyia* (Gaunt y cols., 2001).

### 1.3.3 Principales *Flavivirus* que circulan en América del Sur.

En la tabla 2 se muestran los virus miembros del género *Flavivirus* más relevantes para la salud humana y animal en América del Sur, más específicamente en el cono sur del continente, con sus correspondientes vectores, reservorios, y manifestación clínica.

**Tabla 2.** Flavivirus más relevantes para la salud humana y animal en América del Sur.

Virus	Reservorio	Vector	Manifestación clínica
SLEV	Aves paseriformes	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Fiebre y encefalitis
WNV	Aves	<i>Culex pipiens</i>	Fiebre, enfermedad generalizada y encefalitis
DENV	Humanos	<i>Stegomyia aegypti</i>	Fiebre, artralgia y erupción/fiebre hemorrágica
YFV	Primates Humanos	<i>Haemagogus spp.</i> <i>Stegomyia aegypti</i>	Fiebre, artralgia y erupción/fiebre hemorrágica

SLEV: virus de la encefalitis de San Luis; WNV: virus West Nile; DENV: virus dengue; YFV: virus de la fiebre amarilla.

### 1.3.3.1 Virus de la encefalitis de San Luis

El virus de la encefalitis de San Luis (del inglés *Saint Louis encephalitis virus* -SLEV) circula en América del Norte, Central y del Sur: desde el sur de Canadá hasta Argentina. En América del Norte es transmitido por mosquitos del género *Culex* (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis* y *Cx. nigripalpus*) y tiene a las aves silvestres de los órdenes Paseriformes (*Carpodacus mexicanus*, *Passer domesticus*) y Columbiformes (*Zenaida macroura*) como principales hospedadores. Sin embargo, la ecología del ciclo varía regionalmente, dependiendo de la biología, capacidad y competencia vectorial de las especies de mosquitos regionales, de la virulencia de las cepas virales y de la competencia de los hospedadores regionales.

Los equinos y humanos son hospedadores finales. La infección por SLEV en humanos, principalmente en personas jóvenes es muchas veces asintomática. La sintomatología depende de la virulencia de la cepa de SLEV con la que se infecte, factores intrínsecos del humano y de la historia de infección en la población. Se estima una mortalidad de 5-20%, siendo aún mayor en ancianos. La sintomatología se puede clasificar en tres síndromes: 1) dolor de cabeza febril: con fiebre, dolor de cabeza, posiblemente asociado con náuseas o vómitos, y sin enfermedad del sistema nervioso central (SNC); 2) meningitis aséptica con fiebre y tortícolis; 3) encefalitis (incluye meningoencefalitis y encefalomielitis) con fiebre, alteración de la conciencia y/o disfunción nerviosa (Reisen, 2003).

En Argentina, los datos disponibles sugieren a mosquitos de la especie *Culex quinquefasciatus* como vector principal y a *Columbina picui* y *Zenaida auriculata* como hospedadores (Díaz y cols., 2012). El virus resurgió en Córdoba, Argentina en el año 2002, registrándose un único caso de encefalitis en humanos que corresponde al primer caso luego de 17 años sin reportes de la enfermedad (Spinsanti y cols., 2003). Desde entonces, se han reportado brotes en Córdoba en el año 2005, que corresponde al primer brote reportado en América del Sur (Spinsanti y cols., 2008), Entre Ríos en 2006, Buenos Aires en 2010 (Seijo y cols., 2011) y San Juan en 2011 (Ministerio de Salud -MS-, Argentina, 2011).

En Brasil, el virus fue aislado por primera vez a partir de sangre de un caso humano de encefalitis en San Pablo en 2005 (Rocco y cols., 2005), al año siguiente ocurrió el primer brote, también en San Pablo (Mondini y cols., 2007).

En cuanto a la circulación de SLEV en nuestro país, los primeros reportes datan de la década del 70 y corresponden a estudios serológicos en niños y adultos, la prevalencia de anticuerpos anti-SLEV detectada fue de 4% en niños y de 5% en adultos (Somma-Moreira y cols., 1970). Más recientemente, en el año 2001 ocurrió un brote de enfermedad febril en el que algunos casos fueron confirmados como SLEV (Delfraro, 2002). Desde el año 2010 el Ministerio de Salud Pública realiza la vigilancia de meningoencefalitis virales, en la que se incluye el SLEV. En 2012 se diagnosticaron 3 casos, en dos individuos procedentes de Montevideo y uno de San José (Ministerio de Salud Pública -MSP-, Uruguay, 2012).

### **1.3.3.2 Virus West Nile**

El virus West Nile (del inglés *West Nile virus* -WNV) es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzoótico que involucra mosquitos del género *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. tarsalis*) y aves silvestres, siendo los humanos y caballos los hospedadores finales (Gould y Fikrig, 2004). Se detectó por primera vez en el hemisferio occidental en el año 1999 durante un brote de encefalitis en Nueva York, Estados Unidos. Luego de su introducción en Estados Unidos, seis años más tarde el virus se había propagado en todo el territorio de ese país, a Canadá y al Caribe (Hayes y cols., 2005). En el año 2004 se detectó por primera vez en América del Sur en caballos, más específicamente en Colombia (Mattar y cols., 2005). Posteriormente, se detectó también la circulación del virus en Venezuela (Bosch y cols., 2007).

En Argentina se logró aislar el virus a partir de un caballo enfermo durante una epizootia ocurrida en la provincia de Buenos Aires. Este estudio correspondió al primer aislamiento del virus en América el Sur (Morales y cols., 2006). Un estudio posterior en sueros de aves de diferentes localidades del país permitió evidenciar que el virus fue introducido en el país antes del 2005 y mantenido en un ciclo enzoótico en el que fueron expuestas numerosas especies de aves (Diaz y cols., 2008).

En Brasil, se reporta por primera vez la circulación de WNV en equinos del Pantanal (centro-oeste) en el año 2009, un sitio muy importante de arribo de aves migratorias desde el norte (Pauvolid-Correa y cols., 2011). A pesar de la abundancia de *Cx. quinquefasciatus* evidenciada por Dibo y cols., en San Pablo, hasta el momento no se han registrado casos de infección por WNV en humanos (Dibo y cols., 2011).



En Uruguay no se han registrado casos de infección por WNV en humanos. En enero de 2005, se registró un brote de encefalitis en 12 equinos de diferentes barrios de Montevideo: Cerrito de la Victoria, Sayago, Malvín Norte, Pantanoso y El Cerro, en el que murieron 7 equinos. Ante la sospecha de WNV como agente etiológico se enviaron muestras de suero de los equinos afectados a laboratorios de referencia de Brasil y Estados Unidos, no se obtuvieron resultados positivos para este agente (ProMED-mail, 2005).

### 1.3.3.3 Virus Dengue

El virus Dengue (del inglés *dengue virus* -DENV) es el arbovirus más importante en el mundo y una amenaza para la salud pública en los trópicos y subtrópicos. Actualmente hay 2,5 billones de personas que viven en zonas de riesgo de transmisión del virus y se reportan anualmente 100 millones de casos. La infección se ha dispersado desde el sudeste de Asia hasta las Américas, el Pacífico y África (Raclouz y cols., 2012).

El hombre es el principal hospedador del virus y los mosquitos de la especie *Stegomyia aegypti* el principal vector. *Stegomyia aegypti* está directamente asociado a la presencia humana, las larvas se crían en recipientes de agua artificiales como neumáticos desechados y jarros con agua. Existe también un ciclo selvático de dengue, evidenciado en Asia y África. En Asia la transmisión ocurre entre primates no humanos, principalmente monos *Macaca sp.* y *Presbytis sp.* y mosquitos del género *Ochlerotatus* como vector principal y *Stegomyia albopictus* como vector en regiones peridomésticas. En África la transmisión es entre monos *Erythrocebus patas* y mosquitos selváticos como *Stegomyia taylori-furcifer*, *Stegomyia luteocephalus* y *Stegomyia opok* (Holmes y Twiddy, 2003).

Actualmente las enfermedades causadas por el virus Dengue se clasifican en: 1) Dengue sin signos de alarma; 2) Dengue con signos de alarma; 3) Dengue grave (tabla 3) (Organización Panamericana de la Salud -OPS-, 2010).

**Tabla 3.** Clasificación de Dengue según la Organización Mundial de la Salud, 2010.

Dengue sin signos de alarma	Dengue con signos de alarma	Dengue grave
Vive en áreas endémicas de dengue o viajó a ellas. Fiebre y 2 o más de las siguientes manifestaciones: - náuseas, vómitos, - exantema, - mialgias y artralgias, - petequias o test de torniquete positivo, - leucopenia.	- Dolor abdominal intenso y continuo, - vómito persistente, - acumulación de líquidos, - sangrado de mucosas, - letargia, irritabilidad, - hepatomegalia >2cm, - aumento de hematocrito con caída rápida de plaquetas.	1. Escape importante de plasma que lleva a: choque o acumulación de fluidos en pulmón y disnea. 2. Sangrado grave. 3. Daño orgánico grave.

Existen cuatro serotipos diferentes de dengue (DENV 1 al 4), éstos a su vez presentan variación genética, existiendo genotipos dentro de los serotipos. La infección con un serotipo provee inmunidad de por vida a ese serotipo, pero no a los otros tres. Son comunes las infecciones cruzadas (segunda infección con serotipo diferente a la primera), éstas pueden tener consecuencias graves y en casos extremos conducen a la muerte. Para explicar lo anterior se propuso la teoría del potenciamiento dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent enhancement*) en la cual los anticuerpos presentes por una infección previa con un serotipo forman inmuno-complejos con el virus infectante (de serotipo diferente) lo que resulta en hemorragia y choque (*shock*) (Holmes and Twiddy, 2003). La ausencia de asociación entre los anticuerpos maternos y el desarrollo de dengue grave en lactantes ha llevado a la reconsideración de la teoría del potenciamiento dependiente de anticuerpos (Wilder-Smith y cols., 2010).

En cuanto a la situación del virus dengue en los países limítrofes, el comportamiento del dengue en Argentina es epidémico y la ocurrencia de casos se restringe a los meses de noviembre a mayo, en estrecha relación con la ocurrencia de brotes en los países limítrofes. En la última década se han registrado casos de dengue autóctono vinculados a los serotipos 1, 2 y 3 en las provincias de Salta y Jujuy, a los serotipos 1 y 3 en las provincias de Formosa, Misiones y Corrientes. Hasta el momento no se han notificado casos de dengue autóctono producidos por el serotipo 4 (MS, Argentina, 2009). En el año 2009, se produjo un brote de dengue por el serotipo 1, registrándose 26000 casos y 6 fallecidos. Las provincias afectadas fueron: Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Chaco, Entre Ríos, La Rioja, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. Fue el primer brote de dengue autóctono en el área metropolitana de la capital argentina y correspondió al último brote hasta el momento en el país vecino (Bernardini, 2011; Seijo y cols., 2011; Seijo y cols., 2009). En lo que va del año 2012 ya se han registrado más de 2000 casos (MS, Argentina, 2012).

Brasil es responsable de más del 60% de los casos notificados de fiebre por dengue en América (Teixeira y cols., 2008). Desde enero de 1996 el virus se ha establecido en el país y ocurren casos durante todo el año a lo largo y ancho del país. El serotipo 3 presenta la mayor frecuencia, también circulan los serotipos 1 y 2, pero con una frecuencia menor (Lindoso and Lindoso, 2009). En junio de 2010 reemergió el serotipo 4 en Brasil luego de 28 años, momento en el que se registró un brote en Boa Vista, capital de estado de Roraima, en el norte del país (Temporao y cols., 2011). Posteriormente se registraron también brotes de serotipo 4 en otros estados del norte (Amazonas, Pará), del noreste (Bahía, Pernambuco, Piauí) y del sur (Río de Janeiro y San Pablo) (de Souza y cols., 2011; Rocco y cols., 2012). En lo que va del año se han registrado más de 280000 casos de dengue en Brasil, correspondiendo el 41,7% a la región sudeste, 36,3% a la región noreste, 10,5% al norte, 10,3% al centro-oeste y 1,2% al sur (Ministério de Saude -Mds-, Brasil, 2012).

Mientras tanto, Uruguay continúa siendo el único país de América del Sur libre de dengue autóctono (desde el año 1916). En 1997, luego de 39 años de erradicado el vector *Stegomyia aegypti* en el país, el mismo fue reintroducido, primero desde Argentina y luego desde Brasil (Salvatella Agrelo, 1997). El Ministerio de Salud Pública realiza el monitoreo vectorial utilizando la estrategia de levantamiento de índices rápidos para *St. aegypti* (LIRAA), éste consiste en un levantamiento de indicadores rápidos de *St. aegypti* (índices de infestación predial, de Breteau, de infestación por tipo de recipiente, etc) a través de la obtención de muestras en hogares seleccionados en las distintas manzanas del lugar. En 2012 se registraron índices de infestación que implican alto riesgo en los departamentos de Montevideo, Paysandú y Salto (MSP, Uruguay, 2012).

Junto con la notificación de presencia del vector en el año 1997, comenzó en el país la vigilancia serológica de DENV y, desde 2007, la vigilancia molecular. Se han detectado varios casos de dengue, pero todos corresponden a casos importados (personas que viajaron a zonas endémicas). Por ejemplo, en 2010 se confirmaron cinco casos, dos de ellos con antecedentes de viaje a Brasil, uno a Colombia, uno a Paraguay y uno a Venezuela. En 2011 se registraron seis casos importados: cuatro con antecedente de viaje a Brasil y dos a Paraguay. En lo que va de 2012 se registró un solo caso, con antecedente de viaje a Paraguay. En cuanto a la vigilancia molecular, se ha detectado dengue de los serotipos 1, 2 y 3 (MSP, Uruguay 2011, 2012).

#### **1.3.3.4 Virus de la fiebre amarilla**

La fiebre amarilla (del inglés *yellow fever* -YF) continúa siendo un gran problema de salud pública en América. El virus circula tanto en ambientes urbanos como selváticos, con la participación de diferentes especies de mosquitos y de vertebrados. En el ciclo selvático, en América, los mosquitos del género *Haemagogus* actúan como principal vector y los monos como hospedador. Estos mosquitos pueden también transmitir el virus a humanos, cuando éstos ingresan a zonas forestales, y esta forma de transmisión representa la forma de YF más importante a nivel epidemiológico (Rogers y cols., 2006). El ciclo urbano en América implica mosquitos *Stegomyia aegypti* como vector y a los seres humanos como hospedador. El ciclo urbano fue la forma dominante de YF hasta que surtieron efecto las extensas campañas de erradicación de *St. aegypti* en América. Sin embargo, el colapso en el programa de control del vector ha permitido que el mismo reinfeste el continente y que aparezca YF en áreas donde había estado ausente por mucho tiempo (Zuckerman y cols., 2004).

Las manifestaciones clínicas de la Fiebre Amarilla son muy variables y van desde formas asintomáticas, pasando por formas leves con sintomatología inespecífica, hasta la fiebre hemorrágica clásica. En el 85% de los casos la enfermedad se resuelve, mientras que el 15% restante evoluciona a casos graves con manifestaciones hemorrágicas, con tasa de

mortalidad de hasta 60%. La forma maligna se manifiesta con fiebre, postración, compromiso hepatorenal y cardíaco, manifestaciones hemorrágicas y choque (MS, 2010).

En la actualidad, más específicamente en el año 2008, ocurrieron varios brotes de YF en la región (Argentina, Brasil y Paraguay), en la figura 4 se presenta el mapa con las zonas de riesgo de fiebre amarilla en América del Sur publicado por el Centro para el control y la prevención de enfermedades, CDC, USA (Jentes y cols., 2011). En Argentina ocurrieron dos brotes en el noreste del país (provincias de Misiones y Corrientes) entre noviembre de 2007 y octubre de 2008, afectando gravemente a dos poblaciones de monos aulladores (*Alouatta guariba clamitans* y *Alouatta caraya*) (Holzmann y cols., 2010). También se registraron casos en humanos (ProMED-mail, 2008). Al mismo tiempo, en Brasil, se reportaron 2013 muertes de monos (*A. caraya* y *A. guariba clamitans*) en el estado de Rio Grande do Sul, en el período que va desde octubre de 2008 hasta junio de 2009 (de Almeida y cols., 2012). A continuación se registraron muertes en monos en Sao José do Rio Preto y dos casos fatales en humanos en Riberão Preto (ambos en el estado de Sao Paulo). Ello condujo a la realización de un gran estudio eco-epidemiológico en la región, abarcando humanos, monos y mosquitos, detectándose anticuerpos y genoma viral y logrando el aislamiento de virus (Moreno y cols., 2011). Se cree que los factores desencadenantes del resurgimiento de la fiebre amarilla en la región fueron: la gran población humana susceptible, la alta prevalencia de vectores y hospedadores primarios (los primates no humanos), las condiciones climáticas favorables, especialmente el aumento de las precipitaciones, el surgimiento de un nuevo linaje viral y la circulación de personas y/o monos infectados (Vasconcelos, 2010).



Figura 4. Áreas con riesgo de transmisión de fiebre amarilla en América del Sur (Jentes y cols., 2011).

#### 1.4 Flavivirus endógenos.

Existe un grupo de flavivirus limitado a los insectos llamado “*insect-only flavivirus*” o flavivirus endógenos; éstos, por definición, se replican en células de mosquito y no en células de mamífero (Cook y cols., 2012). El primer flavivirus endógeno fue descubierto hace 30 años, el mismo fue denominado Cell Fusing Agent Virus (CFAV), al observar el efecto citopático que producía el sobrenadante de una línea celular de *Stegomyia aegypti* sobre un cultivo de línea celular de *Stegomyia albopictus* (Stollar y Thomas, 1975). La secuencia genómica del mismo fue caracterizada 17 años más tarde por Cammisa-Parks y colaboradores (Cammisa-Parks y cols., 1992). La primera detección y aislamiento de flavivirus endógenos en poblaciones de mosquitos fue en Kenia, en el año 2003. Se trata del Kamiti River Virus (KRV), el cual fue aislado a partir de mosquitos *Stegomyia macintoshi* (Crabtree y cols., 2003; Sang y cols., 2003). Posteriormente se detectó CFAV en mosquitos *Stegomyia aegypti* y *Stegomyia albopictus* en Puerto Rico (Cook y cols., 2006) y en Tailandia (Kihara y cols., 2007).

En los últimos 5 años ha habido una explosión en el descubrimiento de flavivirus endógenos en poblaciones de mosquitos. El Culex Flavivirus (CxFV), por ejemplo, fue detectado y aislado por primera vez en 2007 a partir de mosquitos *Culex pipiens* y *Culex spp.* en Japón (Hoshino y cols., 2007). A continuación se detectó en varias especies del género *Culex* (principalmente *Cx. pipiens*) en Guatemala (Morales-Betoulle y cols., 2008), Méjico (Farfan-Ale y cols., 2009; Farfan-Ale y cols., 2010; Saiyasombat y cols., 2010), Uganda (Cook y cols., 2009), Estados Unidos (Blitvich y cols., 2009; Bolling y cols., 2011; Crockett y cols., 2012; Kim y cols., 2009; Newman y cols., 2011; Saiyasombat y cols., 2011), Japón (Hoshino y cols., 2012), China (Huanyu y cols., 2012) y Brasil (Machado y cols., 2012).

El primer reporte de este virus en América del Sur fue en Uruguay, donde se detectó genoma de CxFV en mosquitos *Cx. pipiens* capturados en el año 2006 en el departamento de Colonia – CpCol- (Burgueño, 2007).

Se han detectado otros flavivirus endógenos en mosquitos *Culex*, como son Culex Theileri Flavivirus en *Cx. theileri* en España y Portugal (Calzolari y cols., 2012; Parreira y cols., 2012), Calbertado Virus en *Cx. tarsalis* en Estados Unidos y Canadá (Bolling y cols., 2011; Pabbaraju y cols., 2009; Tyler y cols., 2011), Quang Binh Virus en *Cx. tritaeniorhynchus* de Vietnam (Crabtree y cols., 2009) y Spanish Culex Flavivirus en *Cx. pipiens* de España (Vazquez y cols., 2011).

A su vez, se han detectado flavivirus en *Stegomyia spp.*: Stegomyia Flavivirus en *St. albopictus*, *St. flavopictus* y *St. galloisi* en Japón e Italia (Calzolari y cols., 2012; Hoshino y cols., 2009; Hoshino y cols., 2012) y otros flavivirus aún sin nombre de *St. caspius*, *St. vexans* y *St. cinereus* de Italia, Portugal, España, República Checa y Reino Unido (Calzolari y cols., 2012).

Los géneros *Mansonia* y *Ochlerotatus* también presentan flavivirus endógenos: Nakiwogo virus (NAKV) en *Mansonia africana nigerrina* en África (Cook y cols., 2009), Marisma Mosquito Virus y Spanish Ochlerotatus Flavivirus en *Ochlerotatus caspius* de España (Vazquez y cols., 2011), Mosquito Flavivirus OcFV en *Ochlerotatus spp.* de Italia (Cerutti y cols., 2012) y Hanko virus (HANKV) de *Ochlerotatus spp.* de Finlandia (Huhtamo y cols., 2012).

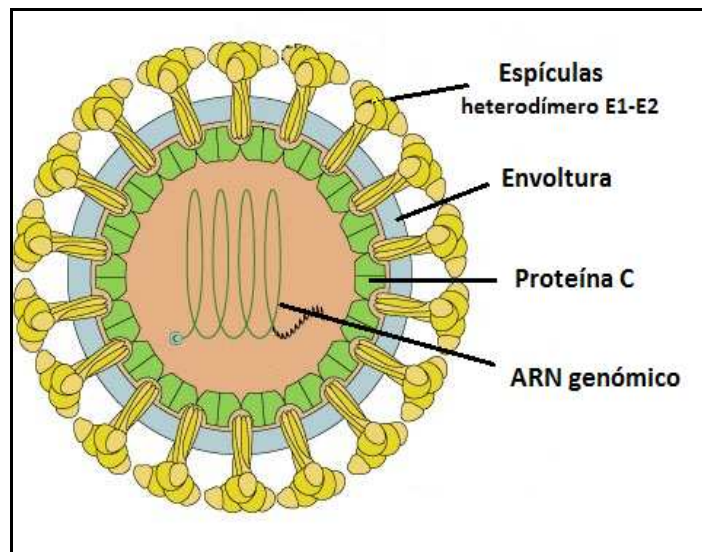
## **1.5 Arbovirus pertenecientes a la familia *Togaviridae*.**

### **1.5.1 Generalidades de la familia *Togaviridae*.**

La familia *Togaviridae* está compuesta por dos géneros, *Alphavirus* y *Rubivirus*. El género *Alphavirus* es el mayor de los dos y está compuesto por 29 virus agrupados en 10 complejos antigénicos, la mayoría de ellos son transmitidos entre hospedadores vertebrados y mosquitos vectores y son capaces de replicarse en una gran variedad de

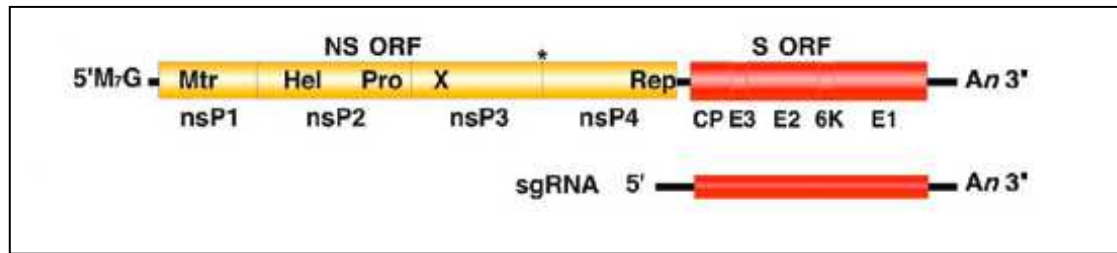
hospedadores, incluyendo mamíferos, aves, anfibios, reptiles y artrópodos. En cambio, el género *Rubivirus* está compuesto por un solo miembro, el virus Rubeola, el cual está limitado solo a hospedadores humanos y se transmite por vía respiratoria, congénita o perinatal (Mahy y van Regenmortel, 2008).

Son virus envueltos con genoma ARN. La envoltura está compuesta por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora y espículas, cada espícula está formada por 3 heterodímeros de las glicoproteínas E1 y E2. Algunos alphavirus pueden tener una tercera proteína de envoltura, E3, como resultado del procesamiento del precursor PE2. Debajo de la envoltura se encuentra la nucleocápside icosaédrica, compuesta por la proteína C, y el ARN genómico (figura 5) (MacLachlan y Dubovi, 2011).



**Figura 5.** Esquema del virión de *Alphavirus*. Modificado de Education expasy, Viral Zone 2010, [http://education.expasy.org/images/Togaviridae\\_virion.jpg](http://education.expasy.org/images/Togaviridae_virion.jpg)

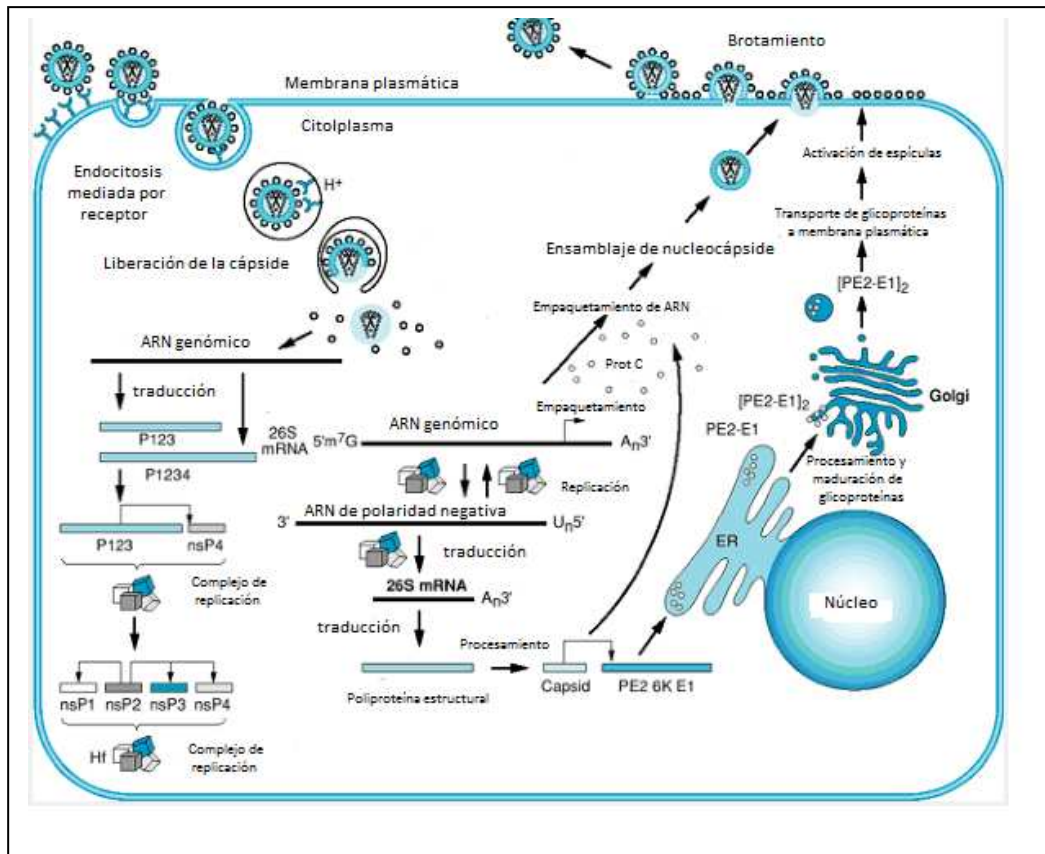
El genoma de *Togaviridae* consiste en una única molécula de ARN lineal de polaridad positiva de 11-12 kb de tamaño, presenta metilación en 5' (CAP) y poliadenilación en su extremo 3'. Los dos tercios 5' del genoma codifican las proteínas no estructurales, el otro tercio en 3' no es traducido a partir del ARN genómico, esta porción del genoma se traduce a partir de un ARNm subgenómico (sgRNA) (figura 6).



**Figura 6.** Esquema del genoma de *Alphavirus, Togaviridae*. Tomado de Fenner's Veterinary Virology. En negro se representan las regiones del genoma que no se traducen. Los marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frames*) están representados en color amarillo, en el caso de codificar proteínas no estructurales (NS ORF), y en color rojo, en el caso de codificar proteínas estructurales (S ORF). M7G representa la estructura CAP en 5' y An la poliadenilación en 3'. En la parte inferior se encuentra el ARN subgenómico (sgRNA). Mtr: Metil transferasa; Hel: helicasa; Pro: proteasa; X: proteína de función desconocida; Rep: replicasa; CP: proteína de cápside; E1, E2, E3: proteínas de envoltura (MacLachlan y Dubovi, 2011).

El ciclo de replicación viral comienza con la unión del virus a la célula hospedera a través de la interacción entre la glicoproteína E2 y los receptores en la superficie celular (lectinas, integrinas, lamininas). A continuación el complejo virus-receptor es endocitado por vía dependiente de clatrina. La acidificación de las vesículas produce rearrreglo del dímero E1-E2 y la formación de un trímero de E1 que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana de la vesícula, liberando la nucleocápside al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el ARN genómico actúa como ARN mensajero para la traducción de las proteínas no estructurales: NSP1 (metiltransferasa); NSP2 (NTPasa, helicasa y ARN trifosfatasa); NSP3 (fosfoproteína) y NSP4 (ARN polimerasa ARN dependiente). Una vez sintetizadas las proteínas no estructurales, se sintetizan las moléculas de ARN de polaridad negativa (ARN intermediario). A continuación, la replicasa viral comienza a sintetizar ARN de polaridad positiva (ARNs genómicos) a partir del ARN intermediario. Se sintetizan dos moléculas de ARN genómico a partir de una molécula de ARN intermediario. A continuación, se empaqueta el ARN genómico en viriones y los ARNs subgenómicos se traducen como una poliproteína estructural que será procesada a proteínas estructurales individuales. Las nucleocápsides se ensamblan en el citoplasma y la maduración ocurre por brotamiento a través de la membrana plasmática de la célula hospedera (figura 7) (Mahy y van Regenmortel, 2008).





**Figura 7.** Esquema de la replicación viral de la familia *Togaviridae*. Modificado de *Togaviridae: The Viruses and Their Replication* (Knipe y Howley, 2007).

### 1.5.2 Generalidades de los Alphavirus.

Los Alphavirus tienen distribución mundial y causan una gran variedad de enfermedades en los seres humanos, vertebrados terrestres domesticados y salvajes, así como en peces (salmónidos). La mayoría de los alphavirus se mantienen en un ciclo enzoótico que incluye vectores artrópodos y hospedadores vertebrados o reservorios animales (Weaver y cols., 2012).

La enfermedad que producen en humanos y/u otros animales se puede clasificar en: 1) síndrome febril asociado a artralgia y/o erupción, generado por los “alphavirus del viejo mundo”: Ross River, Barmah Forest, Mayaro, O’Nyong nyong, Chikungunya y Sindbis; y 2) encefalitis, ocasionadas por “alphavirus del nuevo mundo”: Virus de las Encefalitis Equinas (del Este, del Oeste y Venezolana) y Semliki Forest (MacLachlan y Dubovi, 2011). Es interesante notar que ciertos alphavirus que causan enfermedades similares se mantienen en condiciones ecológicas diversas y presentan una distribución muy amplia, tal es el caso del virus Mayaro y O’Nyong Nyong. El virus Mayaro se limita geográficamente a América del Sur y Central y el virus O’Nyong Nyong nunca se ha identificado fuera de África, ambos virus causan signos clínicos y síntomas casi idénticos (Powers y cols., 2001).

Existen 10 complejos antigénicos, determinados por la reactividad de las glicoproteínas de envoltura (tabla 4). Los complejos pueden estar formados por una única especie viral, estos son Barmah Forest (BF), Encefalitis Equina del Este (EEE), Encefalitis Equina Venezolana (VEE), Middelburg (MID) y Ndumu (ND), o pueden estar formados por varias especies virales, subtipos y variantes estrechamente relacionadas entre ellas, por ejemplo Semliki forest (SF) y Western equine encephalitis (WEE) (Weaver y cols., 2012).

**Tabla 4.** Clasificación antigénica de los Alphavirus (Weaver y cols., 2012).

<b>Complejo antigénico</b>	<b>Miembros más representativos</b>
<b>Bosque Barmah (BF)</b>	Barmah Forest
<b>Encefalitis equina del este (EEE)</b>	Encefalitis equina del este
<b>Middelburg (MID)</b>	Middelburg
<b>Ndumu (ND)</b>	Ndumu
<b>Bosque Semliki (SF)</b>	Semliki Forest Chikingunya O'Nyong-nyong Getah Ross River Mayaro
<b>Encefalitis equina venezolana (VEE)</b>	Encefalitis equina venezolana Mosso das Pedras Everglades Mucambo Pixuna Río Negro
<b>Encefalitis equina del oeste (WEE)</b>	Encefalitis equina del oeste Highlands J Sindbis Aura
<b>Trocaria</b>	Trocaria
<b>Enfermedad pancreática de salmón</b>	Enfermedad pancreática de salmón
<b>Elefante marino del sur</b>	Elefante marino del sur

A nivel molecular, se han realizado estudios filogenéticos utilizando secuencias completas del gen que codifica la glicoproteína de envoltura E1, éstos concuerdan con la clasificación en complejos antigénicos, con la excepción de Middelburg, que según estudios genéticos pertenece al complejo SF. Los estudios filogenéticos indican que los alphavirus transmitidos por mosquitos pueden haber surgido tanto en el “viejo mundo” como en el “nuevo mundo”, con al menos dos introducciones transoceánicas para llegar a su distribución actual. En los mismos, se infiere que los alphavirus salmónidos aparentan ser variantes o subtipos de nuevas especies de alphavirus (Powers y cols., 2001).

### 1.5.3 Principales Alphavirus que circulan en América del Sur

En la tabla 5 se muestran los arbovirus pertenecientes al género *Alphavirus* más relevantes para la salud humana y animal en América del Sur, más específicamente en el cono sur del continente, con sus correspondientes vectores, reservorios y manifestación clínica.

**Tabla 5.** Alphavirus más relevantes para la salud humana y animal en América del Sur (Weaver y Barrett, 2004).

Virus	Reservorio	Vector enzoótico	Vector epizoótico	Manifestación clínica
EEEV	Aves y roedores	<i>Culex (Mel) spp.</i>	<i>Stegomyia spp.</i> <i>Ochlerotatus spp.</i>	Febril, encefalitis
WEEV	Aves	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	Febril, encefalitis
VEEV	Roedores	<i>Cx. (Mel) spp.</i>	<i>Ochlerotatus spp.</i> <i>Psorophora spp.</i>	Febril, encefalitis

EEEV: virus de la encefalitis equina del este; WEEV: virus de la encefalitis equina del oeste; VEEV: virus de la encefalitis equina venezolana.

#### 1.5.3.1 Virus de la Encefalitis Equina del Este

El virus de la encefalitis equina del este (del inglés *eastern equine encephalitis virus* –EEEV) causa enfermedad en humanos, equinos y aves de caza durante epizootias esporádicas. Desde el siglo XIX este virus ha sido reconocido como un importante patógeno veterinario en América del Norte, es por ello, y porque se lo ha asociado con mortalidad en humanos, que la mayoría de los estudios epidemiológicos se han enfocado en esa región del continente. En cambio, en América del Sur las infecciones suelen estar asociadas a equinos y raramente a humanos (Weaver y cols., 1999). Igualmente, los casos de infección por EEEV no son comunes, con un promedio de 5-10 casos anualmente en Estados Unidos desde 1964. La última epidemia ocurrió en 1959 en New Jersey, con 32 casos humanos, de los cuales 22 fueron fatales (Weaver y cols., 2012).

El ciclo de transmisión primario de EEEV en América del Norte es entre aves paseriformes y zancudas y mosquitos *Culiseta melanura*. El principal vector en la transmisión del virus a equinos y humanos son mosquitos de los géneros *Stegomyia*, *Coquilettidia* y *Culex*, que se alimentan tanto de aves como de mamíferos, ya que *Cs. melanura* es un mosquito ornitofílico. El ciclo de transmisión del virus en América del Sur no está completamente caracterizado, debido principalmente a la baja ocurrencia de casos clínicos, pero se cree que mosquitos *Culex* del subgénero *Melanoconion* son el principal vector enzoótico, teniendo como hospedador a aves y pequeños mamíferos (Arrigo y cols., 2010; Zacks y Paessler, 2010).

En América del Sur solo se han reportado dos casos fatales por EEEV en humanos, uno en Brasil y otro en Trinidad, mientras que en América del Norte se han registrado, desde 1964 hasta 2010, 270 casos (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades -CDC-, 2011). En Brasil el virus ha causado epizootias en equinos en las regiones norte, noreste y sureste del país (Figueiredo, 2007). El reporte más reciente corresponde a brotes ocurridos en los estados de Paraíba, Pernambuco y Ceará, en 2008 y 2009, en los que fueron afectados 229 equinos de 93 granjas, con una fatalidad de 73% (Silva y cols., 2011).

En Argentina, en 1981 se registró la primera epizootia por EEEV. La misma ocurrió en la provincia de Santiago del Estero y presentó una incidencia de 17% y una tasa de fatalidad de 61%, sin registrarse casos humanos (Sabattini y cols., 1991). El último brote registrado corresponde a la provincia de Chaco, en el año 1988 (Sabattini, 2010).

En Uruguay, los últimos datos de EEEV en humanos corresponden a la década del 70, en los que se encontró una prevalencia de anticuerpos anti-EEEV de 6% en niños y de 2% en adultos (Somma-Moreira y cols., 1970). Posteriormente, en el año 2007 se detectó genoma viral, mediante RT-PCR genérica para alphavirus y posterior análisis filogenético, en mosquitos *Cx. pipiens* de la ciudad de Fray Bentos, departamento de Río Negro (Burgueño, 2007).

### **1.5.3.2 Virus de la Encefalitis Equina del Oeste**

El Virus de la Encefalitis Equina del Oeste (del inglés *western equine encephalitis virus* – WEEV) causa más infecciones en humanos que el EEEV, pero la enfermedad que produce es menos severa y la mortalidad es de 10%. Según el CDC, en Estados Unidos se han registrado 639 casos humanos desde 1964 hasta 2005. La tasa anual de casos ha disminuido desde el año 1988, registrándose uno a dos casos humanos anualmente. Debido a que no hay evidencia de un descenso en la virulencia de WEEV, se ha atribuido el menor número de casos a cambios en los procedimientos de irrigación y a los programas de control de mosquitos (Forrester y cols., 2008).

En la zona oeste de América del Norte el virus se transmite enzoóticamente entre aves paseriformes y mosquitos *Culex tarsalis*. Durante las epizootias, las aves domésticas y salvajes son los principales hospedadores amplificadores, aunque también puede ocurrir amplificación entre lagomorfos y roedores y mosquitos del género *Stegomyia* (Weaver y cols., 1997). Mientras que de América del Sur, solo se cuenta con datos de Argentina, siendo *Ochlerotatus albifasciatus* el vector epizoótico (Aviles y cols., 1992) y se cree que los conejos podrían ser los hospedadores amplificadores, ya que se identificó sangre de Leporidae en los mosquitos vectores (Mitchell y cols., 1987).

En América del Sur se han registrado pequeñas epizootias de WEEV en caballos, en Guyana, Ecuador, Brasil, Argentina y Uruguay, habiéndose registrado casos humanos en

Argentina, en la provincia de Río Negro, en brotes epidémicos ocurridos en 1982-1983 (Sabattini, 2010).

En Uruguay, el estudio serológico sobre circulación de arbovirus realizado por Somma y cols. reporta prevalencias de 3% en niños y 1% en adultos (Somma-Moreira y cols., 1970).

### **1.5.3.3 Virus del complejo de la encefalitis equina venezolana**

La encefalitis equina venezolana es una enfermedad infecciosa emergente en América Latina, se han registrado brotes durante décadas en países con circulación enzoótica. La puesta en marcha de sistemas de vigilancia ha permitido detectar casos humanos en países y zonas en las que se desconocía su actividad. Se desconoce la morbilidad asociada a esta enfermedad en las zonas de endemicidad de América del Sur, probablemente porque ha quedado oculto “bajo el paraguas del dengue”. Se cree que la enfermedad por VEEV podría representar hasta un 10% de los casos atribuidos a fiebre dengue, debido principalmente a que los signos y síntomas de ambas enfermedades son similares (Aguilar y cols., 2011).

El complejo antigénico de la Encefalitis Equina Venezolana (del inglés *venezuelan equine encephalitis* -VEE) está integrado por diferentes especies virales: virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), Mosso das Pedras, Everglades, Mucambo, Tonate, Pixuna (PIXV), Cabassou y Río Negro (RNV) (tabla 6). Epidemiológicamente, se clasifican en enzoóticos y epizoóticos. Los virus enzoóticos son transmitidos entre roedores hospedadores y mosquitos *Culex (Melanoconion) spp.* en ambientes selváticos o pantanosos, no son virulentos para los equinos y generalmente producen viremia muy baja, sin embargo algunos son patogénicos para humanos. Los virus epizoóticos son transmitidos por mosquitos *Psorophora sp.* y *Stegomyia sp.* y periódicamente producen brotes que involucran equinos y humanos, con tasas de mortalidad de 19 a 83% en equinos y enfermedad neurológica en humanos en un 4-14% de los casos. Además, los VEEV epizoóticos se han considerado como potenciales armas biológicas, ya que se pueden transmitir a humanos por aerosoles y son fáciles de producir a gran escala (Carrara y cols., 2007; Weaver y Barrett, 2004).

**Tabla 6.** Virus del complejo de la VEE (Aguilar y cols., 2011; Weaver y Barrett, 2004).

Especie viral	Subtipo	Patrón de transmisión	Manifestación clínica	Distribución geográfica	Vector
<b>VEEV</b>	AB	Epizootico	Febрил, encefalitis	América del Norte, Sur y Central	<i>Ochlerotatus, Psorophora spp</i>
	C	Epizootico	Febрил, encefalitis	América del Sur	<i>Ochlerotatus, Psorophora spp</i>
	D	Enzoótico	Febрил, encefalitis	América del Sur, Panamá	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>
	E	Enzoótico	Febрил, encefalitis	América Central, Méjico	<i>Culex taeniopus</i>
<b>Mosso das Pedras</b>	-	Enzoótico	No reconocida	Brasil	Desconocido
<b>Everglades</b>	-	Enzoótico	Febрил, encefalitis	Florida (Estados Unidos)	<i>Culex cedesii</i>
<b>Mucambo</b>	A	Enzoótico	Febрил, mialgia	América del Sur, Trinidad	<i>Culex portesi</i>
	B	Enzoótico	Febрил, encefalitis	Brasil, Colorado (E. Unidos)	Desconocido
	C	Enzoótico	Desconocido	Perú	Desconocido
	D	Enzoótico	Febрил	Perú	<i>Culex gnomatus</i>
<b>Pixuna</b>	-	Enzoótico	Febрил, mialgia	Brasil	<i>St. hastatus, St. aegypti</i>
<b>Cabassou</b>	-	Enzoótico	No reconocida	Guinea Francesa	Desconocido
<b>Río Negro</b>	-	Enzoótico	Febрил, mialgia	Argentina	Desconocido

En Argentina circulan dos especies virales del complejo de la encefalitis equina venezolana: Río Negro (RNV) y Pixuna (PIXV). El RNV circula solo en Argentina, fue aislado por primera vez en 1980 a partir de mosquitos *Culex delpontei* de la provincia de Chaco (Mitchell y cols., 1985). En 1989 éste virus provocó un brote de enfermedad febril en humanos en la isla General Belgrano, provincia de Formosa y estudios serológicos posteriores demostraron que el virus continua circulando en esa región (Camara y cols., 2003). Más recientemente se reportó la circulación de RNV en mosquitos de las provincias de Chaco (Pisano y cols., 2010b), Tucumán (Pisano y cols., 2010a) y Córdoba (Pisano y cols., 2012), demostrando una distribución más amplia del virus en el país. El PIXV fue detectado por primera vez en Argentina en mosquitos *Oc. hastatus oligopistus* de la provincia de Chaco (Pisano y cols., 2010b), y posteriormente se detectó en mosquitos *Stegomyia aegypti* capturados en Tucumán (Pisano y cols., 2010a). Los virus epizooticos se han detectado en caballos previamente vacunados contra los virus EEEV y WEEV, debido a que las vacunas estaban contaminadas con virus VEEV y mal inactivadas. Esta situación se repitió en varias epizootias producidas por los virus EEE y/o WEE y también en períodos interepizooticos, a raíz de estos hechos se incrementó la cobertura de vacunación, y el problema de la contaminación de las vacunas fue solucionado con estrictos controles (Sabattini, 2010).

En el sudeste de Brasil circula el virus Mosso das Pedras, dónde causa enfermedad febril y diarrea en los individuos que visitan la selva tropical atlántica (Figueiredo, 2007; Romano-Lieber e Iversson, 2000). En tanto en la región amazónica y en el estado de Paraná, circulan los virus Mucambo y PIXV, presentando el virus Mucambo la mayor prevalencia (Fernandez y cols., 2000; Vasconcelos y cols., 1991).

En Uruguay no hay antecedentes de circulación de ninguno de los integrantes del complejo de la encefalitis equina venezolana.

## 2. OBJETIVOS

---

## **2.1 Objetivo general**

Estudiar la circulación de los arbovirus en Uruguay en dos actores del ciclo de transmisión: vectores y hospedadores finales, identificando y caracterizando los virus detectados.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Detectar la presencia de flavivirus y alphavirus en poblaciones de mosquitos del país.
- Identificar y caracterizar genéticamente los virus hallados en mosquitos.
- Detectar anticuerpos neutralizantes de flavivirus y alphavirus (EEEV, WEEV, VEEV, PIXV, RNV, WNV y SLEV) en sueros de equinos.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **3.1 Estudios moleculares en mosquitos**

#### **3.1.1 Selección de las áreas y métodos de trapeo de los mosquitos**

El muestreo de mosquitos se realizó en los sitios más probables de circulación de los arbovirus en Uruguay: departamentos fronterizos con Argentina y Brasil, y la capital de país. También se incluyeron los departamentos de Canelones y Colonia debido a su relevancia como centros de actividad turística.

Se realizaron muestreos de mosquitos en los departamentos de Artigas, Canelones, Colonia, Montevideo, Río Negro, Paysandú, Rivera, Salto y Soriano, utilizando 2 métodos de captura: 1) captura manual por succión directa dentro de los módulos habitacionales y 2) captura con trampas de luz CDC adicionadas con 500g de hielo seco (CO<sub>2</sub>) en espacios abiertos peridomiciliarios urbanos y sub-urbanos (modelos 512 y 712, The John W. Hock Company, Florida, USA). Las capturas se realizaron en los meses de primavera, verano y otoño y se relevaron ambientes urbanos y sub-urbanos.

Se colocaron de 1 a 6 trampas por captura y se mantuvieron de 2 a 3 noches desde las 18hs hasta las 8hs del día siguiente. Los ejemplares capturados se colocaron en hielo seco durante el traslado al laboratorio y luego permanecieron a -80°C en tubos de 1,5 mL estériles, hasta su posterior clasificación.

#### **3.1.2 Clasificación y procesamiento de mosquitos**

La identificación de los mosquitos se realizó según el “Sistema de claves de Darsie” (Darsie, 1985) en la Sección Entomología de la Facultad de Ciencias. Durante todo el proceso, se mantuvo la cadena de frío mediante la colocación de baño de agua-hielo debajo de la placa de Petri y la utilización de luz de fibra óptica que no transmite calor. Se realizaron *pools* de mosquitos (de 1 hasta 50 ejemplares por *pool*) separándolos por localidad, especie y sexo, las hembras también se separaron según estén alimentadas de sangre o no. Posteriormente se almacenaron en tubos de 1,5 mL estériles a -80°C hasta su procesamiento.

Los *pools* de mosquitos se trituraron individualmente utilizando pequeños morteros de polipropileno autoclavables (“*pellet pestles*”, Sigma-Aldrich, USA), se homogeneizaron con 1 mL de medio de cultivo de células MEM (Eagle Minimal Essential Medium, Gibco®, Invitrogen, USA), se centrifugaron 30 minutos a 10000 rpm a 4°C y se almacenó el sobrenadante de cada *pool* (“homogeneizado de mosquitos”) en un tubo de 1,5 mL estéril a -80°C.

### **3.1.3 Extracción de ARN total y RT-PCRs**

#### **3.1.3.1 Extracción de ARN total**

Se extrajo ARN total de cada homogeneizado de mosquitos utilizando TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen, USA). En un tubo de 1,5 mL estéril se colocó 750  $\mu$ L de TRIZOL<sup>®</sup>, 200  $\mu$ L de cloroformo, 0,5  $\mu$ L de Glicógeno (Qiagen, USA) y 200  $\mu$ L de homogeneizado de mosquitos, se mezcló por vórtex durante 2 min y se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase superior (600  $\mu$ L aproximadamente) en otro tubo estéril, a ésta se le agregó 600  $\mu$ L de isopropanol a -20°C, se mezcló por inversión y se incubó durante 24 hs a -20°C. Se centrifugó 20 min a 14000 rpm a 4°C, se descartó el isopropanol. Posteriormente se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70%, se centrifugó 15 min a 14000 rpm a 4°C. Se descartó el etanol y se secó ligeramente el precipitado obtenido a 37°C. Finalmente se resuspendió en 35  $\mu$ L de agua libre de RNasas a 37°C y se almacenó a -80°C.

#### **3.1.3.2 RT-PCR para Flavivirus (*Flaviviridae*)**

##### **3.1.3.2.1 RT-PCR anidada genérica, gen NS5 (fragmento de 143 pb)**

La RT-PCR anidada genérica para flavivirus que amplifica un fragmento de 143 pares de bases (pb) del gen NS5 se realizó de acuerdo a Sanchez-Seco y cols con modificaciones (Sanchez-Seco y cols., 2005). Para la transcripción reversa de ARN a ADNc y posterior amplificación (primer amplificación) se utilizó el kit SuperScript<sup>™</sup> One Step RT-PCR con Platinum<sup>®</sup> *Taq* (Invitrogen, USA) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA) o Mastercycler<sup>®</sup> personal (Eppendorf, USA). En la Tabla 7 se detalla la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, éstos son degenerados y están basados en motivos conservados en la región del gen NS5. En el esquema 2 se muestra la ubicación de los mismos en el gen NS5.

Se adicionaron 5  $\mu$ L de ARN total a 45  $\mu$ L de mezcla de reacción conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (Flavi 1+ y Flavi 1-) y 1  $\mu$ L de SuperScript<sup>™</sup> II / Platinum<sup>®</sup> *Taq* (Invitrogen, USA). Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 min y 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 47°C por un min y 68°C por 1 min y 15 seg. La extensión final fue a 68°C por 5 min.

La reacción de PCR anidada se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada oligonucleótido (Flavi 2+ y Flavi 2-), 5 U/ $\mu$ L de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA) y 1  $\mu$ L del producto de la primer amplificación. Se realizó una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segs, 47°C por 1 min y 72°C por 30 seg. La extensión final fue a 72°C por 5 min.

Se utilizó como control positivo un ARN extraído a partir de un cultivo celular (células C6/36) infectado con el SLEV (cedido por el Laboratorio de Arbovirus, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

A continuación, 5 µL de cada mezcla de reacción de PCR anidada se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo 1 µg/mL de bromuro de etidio en buffer TBE (Tris borato EDTA) 1X. Los productos se visualizaron bajo luz UV. Se incluyó marcador de ADN de 100 pb en cada gel.

### **3.1.3.2.2 RT-PCR semi-anidada genérica, gen NS5 (fragmento de 262pb)**

La RT-PCR semi-anidada genérica para flavivirus que amplifica un fragmento de 262 pb de NS5 se realizó de acuerdo a Hoshino y cols., 2007, con modificaciones (Hoshino y cols., 2007). Para la transcripción reversa de ARN a ADNc y posterior amplificación se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR con Platinum® *Taq* (Invitrogen) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) o Mastercycler® personal (Eppendorf, USA). En la Tabla 7 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar una región del gen NS5. En el esquema 2 se muestra la ubicación de los mismos en el gen NS5.

Debido a que en el artículo no se indica la temperatura de hibridación, se realizó una RT-PCR en gradiente de temperaturas de hibridación con controles positivos, en un rango de 51-62°C. Se obtuvo un mayor rendimiento a 58°C.

5 µL de ARN total se adicionaron a 45 µL de mezcla de reacción de RT-PCR conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (FU1 y cFD3), 1 µL de SuperScript™ II / Platinum® *Taq*. Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 min y 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por un min y 68°C por 1 min y 15 seg. La extensión final fue a 68°C por 5 min.

La reacción de PCR semi-anidada se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada oligonucleótido (FU1 y cFD2), 5U/µL de *Taq* DNA polimerasa de Invitrogen y 1 µL del producto de la primer amplificación. Se realizó una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 1 min y 72°C por 30 seg. La extensión final fue a 72°C por 5 min.

Se utilizó el mismo control positivo que en el apartado 3.1.3.2.1.

La visualización de los productos de la reacción de PCR semi-anidada se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

### **3.1.3.2.3 RT-PCR genérica, gen NS3 (fragmento de 452pb)**

La RT-PCR genérica para flavivirus que amplifica un fragmento de 452 pb del gen NS3 se realizó de acuerdo a Hoshino y cols., con modificaciones (Hoshino y cols., 2007).

Para la transcripción reversa del ARN a ADNc y posterior amplificación se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR con Platinum® *Taq* (Invitrogen) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). En la Tabla 7 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar una región del gen NS3 y en el esquema 1 la ubicación de los mismos en el gen NS3.

Se adicionaron 5 µL de ARN total a 45 µL de mezcla de reacción de RT-PCR conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (Fla-U5004 y Fla-L5457), 1µL de SuperScript™ II / Platinum® *Taq*. Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 minutos y 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por un minuto y 68°C por 1 minuto y 15 segundos. La extensión final fue a 68°C por 5 minutos.

Se utilizó el mismo control positivo que en el apartado 3.1.3.2.1.

La visualización de los productos de la reacción de RT-PCR se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

### **3.1.3.2.4 RT-PCR anidada para Culex Flavivirus, gen NS5 (fragmento de 206pb)**

La RT-PCR anidada para Culex Flavivirus que amplifica un fragmento de 206 pb del gen NS5 se realizó según Newman y cols., con modificaciones (Newman y cols., 2011).

Para la transcripción reversa del ARN a ADNc y posterior amplificación se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR con Platinum® *Taq* (Invitrogen) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation). En la Tabla 7 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. En el esquema 2 se muestra la ubicación de los mismos en el gen NS5.

Se adicionaron 5 µL de ARN total a 45 µL de mezcla de reacción RT-PCR conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (FU2 y cFD3), 1µL de SuperScript™ II / Platinum® *Taq*. Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 minutos y 95°C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 68°C por 2 minutos y 30 segundos. La extensión final fue a 68°C por 10 minutos.

La reacción de PCR anidada se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada oligonucleótido (CxFV\_9131F y CxFV\_9337R), 5 U/µL de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA) y 1 µL del producto de la primera amplificación. Se realizó una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4

minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 minutos y 72°C por 45 segundos. La extensión final fue a 72°C por 7 minutos.

La visualización de los productos de la reacción de RT-PCR se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

### **3.1.3.2.5 RT-PCRs anidadas para Culex Flavivirus, gen NS5 (fragmento de 1934pb)**

Las RT-PCRs anidadas para amplificar 1934 pb del gen NS5 se realizaron según Newman y cols., con modificaciones (Newman y cols., 2011).

Para la transcripción reversa del ARN a ADNc y posterior amplificación se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR con Platinum® *Taq* (Invitrogen) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). En la Tabla 7 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. En el esquema 2 se muestra la ubicación de los mismos en el gen NS5.

Se adicionaron 5 µL de ARN total a 45 µL de mezcla de reacción de RT-PCR conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (CxFV\_8880F y CxFV\_10814R), 1µL de SuperScript™ II / Platinum® *Taq*. Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 minutos y 95°C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 68°C por 2 minutos y 30 segundos. La extensión final fue a 68°C por 10 minutos. A continuación se realizaron 3 PCR anidadas solapantes que en conjunto permiten amplificar un fragmento de 1934pb (PCR anidada 1: 658pb; PCR anidada 2: 672pb; PCR anidada 3: 632pb).

Cada una de las 3 reacciones de PCR anidadas se realizaron en un volumen final de 50 µL, conteniendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada oligonucleótido (PCR anidada 1: CxFV\_8880F y CxFV\_9538R; PCR anidada 2: CxFV\_9516F y CxFV\_10188R; PCR anidada 3: CxFV\_10182F y CxFV\_10814R), 5 U/µL de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA) y 1 µL del producto de la RT-PCR.

Las condiciones de ciclado de las 3 PCR anidadas fueron idénticas, consistiendo de una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 minutos y 72°C por 1 minuto. La extensión final fue a 72°C por 7 minutos.

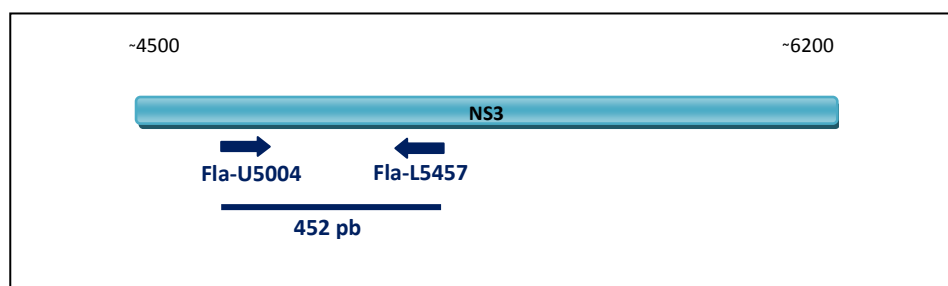
La visualización de los productos de la reacción de RT-PCR se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar Flavivirus.

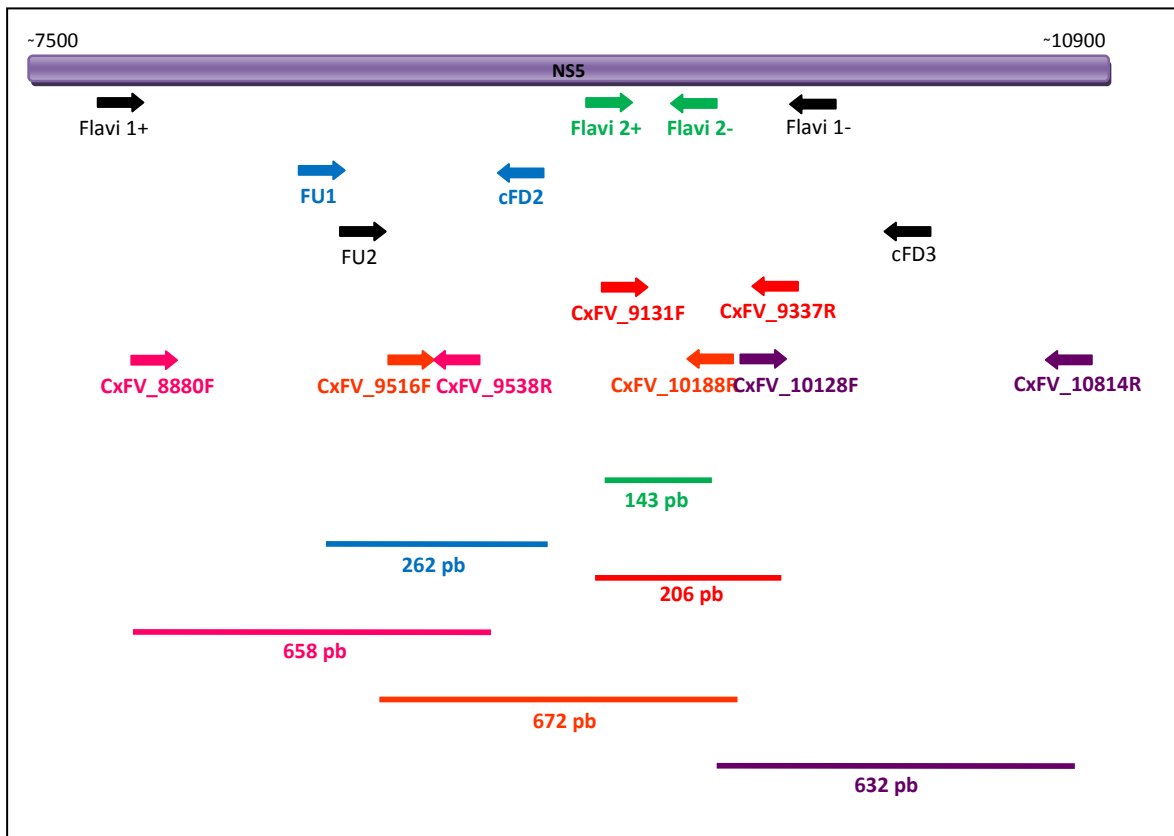
Nombre	Posición*	Secuencia
cFD2	9096-9070	5'- GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC -3'
cFD3	9963-9940	5'- AGCATGTCTTCCGTGGTCATCCA -3'
CxFV_10182F	10182-10203	5'- CAACCGACGRCGTGTTCTGGTG -3'
CxFV_10188R	10167-10188	5'- GTTGTCTCTACGAGTCGCGTG -3'
CxFV_10814R	10791-10814	5'- AGACGTGAACAAAAGCTTGCCAC -3'
CxFV_8880F	8880-8904	5'- GGAGAAGAAGCCGTCCTCTTTCGG -3'
CxFV_9131F	9131-9154	5'- TTGTGGTTCTTGCTGGACCAAGTG -3'
CxFV_9337R	9360-9337	5'- ATTCTCCCAACCTGGTTCTTCCA -3'
CxFV_9516F	9516-9537	5'- CCACACCAGTCTAAGGTACATC -3'
CxFV_9538R	9517-9538	5'- CTCGGTCGGTTGCAAGTTCTTG -3'
Fla-L5457	5290-5310	5'- GTGAARTGDGCYTCRTCCAT -3'
Fla-U5004	4858-4878	5'- GGAACDTCMGGHTCNCCHAT -3'
Flavi 1-	9255-9233	5'- TCCAICCGCIRTRTCRTCIGC -3'
Flavi 1+	7871-7897	5'- GAYYTIGGITGYGGIIGGGIRGITGG -3'
Flavi 2-	9130-9107	5'- CCARTGITCYKYRTTIAIRAAICC -3'
Flavi 2+	8987-9006	5'- YGYRTIYAYAWCAYSATGGG -3'
FU1	8834-8860	5'- TACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAA -3'

\* Posición relativa a la secuencia de referencia de CxFV del GenBank (número de acceso NC\_008604)  
R=AG, Y=CT, K=GT, W=AT, S=CG, D=AGT, H=ACT, N=ACGT.

**Esquema 1.** Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar una región de 452 pb del gen NS3 de flavivirus (apartado 3.1.3.2.3).



**Esquema 2.** Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar diferentes regiones del gen NS5 de flavivirus (apartados 3.1.3.2.1, 3.1.3.2.2, 3.1.3.2.4 y 3.1.3.2.5).



### 3.1.3.3 RT-PCR genérica anidada para Alphavirus (*Togaviridae*), gen NSP4 (fragmento de 195pb)

La RT-PCR anidada genérica que amplifica un fragmento de 195 pb del gen NSP4 de Alphavirus se realizó de acuerdo a Sanchez-Seco y cols. (Sanchez-Seco y cols., 2001).

Para la transcripción reversa de ARN a ADNc y posterior amplificación (primer amplificación) se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR con Platinum® Taq (Invitrogen, USA) en un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA) o Mastercycler® personal (Eppendorf, USA). En la Tabla 8 se detalla la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, éstos son degenerados y están basados en motivos conservados en la región del gen NSP4. En el esquema 3 se muestra la ubicación de los mismos en el gen NSP4.

Se adicionaron 5 µL de ARN total a 45 µL de mezcla de reacción de RT-PCR conteniendo 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada primer (Alpha 1+ y Alpha 1-) y 1 µL de SuperScript™ II / Platinum® Taq (Invitrogen, USA). Se realizó un ciclo inicial a 45°C por 30 minutos y 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por un minuto y 68°C por 30 segundos. La extensión final fue a 68°C por 5 minutos.



La reacción de PCR anidada se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 40 pmoles de cada oligonucleótido (Alpha 2+ y Alpha 2-), 5 U/ $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA) y 1  $\mu\text{L}$  del producto de la primer amplificación. Se realizó una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos. La extensión final fue a 72°C por 5 minutos.

Se utilizó como control positivo un ARN extraído a partir de un cultivo celular infectado con el VEEV cepa TC-83 (cedido por el Laboratorio de Arbovirus, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

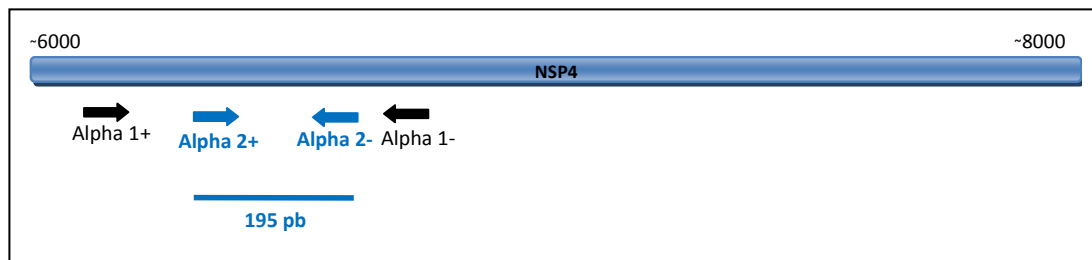
La visualización de los productos de la reacción de RT-PCR se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar Alphavirus.

Nombre	Posición*	Secuencia
Alpha 1+	6137-6172	5'- GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG -3'
Alpha 1-	6618-6593	5'- KYTCYTCIGTRTGYYTTIGTICIGG -3'
Alpha 2+	6315-6339	5'- GIAAYTGAAAYGTIACICARATG -3'
Alpha 2-	6509-6485	5'- GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC -3'

\* Posición relativa a la secuencia de referencia de VEEV del GenBank (número de acceso NC\_001449)  
R=AG, Y=CT, K=GT, W=AT, S=CG, D=AGT, H=ACT, N=ACGT.

**Esquema 3.** Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar 195 pb del gen NSP4 de alphavirus.



### 3.1.4 Clonaje de fragmento de 143pb de flavivirus en el plásmido CloneJET

Los productos de PCR que mostraron banda de intensidad débil en gel de agarosa y secuencias poco claras se clonaron utilizando el kit CloneJET (CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Thermo Scientific). Se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  del producto de PCR con: 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *DNA Blunting*, 10  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 2X y 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas y DNasas. La mezcla se homogeneizó y se centrifugó durante 5 segundos. Se incubó a 70°C durante 5 minutos. A la mezcla se agregó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido pJET1.2/Blunt (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) y 1  $\mu\text{L}$

de la enzima T4 DNA ligasa (5U/μL). Se homogeneizó la mezcla y se centrifugó durante 5 segundos. La mezcla de ligación se incubó a 22°C durante 30 minutos.

Se utilizaron 2,5 μL del producto de la ligación obtenido para transformar 25 μL de bacterias *E.coli* NEB 5-alpha (*NEB 5-alpha Competent E. coli, High Efficiency*, New England BioLabs). Se sembraron placas de agar LB (1% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,17 M NaCl, 1,5% agar, 100 μg/mL de Ampicilina) con el producto de la transformación y se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio LB (1% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,17 M NaCl, 100 μg/mL de Ampicilina), con agitación a 220 rpm a 37°C durante toda la noche. La extracción y purificación del ADN plasmídico se realizó usando QIAprep® Miniprep (Qiagen, Estados Unidos). El ADN se eluyó en 50 μL de agua libre de RNasas y DNasas y se almacenó a -20°C. Finalmente se liberó el inserto del plásmido mediante la digestión con la enzima de restricción BglII (Fermentas, Thermo Scientific).

### **3.1.5 Secuenciación y Análisis Filogenético**

Los productos de PCR se purificaron usando QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Estados Unidos) o NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y se realizó la secuenciación de ambas hebras con los oligonucleótidos utilizados en cada PCR (Macrogen Inc, Korea).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se revisaron y se editaron manualmente, utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente se compararon con la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST, opción “blastn” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

El alineamiento de secuencias se realizó utilizando ClustalW (Larkin y cols., 2007) y MEGA v5 (Tamura y cols., 2011). Para ello se incluyeron las secuencias de las muestras positivas y un conjunto de secuencias representativas de cada género de virus, obtenidas del GenBank. El modelo de sustitución más adecuado para el set de datos fue estimado con Modelgenerator (<http://bioinf.may.ie/software/modelgenerator>). Las filogenias fueron construidas utilizando el criterio de máxima verosimilitud, con los programas PhyML ([www.atgc-montpellier.fr/phyml](http://www.atgc-montpellier.fr/phyml)) y MEGA v5. El soporte estadístico de los nodos fue calculado mediante aLRT (approximate likelihood-ratio test) y bootstrap (1000 réplicas) respectivamente.

## **3.2 Estudios serológicos en equinos**

### **3.2.1 Selección de muestras**

Se seleccionaron 425 sueros de caballos del año 2007 cedidos por la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Las

mismas fueron obtenidas de equinos asintomáticos provenientes de distintos establecimientos de los 18 departamentos del interior del país. Ninguno de los equinos había sido vacunado previamente contra arbovirus. Los sueros se mantuvieron a -80°C en DILAVE y a -20°C en la Sección Virología hasta su procesamiento.

### **3.2.2 Preparación de los sueros**

Los sueros se inactivaron en baño de agua a 56°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 10000 rpm por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL. Finalmente, se realizó una dilución 1:5 con MEM (Gibco®, Invitrogen, Estados Unidos).

### **3.2.3 Tamizaje de sueros por test de neutralización por reducción de placas (PRNT) para SLEV, WNV, EEEV, WEEW, VEEV y RNV**

Para el tamizaje inicial de los sueros se siguió el protocolo de test de neutralización por reducción de placas (PRNT) de Early y cols., con modificaciones (Early y cols., 1967). En una placa de 96 pocillos estéril se mezclaron 60 µL de una dilución 1:5 de cada suero problema con 60 µL de una dilución del virus a ensayar (concentración: 100 unidades formadoras de placas-ufp), en la tabla 9 se indican los virus ensayados. Las mezclas de neutralización se incubaron una hora en estufa a 37°C. Luego se inocularon 100 µL de cada mezcla de neutralización en cada pocillo de una multi-placa (de 48 pocillos) de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano). Se incluyeron tres controles virales en cada multi-placa de células, de 50, 25 y 12 ufp. La multi-placa se incubó una hora en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, con agitación manual cada 15 minutos. A continuación se agregó a cada pocillo 0,5 mL de una mezcla de agarosa al 1% con MEM 2X (suplementado con 10% de suero fetal bovino-SFB, 1% Glutamina y 1% Gentamicina). Finalmente, se incubó la multi-placa en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, de 3 a 7 días dependiendo del virus (ver tabla 9).

Una vez cumplido el tiempo de incubación, el ensayo se detuvo con 0,5 mL de formol 10% por pocillo (90 minutos de incubación) y luego se lavaron las placas bajo agua corriente, se secaron y se tiñeron con cristal violeta 1% durante 10 minutos. Finalmente, se retira el cristal violeta bajo agua corriente, se secan las placas y se cuentan las placas a trasluz.

Se utilizó como punto de corte de positividad una reducción de más del 80% de las placas colocadas en la prueba (respecto a los controles virales).

**Tabla 9.** Virus ensayados por PRNT.

Virus	Incubación	Cepa	Cita
Virus de la encefalitis equina del este	3 días	Cor55	(Monath y cols., 1985)
Virus de la encefalitis equina del oeste	3 días	Cor87	(Monath y cols., 1985)
Virus de la encefalitis equina venezolana	3 días	TC-83	(Berge y cols., 1961)
Virus Pixuna	3 días	BeAr35645	(Shope y cols., 1964)
Virus Río Negro	3 días	AG80-663	(Mitchell y cols., 1985)
Virus de la encefalitis de San Luis	7 días	78V6507	(Mitchell y cols., 1985)
Virus West Nile**	4 días	E/7229/06	(Morales y cols., 2006)

\* Se realizó tamizaje para los virus de la encefalitis equina venezolana y Río Negro. El virus Pixuna se utilizó únicamente para la titulación en paralelo. \*\* Se realizó tamizaje solo en las muestras que presentaban reactividad en el tamizaje con SLEV.

### **3.2.4 Titulación de sueros por PRNT para SLEV, WNV, EEEV, WEEV, VEEV, RNV y PIXV.**

Se realizó la titulación de las muestras positivas en el tamizaje a diluciones seriadas desde 1:20 hasta 1:80. El procedimiento es el mismo que el descrito para el tamizaje. Los resultados se expresaron como el recíproco del título de anticuerpos. Se utilizó el mismo criterio de positividad que en el tamizaje.

Debido a la gran reactividad cruzada que presentan los flavivirus, se procedió del siguiente modo para la titulación, luego del tamizaje de todos los sueros para SLEV: un tercio de los sueros positivos en el tamizaje para SLEV fueron titulados para ambos flavivirus: SLEV y WNV a diluciones seriadas desde 1:20 hasta 1:80 y de 1:10 hasta 1:40, respectivamente (ensayos simultáneos). El resto de los sueros fueron tamizados para WNV a una dilución 1:10 y titulados para SLEV (1:20 hasta 1:80).

Las diferentes especies virales del complejo de VEE presentan reactividad cruzada, por esta razón los sueros positivos para una especie viral se titularon en paralelo contra otras circulantes en la región (VEEV, PIXV, RNV).

## **3.3 Estudio de un caso fatal de encefalitis viral**

### **3.3.1 Extracción de ARN**

En el marco de esta tesis se estudió un caso humano fatal de encefalitis de probable etiología viral. El mismo fue realizado en colaboración con el Departamento de Laboratorios del Ministerio de Salud Pública y el Servicio de Neuropediatría del Hospital Británico. Para ello se realizó extracción de ARN a partir de líquido cefalorraquídeo, suero y plasma del paciente, utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA), siguiendo el protocolo del fabricante.

### 3.3.2 RT-PCR para Flavivirus (*Flaviviridae*)

Se realizó una RT-PCR anidada genérica para Flavivirus que amplifica un fragmento de 143 pb del gen NS5, del mismo modo que en el apartado 3.1.3.2.1.

### 3.3.3 RT-PCR para Alphavirus (*Togaviridae*)

#### 3.3.3.1 RT-PCR genérica (fragmento de 195 pb del gen NSP4)

Se realizó una RT-PCR anidada genérica para Alphavirus que amplifica un fragmento de 195 pb del gen NSP4, del mismo modo que en el apartado 3.1.3.3. A continuación se realizó una RT-PCR semi-anidada, utilizando los oligonucleótidos Alpha 1+ y 2- (tabla 8), con el fin de obtener amplicones de mayor tamaño (372pb).

#### 3.3.3.2 RT-PCR multiplex (gen NSP1)

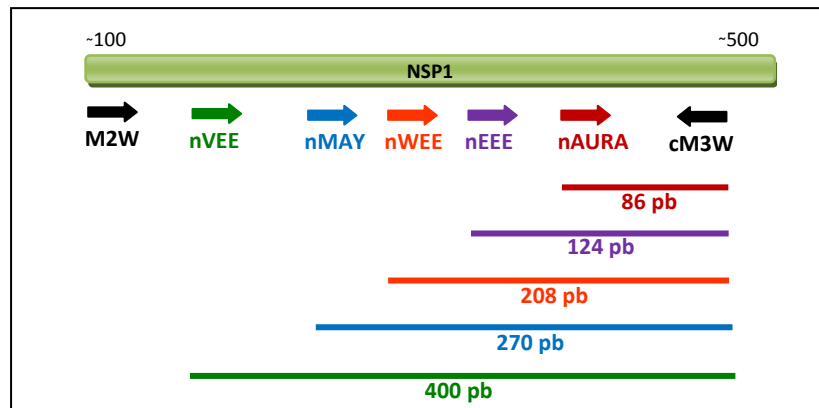
Se realizó una RT-PCR anidada multiplex que amplifica los siguientes alfavirus: virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, virus de la encefalitis equina venezolana, virus Aura y virus Mayaro, según Bronzoni y cols., 2004. En la tabla 10 se detallan los oligonucleótidos utilizados y en el esquema 4 se muestran los fragmentos que se obtiene utilizando los mismos.

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar una región del gen NSP1 de alphavirus.

Nombre	Posición*	Secuencia
cM3W	568-597	5'- ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC -3'
M2W	164-186	5'- YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW -3'
nVEE	197-217	5'- ACGGAGGTAGACCCATCCGA -3'
nEEE	374-489	5'- CCACGGTACCGTTGCC -3'
nWEE	389-408	5'- GGCGGCAGACCTGCTGGAA -3'
nAURA	511-529	5'- TCAATGCACCTTCGACCA -3'
nMAY	327-343	5'- GGAAGTTGGCCAAGGC -3'

\* Posición relativa a la secuencia de referencia de VEEV del GenBank (número de acceso NC\_001449)  
R=AG, Y=CT, K=GT, W=AT, S=CG, D=AGT, H=ACT, N=ACGT.

**Esquema 4.** Ubicación de los oligonucleótidos utilizados para diferentes regiones del gen NSP1 de alphavirus.



### 3.3.4 Secuenciación y análisis filogenético

Se realizó del mismo modo que en el apartado 3.1.5.

#### 4. RESULTADOS

---

## 4.1 Resultados obtenidos en mosquitos

### 4.1.1 Capturas de mosquitos

Se colectaron 3329 mosquitos (Diptera: Culicidae) en un total de 67 capturas, realizadas en los departamentos de Artigas, Canelones, Colonia, Montevideo, Paysandú, Río Negro, Rivera, Salto y Soriano. Los ejemplares pertenecen a 13 especies de los géneros *Stegomyia*, *Culex*, *Mansonia*, *Ochlerotatus* y *Psorophora*. La clasificación por captura, especie y sexo permitió agrupar a los ejemplares en un total de 244 pools (anexo 9.1)

De los 3329 individuos colectados, 3112 (93,5%) correspondieron a hembras y 217 (6,5%) a machos. La especie más abundante fue *Culex pipiens* (82,6%), seguido por *Ochlerotatus albifasciatus* (6,4%). Las especies *Stegomyia aegypti*, *Stegomyia fluviatillis*, *Culex bidens*, *Culex apicinus*, *Culex coronator*, *Culex dolosus*, *Mansonia titilans*, *Ochlerotatus scapularis*, *Ochlerotatus crinifer*, *Psorophora ferox* y *Psorophora ciliata* respresentaron el 1,7% de las especies en conjunto. Los individuos dañados (falta de caracteres taxonómicos) se clasificaron solo a nivel de género, representando el género *Culex* un 9,22% y el género *Psorophora* un 0,09%.

La distribución de mosquitos por departamento se presenta en la tabla 11 y a continuación se desglosan las capturas por departamento.

**Tabla 11.** Distribución de cantidad de mosquitos capturados por departamento.

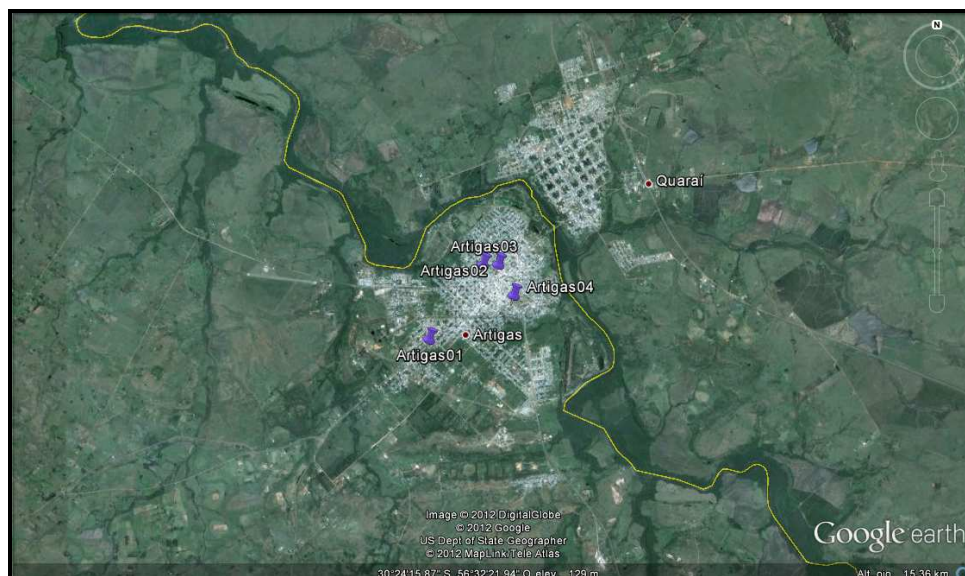
Departamento	Cantidad	%
Montevideo	1245	37,4
Salto	792	23,8
Artigas	370	11,1
Paysandú	365	11,0
Colonia	240	7,2
Canelones	170	5,1
Rivera	84	2,5
Soriano	45	1,4
Río Negro	18	0,5
Total	3329	100

En el departamento de Artigas se realizaron un total de 7 capturas entre los días 13 y 15 de mayo de 2010, en 4 sitios de la ciudad de Artigas (Artigas01 al 04, figura 8). Se colectaron 370 mosquitos, pertenecientes a las especies *Culex pipiens*, *Culex spp.* y *Ochlerotatus albifasciatus*, correspondiendo el 100% de los ejemplares a hembras (tabla 12). Los mismos se agruparon en 35 pools (ver anexo 9.1).



**Tabla 12.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Artigas.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	203	54,9
<i>Culex spp.</i>	162	43,8
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	5	1,4
Total	370	100

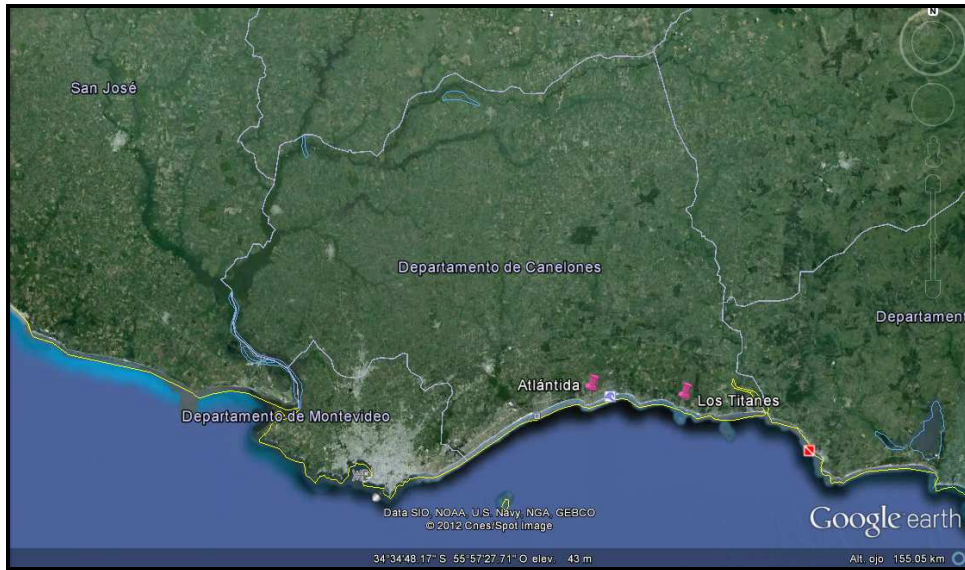


**Figura 8.** Mapa de la ciudad de Artigas indicando los sitios de captura de mosquitos (en color violeta).

En el departamento de Canelones se realizaron un total de 5 capturas, 3 de ellas en Atlántida (los días 20 de diciembre de 2009 y 9 y 10 de marzo de 2010) y 2 en Los Titanes (los días 30 de abril de 2009 y 17 de mayo de 2010) (figura 9). Se colectaron 170 mosquitos, pertenecientes a las especies *Culex pipiens*, *Culex spp.* y *Ochlerotatus albifasciatus*, correspondiendo el 99,4% de los ejemplares a hembras (tabla 13). Los mismos se agruparon en 16 *poles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 13.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Canelones.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	121	71,2
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	40	23,5
<i>Culex spp.</i>	6	3,5
<i>Culex bidens</i>	3	1,8
Total	170	100

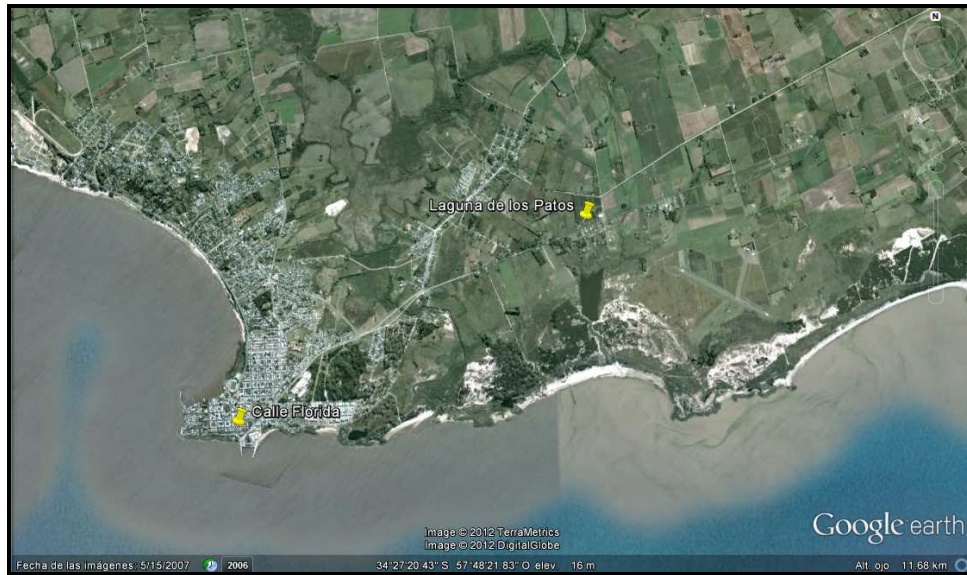


**Figura 9.** Mapa del departamento de Canelones indicando los sitios de captura de mosquitos (en color rosado).

En el departamento de Colonia se realizaron un total de 3 capturas, 1 de ellas en el centro de la ciudad (el 18 de marzo de 2011) y 2 en la Laguna de los Patos (a 7 km de la ciudad, los días 18 y 19 de marzo de 2011) (figura 10). Se colectaron 240 mosquitos, pertenecientes a las especies *Culex pipiens*, *Mansonia titillans*, *Ochlerotatus albifasciatus*, *Psorophora ferox* y *Psorophora spp.*, correspondiendo el 99,6% de los ejemplares a hembras (tabla 14). Los mismos se agruparon en 16 *pooles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 14.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Colonia.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	208	86,7
<i>Mansonia titillans</i>	24	10,0
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	4	1,7
<i>Psorophora ferox</i>	3	1,3
<i>Psorophora sp.</i>	1	0,4
Total	240	100

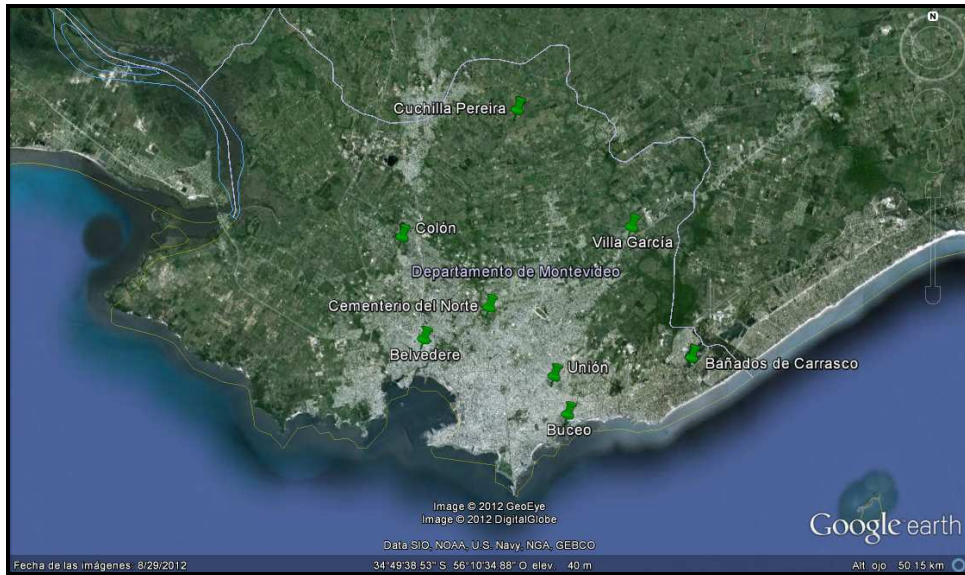


**Figura 10.** Mapa de la ciudad de Colonia y sus alrededores, indicando los sitios de captura de mosquitos (en color amarillo).

En el departamento de Montevideo se realizaron un total de 16 capturas: Bañados de Carrasco (3 capturas; 19-21 de marzo de 2009), Belvedere (6 capturas; 4-5 de mayo y 18 de diciembre de 2009, 25 de marzo de 2010 y 27 de abril de 2011), Buceo (1 captura, 19 de febrero de 2009), Cerrito (2 capturas, 13 y 19 de marzo de 2010), Colón (1 captura, 28 de abril de 2011), Cuchilla Pereyra (1 captura, 24 de marzo de 2009), Unión (2 capturas, 2 de enero y 18 de febrero de 2009) y Villa García (1 captura, 24 de marzo de 2010) (figura 11). Se colectaron 1245 mosquitos, pertenecientes a las especies *Culex dolosus*, *Culex pipiens*, *Culex spp.*, *Mansonia titillans*, *Ochlerotatus albifasciatus*, *Ochlerotatus crinifer* y *Ochlerotatus scapularis*, correspondiendo el 87,7% de los ejemplares a hembras (tabla 15). Los mismos se agruparon en 68 *pooles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 15.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Montevideo.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	1049	84,3
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	146	11,7
<i>Culex spp</i>	45	3,6
<i>Ochlerotatus crinifer</i>	2	0,2
<i>Culex dolosus</i>	1	0,1
<i>Mansonia titillans</i>	1	0,1
<i>Ochlerotatus scapularis</i>	1	0,1
Total	1245	100



**Figura 11.** Mapa del departamento de Montevideo indicando los sitios de captura de mosquitos (en color verde).

En el departamento de Paysandú se realizaron un total de 4 capturas, entre los días 3 y 6 de diciembre de 2009, en 3 sitios de la ciudad de Paysandú (Paysandú01 al 03, figura 12). Se colectaron 365 mosquitos, pertenecientes a las especies *Culex pipiens* y *Ochlerotatus albifasciatus*, correspondiendo el 98,1% de los ejemplares a hembras (tabla 16). Los mismos se agruparon en 24 *pooles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 16.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Paysandú.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	355	97,3
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	10	2,7
Total	365	100

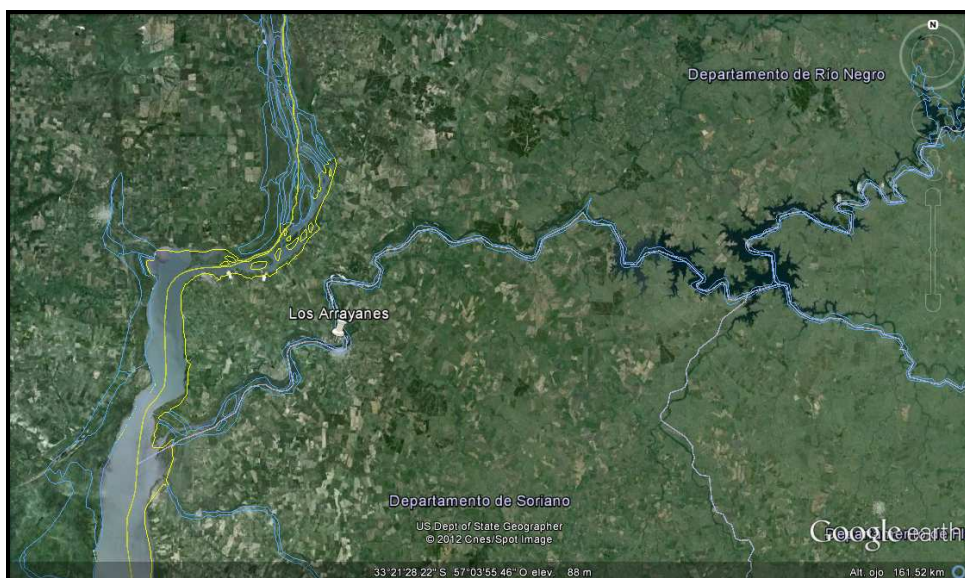


**Figura 12.** Mapa de la ciudad de Paysandú indicando los sitios de captura de mosquitos (en color azul).

En el departamento de Río Negro se realizó solamente una captura, en la zona de Los Arrayanes, frente a la ciudad de Mercedes (Soriano) el día 26 de febrero de 2011 (figura 13). Se colectaron 18 mosquitos agrupados en 2 *poles*, todos ellos hembras de la especie *Culex pipiens* (tabla 17, anexo 9.1).

**Tabla 17.** Captura en Los Arrayanes, departamento de Río Negro.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	18	100

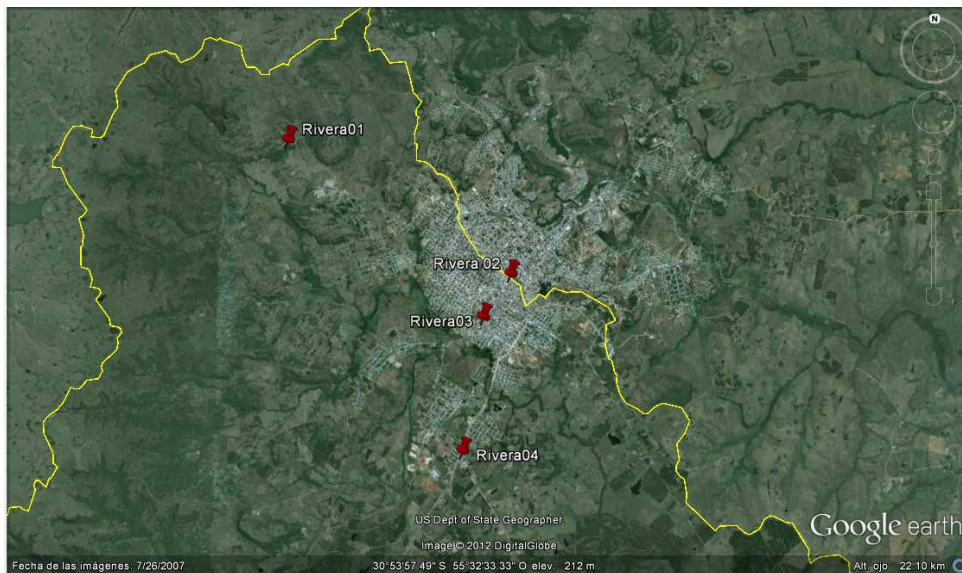


**Figura 13.** Mapa indicando el sitio de captura de mosquitos en Los Arrayanes, departamento de Río Negro (en color blanco).

En el departamento de Rivera se realizaron un total de 6 capturas, entre los días 15 y 16 de abril de 2009, en 4 sitios de la ciudad de Rivera (Rivera01 al 04, figura 14). Se colectaron 84 mosquitos, pertenecientes a las especies *Stegomyia fluviatillis*, *Culex pipiens* y *Culex spp.*, correspondiendo el 90,5% de los ejemplares a hembras (tabla 18). Los mismos se agruparon en 9 *pooles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 18.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en el departamento de Rivera.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex spp.</i>	63	75,0
<i>Culex pipiens</i>	20	23,8
<i>Stegomyia fluviatilis</i>	1	1,2
Total	84	100

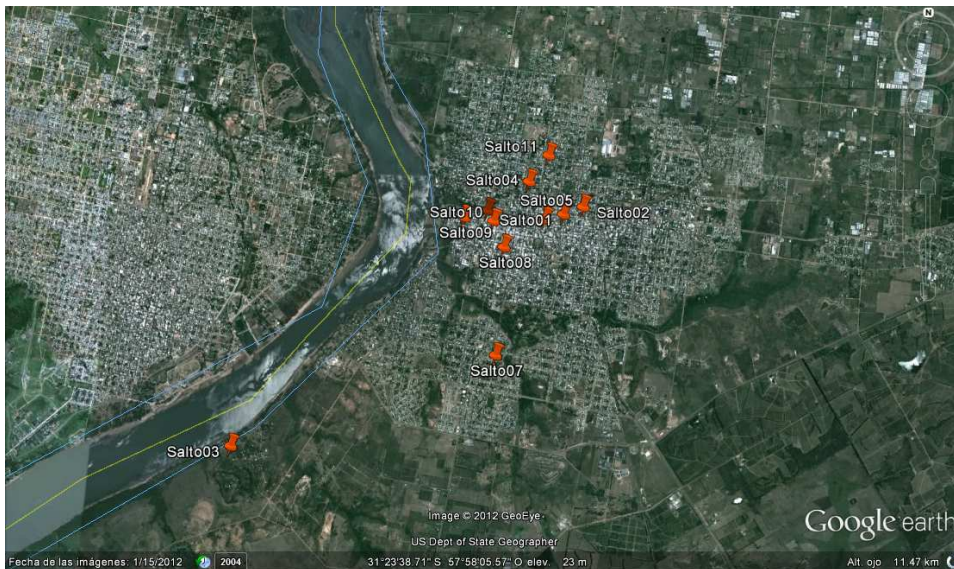


**Figura 14.** Mapa del norte del departamento de Rivera indicando los sitios de captura de mosquitos (en color rojo).

En el departamento de Salto se realizaron un total de 21 capturas, 2 capturas el 19 de febrero de 2009, 11 capturas los días 23 al 26 de noviembre de 2009, 4 capturas los días 6 y 7 de diciembre de 2010, 1 captura el 10 de diciembre de 2010 y 3 capturas los días 15 y 16 de abril de 2011, en 10 sitios de la ciudad de Salto (Salto01, Salto02 y Salto04 al 11, figura 15) y un sitio (Salto03) fuera de la misma. Se colectaron 792 mosquitos, pertenecientes a las especies *Stegomyia aegyptis*, *Culex apicinus*, *Culex coronator*, *Culex pipiens*, *Culex spp.*, *Ochlerotatus albifasciatus*, *Ochlerotatus scapularis*, *Psorophora scapularis*, *Psorophora ciliata* y *Psorophora spp.*, correspondiendo el 94,7% de los ejemplares a hembras (tabla 19). Los mismos se agruparon en 66 *pooles* (ver anexo 9.1).

**Tabla 19.** Distribución por especie de los mosquitos capturados en la ciudad de Salto.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	732	92,4
<i>Culex spp</i>	31	3,9
<i>Stegomyia aegypti</i>	11	1,4
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	7	0,9
<i>Ochlerotatus scapularis</i>	5	0,6
<i>Psorophora ciliata</i>	2	0,3
<i>Psorophora sp.</i>	2	0,3
<i>Culex apicinus</i>	1	0,1
<i>Culex coronator</i>	1	0,1
Total	792	100

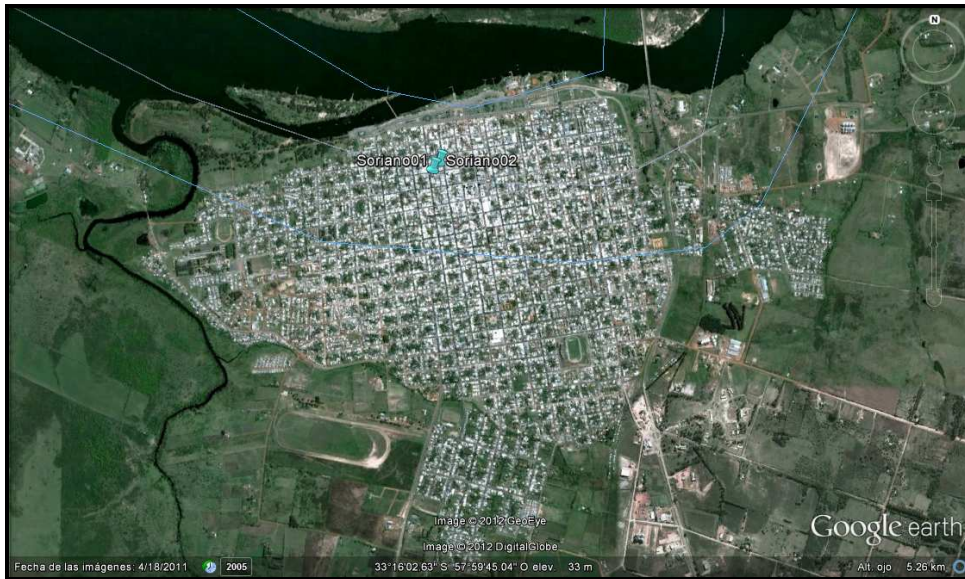


**Figura 15.** Mapa de la ciudad de Salto y cercanías indicando los sitios de captura de mosquitos (en color naranja).

En el departamento de Soriano se realizaron un total de 3 capturas, entre los días 25 y 27 de febrero de 2011, en 2 sitios de la ciudad de Mercedes (Soriano01 y Soriano02, figura 16). Se colectaron 45 mosquitos agrupados en 8 *pooles*, todos ellos de la especie *Culex pipiens*, correspondiendo el 88,9% de los ejemplares a hembras (tabla 20, anexo 9.1).

**Tabla 20.** Captura en Mercedes, departamento de Soriano.

Especie	Cantidad	%
<i>Culex pipiens</i>	45	100



**Figura 16.** Mapa de la ciudad de Mercedes (Soriano), indicando los sitios de captura de mosquitos (en color celeste).

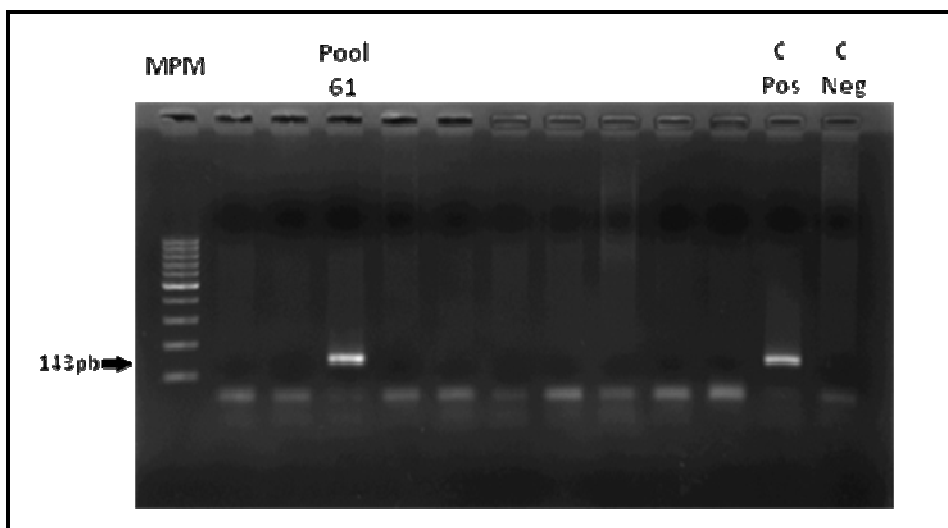
#### 4.1.2 Detección de Flavivirus en mosquitos

Se extrajo el ARN total de los 244 pooles de mosquitos y se sometieron a RT-PCR anidada genérica para flavivirus que amplifica un fragmento de 143 pb del gen NS5 (Sanchez-Seco y cols., 2005). Se obtuvieron 5 pooles positivos (tabla 21). En la figura 17 se observa una fotografía de gel de agarosa mostrando la detección de flavivirus en el pool 61 mediante la RT-PCR anidada genérica para flavivirus.

**Tabla 21.** Pooles de mosquitos positivos para Flavivirus.

Pool	Departamento	Sitio	Tipo	Fecha	Especie	Sexo	Cantidad
61	Salto	Salto02	luz + CO <sub>2</sub>	23/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	3
77	Salto	Salto02	luz + CO <sub>2</sub>	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	12
102	Paysandú	Paysandú01	luz + CO <sub>2</sub>	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2
120	Montevideo	Barrio Cerrito	manual	13/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	4
131	Montevideo	Barrio Villa García	luz + CO <sub>2</sub>	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	17



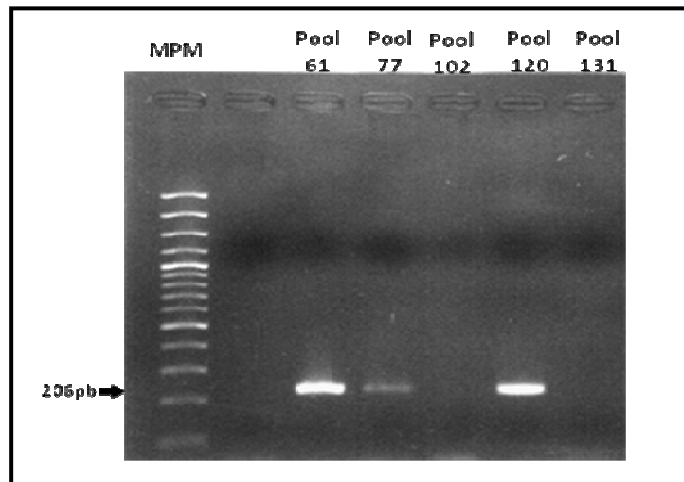


**Figura 17.** Amplicones obtenidos a partir de pooles de mosquitos utilizando la RT-PCR anidada genérica para Flavivirus, obteniéndose un fragmento de 143pb (Sanchez-Seco y cols., 2005). Se muestra a modo de ejemplo la detección del pool 61, proveniente de Salto. MPM: marcador de peso molecular de 100 a 1000pb; C Pos: control positivo, ARN extraído a partir de cultivo celular infectado con SLEV; C Neg: control negativo, agua libre de ARNasas.

Los productos amplificados se purificaron y secuenciaron automáticamente, y las secuencias obtenidas se compararon entre sí y con la base de datos GenBank (blastn). Debido a que las bandas observadas en los pooles 77 y 102 eran muy tenues y las secuencias obtenidas poco claras, se procedió a clonar el fragmento de 143pb en CloneJet PCR Cloning Kit (Fermentas, Thermo Scientific). Luego de la digestión, los insertos se secuenciaron automáticamente, utilizando los oligonucleótidos del kit.

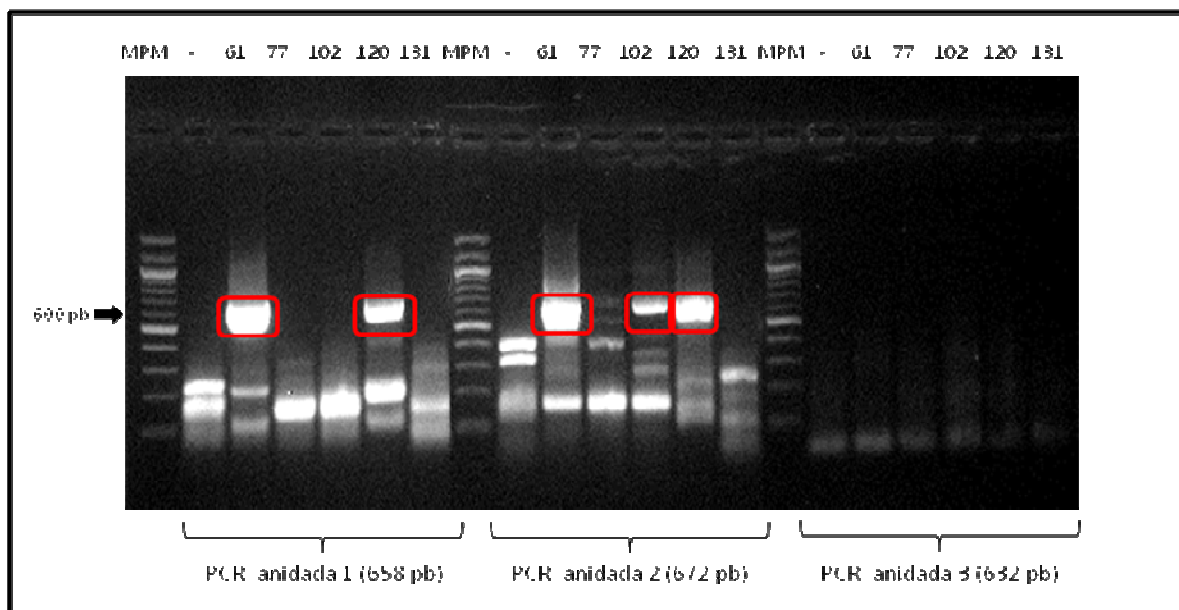
A continuación se realizaron intentos de amplificación de regiones más amplias del gen NS5, utilizando la “RT-PCR semi-anidada genérica, gen NS5 (fragmento de 262pb)”, y también del gen NS3 utilizando la “RT-PCR genérica, gen NS3” (Hoshino y cols., 2007), sin lograr obtener amplificación de ninguno de los 5 pooles de mosquitos positivos para flavivirus.

Posteriormente se realizó RT-PCR anidada para Culex Flavivirus (CxFV) (Newman y cols., 2011), mediante la cual se logró amplificar un fragmento del gen NS5 de 206pb a partir de los pooles 61, 77 y 120 (figura 18).



**Figura 18.** Amplicones obtenidos a partir de pooles de mosquitos utilizando la RT-PCR anidada para *Culex Flavivirus* (Newman y cols., 2011), obteniéndose un fragmento de 206pb. MPM: marcador de peso molecular de 100 a 3000pb.

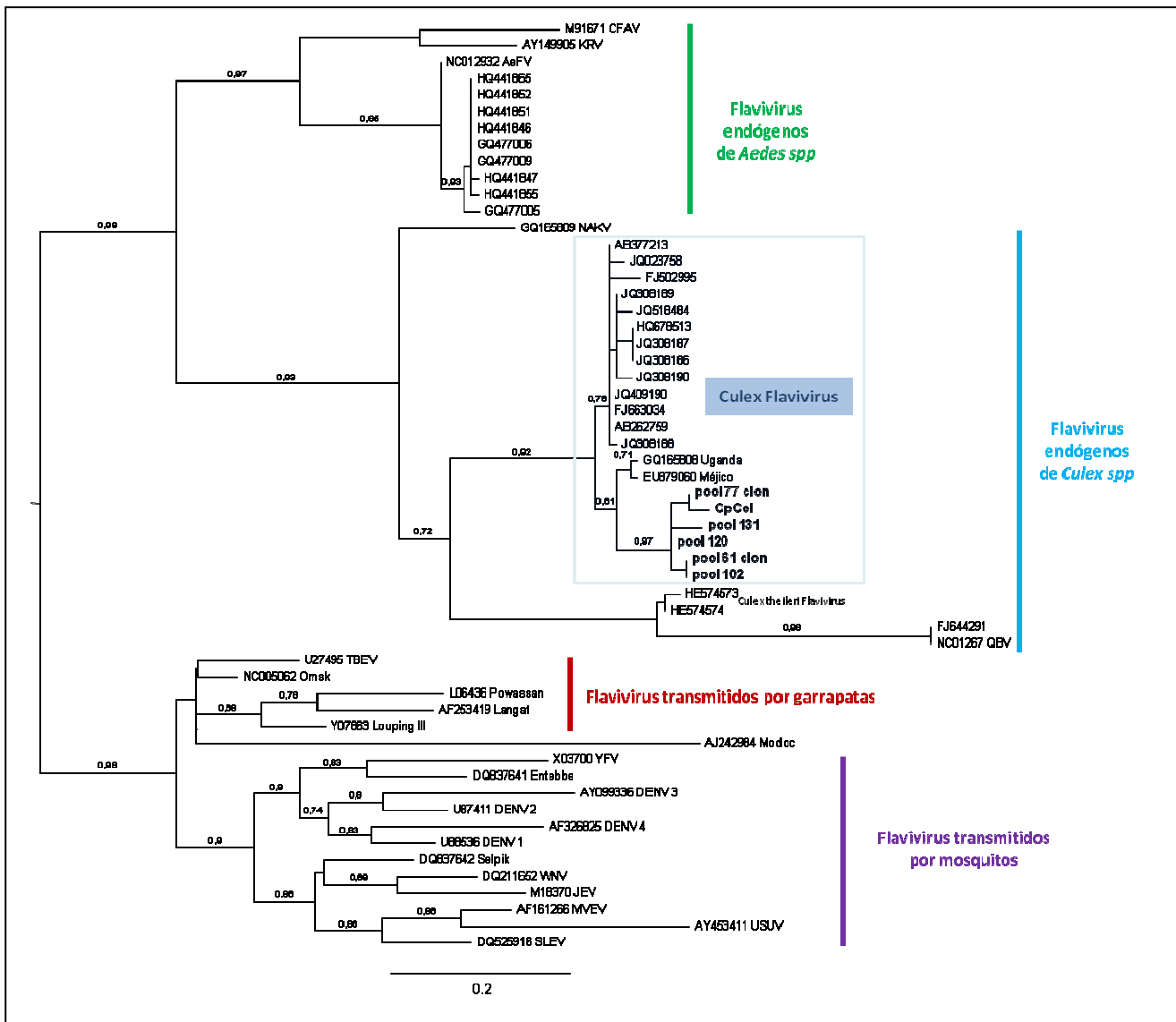
Utilizando tres RT-PCRs anidadas que se solapan para amplificar 1934 pares de bases del gen NS5 (Newman y cols., 2011), se logró amplificar alguno de los fragmentos para los pooles 61, 102 y 120, recuadros en color rojo en la figura 19). En el caso del pool 61 se logró amplificar fragmento del tamaño esperado con las dos primeras RT-PCR anidadas. Para el pool 102 se observó amplicón para la PCR anidada 2. Se observaron amplicones del tamaño esperado para el pool 120 en las PCRs anidada 1 y 2. Para el resto de los pooles no logró amplificar.



**Figura 19.** Amplicones obtenidos a partir de pooles de mosquitos utilizando las RT-PCRs anidadas que amplifican 1330 pares de bases de NS5 (Newman y cols., 2011). MPM: marcador de peso molecular de 100 a 1517pb. Los fragmentos de peso molecular esperado están marcados en rojo.

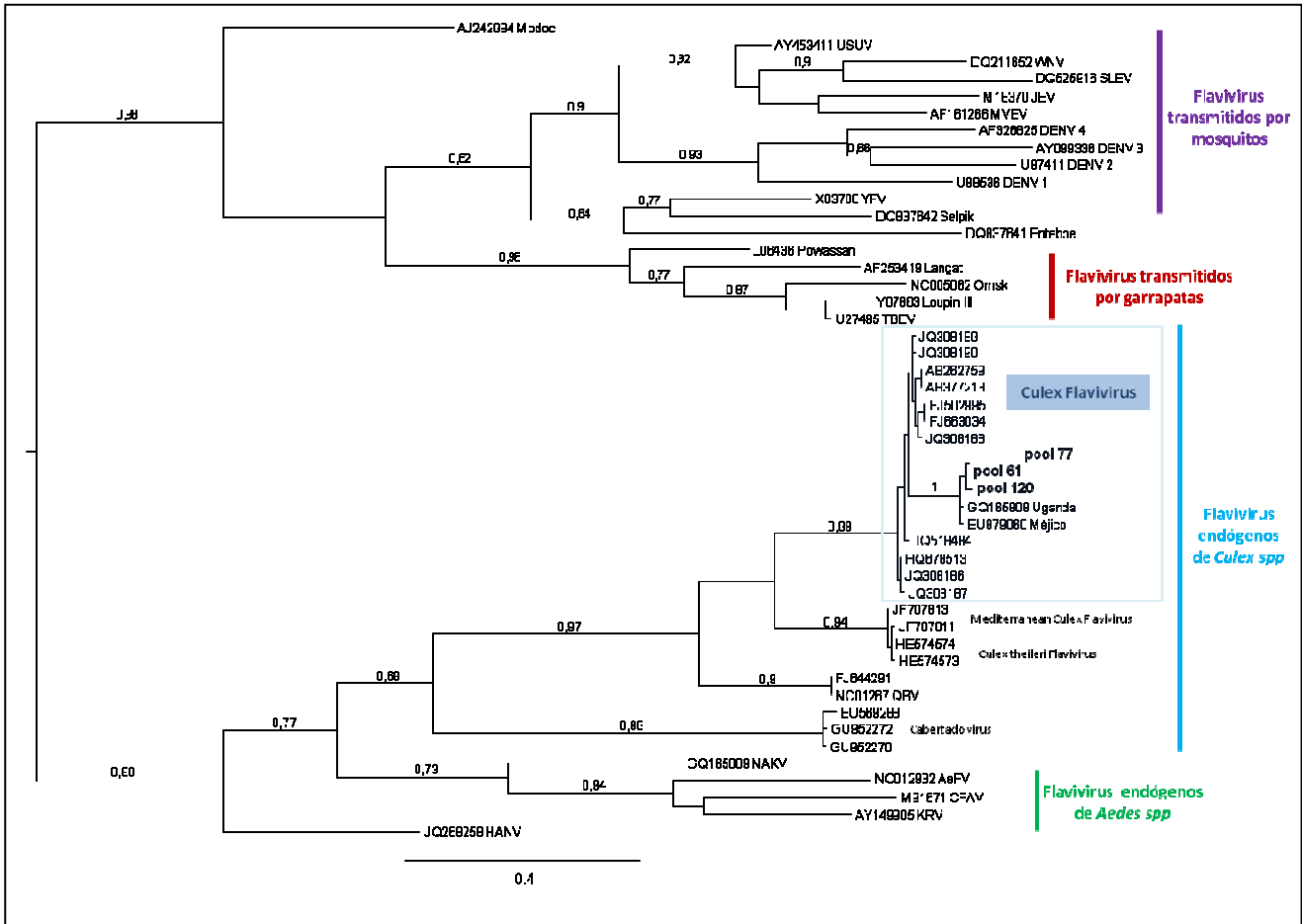
### 4.1.3 Comparación de secuencias y análisis filogenético.

El análisis filogenético por máxima verosimilitud de las secuencias obtenidas a partir de la RT-PCR anidada genérica para Flavivirus (NS5, 143pb) (Sanchez-Seco y cols., 2005) reveló que las muestras positivas forman un grupo monofilético con los Culex Flavivirus (CxFV) (aLRT=0,92) (figura 20). A su vez, las secuencias de Uruguay forman un grupo monofilético (aLRT=0,97) y se encuentran emparentadas con CxV reportados en Méjico (EU879060) y Uganda (GQ165808) (aLRT=0,61).



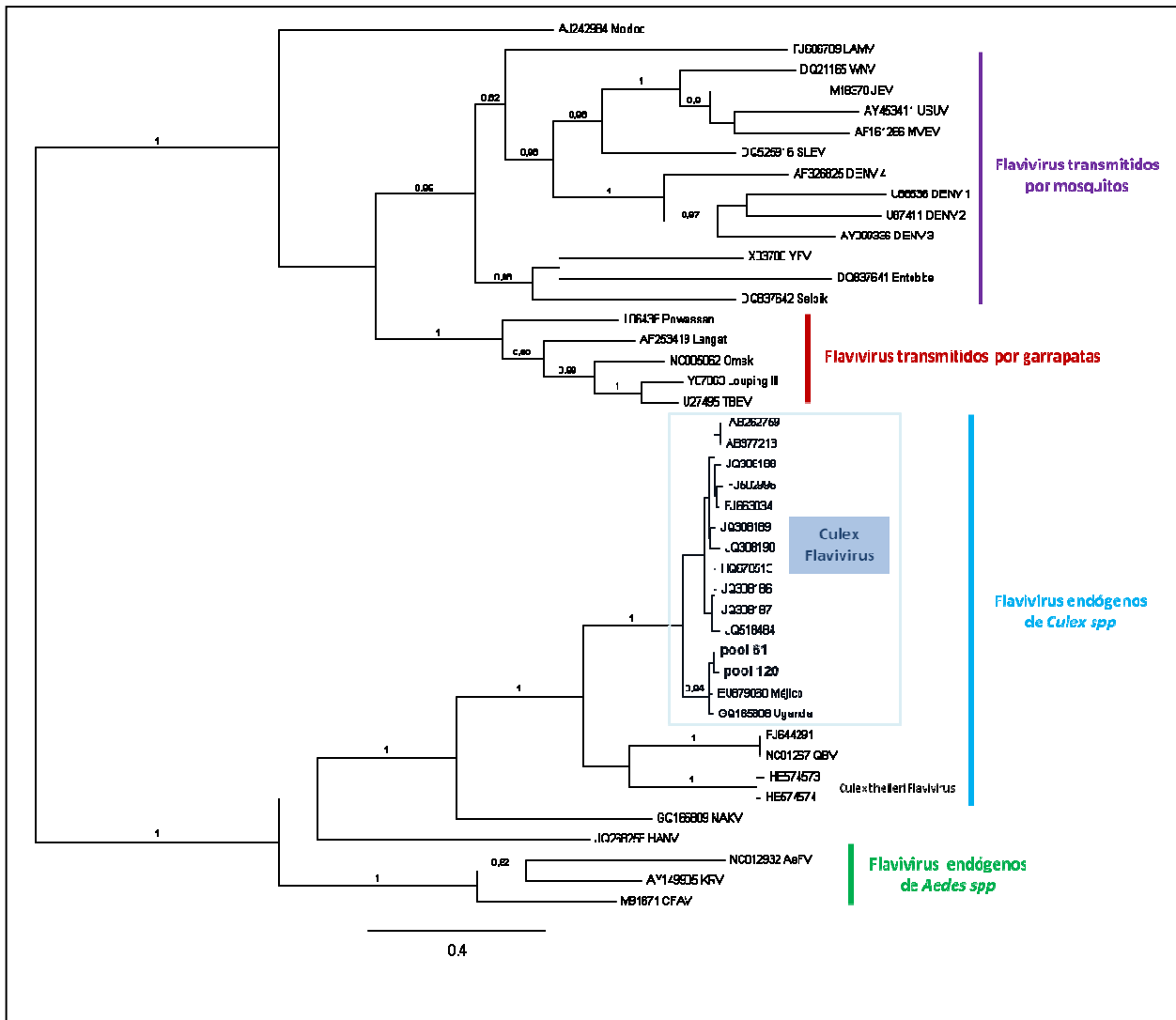
**Figura 20.** Filogenia de flavivirus obtenida por el método Maximun Likelihood, el análisis se realizó comparando 137 nucleótidos de una región del gen que codifica NS5. El modelo de sustitución de nucleótidos, estimado utilizando Modelgenerator fue: Tamura-Nei + I + G ( $\pi=0,23$ ;  $\gamma=0,42$ ). Se muestran los números de acceso del Genbank y valores de aLRT mayores a 0,60. Se incluyen las secuencias correspondientes a los pooles 61 (clonado en CloneJet), 77 (clonado en CloneJet), 102, 120 y 131 (en negrita). Abreviaturas: CpCol (Burgueño A, 2007), CxFV: Culex flavivirus; CFAV: Cell fusing agent; DEN1, DEN2, DEN3, DEN4: virus Dengue subtipos 1 al 4; JEV: Japanesse encephalitis virus; KRV: Kamiti river virus; MVEV: Murray Valley virus; QBV: Quang Binh virus; SLEV: Saint Louis encephalitis virus; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; USUV: Usutu virus; WNV: West Nile virus.

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de la RT-PCR anidada para CxFV (NS5) (Newman y cols., 2011) de los pooles 61, 77 y 120 de 206 pb coincidió con el mostrado en la figura 19. Nuevamente las muestras de Uruguay forman un grupo monofilético con los CxFV, con un soporte aLRT de 0,98. De igual forma, aparecen estrechamente relacionadas con los CxFV de Méjico (EU879060) y Uganda (GQ165808), con un soporte altamente significativo (aLRT=1,00) (figura21).



**Figura 21.** Filogenia de flavivirus obtenida por el método de Maxima Verosimilitud; el análisis se realizó comparando 206 nucleótidos de una región del gen que codifica NS5. El modelo de sustitución de nucleótidos, estimado utilizando Modelgenerator fue: Tamura-Nei + I + G (pI=0,15;  $\gamma$ =0,90). Se muestran los números de acceso del Genbank y valores de aLRT mayores a 0,60. Se incluyen las secuencias correspondientes a los pooles 61, 77 y 120 (en negrita). Abreviaturas: CxFV: Culex flavivirus; CFAV: Cell fusing agent; DEN1, DEN2, DEN3, DEN4: virus Dengue subtipos 1 al 4; JEV: Japanese encephalitis virus; KRV: Kamiti river virus; MVEV: Murray Valley virus; QBV: Quang Binh virus; SLEV: Saint Louis encephalitis virus; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; USUV: Usutu virus; WNV: West Nile virus.

Finalmente, se realizó el análisis de las secuencias de los pooles 61 y 120 correspondientes al segmento de 1308 nucleótidos (PCRs anidadas 1 y 2, descritas en el ítem 3.1.3.2.4 de Materiales y Métodos) (Newman y cols., 2011). La secuencia obtenida del pool 102 no se incluyó en el análisis debido a que no era de buena calidad. En la figura 22 se observa el árbol filogenético obtenido, resultado de concatenar las secuencias de las dos RT-PCRs anidadas.



**Figura 22.** Filogenia de flavivirus obtenida por el método Máxima Verosimilitud; el análisis se realizó comparando 1308 nucleótidos del gen que codifica NS5. El modelo de sustitución de nucleótidos, estimado utilizando Modelgenerator fue: General Time Reversible + I + G ( $\pi=0,19$ ;  $\gamma=0,86$ ). Se muestran los números de acceso del Genbank y valores de aLRT mayores a 0,60. Se incluyen las secuencias correspondientes a los pools 61 y 120 (en negrita). Abreviaturas: CxFV: Culex flavivirus; CFAV: Cell fusing agent; DEN1, DEN2, DEN3, DEN4: virus Dengue subtipos 1 al 4; JEV: Japanese encephalitis virus; KRV: Kamiti river virus; MVEV: Murray Valley virus; QBV: Quang Binh virus; SLEV: Saint Louis encephalitis virus; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; USUV: Usutu virus; WNV: West Nile virus.

La filogenia construida a partir de secuencias de 1308 nucleótidos del gen NS5 obtenidas de los pools 61 y 120 (figura 22) es consistente en su topología con las presentadas en las figuras 19 y 20. En este caso los grupos de interés presentan mejor soporte estadístico, debido a que fue posible analizar una región genómica mayor. El árbol filogenético muestra a los flavivirus identificados en Uruguay como parte del clado CxFV, con aLRT=1,00; y formando parte a su vez de un subclado junto con CxFV provenientes de Méjico (EU879060) y Uganda (GQ165808). Este último grupo posee un soporte de aLRT=0,94.

## 4.2 Resultados obtenidos en equinos

### 4.2.1 Tamizaje y titulación de sueros para Flavivirus

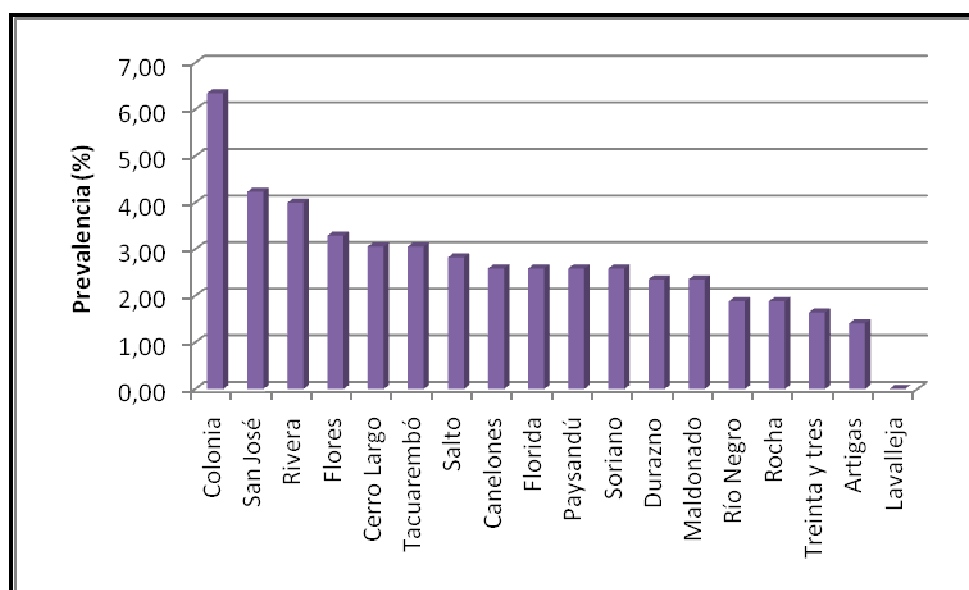
De los 425 sueros de equinos procesados, 207 presentaron anticuerpos neutralizantes en el tamizaje para SLEV (48,7%) y 8 presentaron anticuerpos neutralizantes para WNV (1,88%) (ver anexo 9.2). En la tabla 22 se presentan los resultados del tamizaje para SLEV, agrupados por departamento.

**Tabla 22.** Resultados del tamizaje de flavivirus en sueros de equinos.

Departamento	Nº muestras procesadas	SLEV		WNV	
		Nº positivos	% sobre el total	Nº positivos	% sobre el total
Artigas	20	6	1,41	0	0,00
Canelones	15	11	2,59	2	0,47
Cerro Largo	32	13	3,06	0	0,00
Colonia	39	27	6,35	1	0,24
Durazno	15	10	2,35	0	0,00
Flores	27	14	3,29	0	0,00
Florida	21	11	2,59	1	0,24
Lavalleja	20	0	0,00	0	0,00
Maldonado	21	10	2,35	0	0,00
Paysandú	20	11	2,59	1	0,24
Río Negro	23	8	1,88	0	0,00
Rivera	43	17	4,00	0	0,00
Rocha	22	8	1,88	0	0,00
Salto	22	12	2,82	1	0,24
San José	24	18	4,24	0	0,00
Soriano	23	11	2,59	1	0,24
Tacuarembó	28	13	3,06	0	0,00
Treinta y tres	10	7	1,65	1	0,24
Total	425	207	48,71	8*	1,88

\* Las 8 muestras positivas para WNV corresponden también a muestras positivas en el tamizaje de SLEV.

Colonia fue el departamento que presentó mayor prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-SLEV, con un 6,35%, seguido por San José (4,24%), Rivera (4,00%), Flores (3,29%), Tacuarembó (3,06%) y Cerro Largo (3,06%) (figura 23). El resto de los departamentos presentaron prevalencias menores al 3%. Es de notar que no se detectaron anticuerpos anti-SLEV en ninguno de los 20 sueros pertenecientes al departamento de Lavalleja.



**Figura 23.** Distribución de prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-SLEV por departamento.

A continuación, se procedió a la titulación, para ello, un tercio de las muestras positivas en el tamizaje inicial a una dilución 1:10 para SLEV fueron tituladas en paralelo para SLEV y WNV, no se obtuvo ninguna muestra positiva para WNV. A continuación se cambió la estrategia y se decidió procesar los dos tercios restantes del siguiente modo: tamizaje para WNV 1:10 y titulación para SLEV de 1:20 hasta 1:80. El resultado de la titulación para SLEV fue el siguiente: el 61,3% (127 muestras) presentó un título de anticuerpos de 1:10; el 15,5% (32 muestras) presentó un título de 1:80; el 12,1% (25 muestras) presentó un título de 1:20; el 9,2% (19 muestras) presentó un título de 1:40 y un 1,9% (4 muestras) presentó un título de anticuerpos mayor a 1:80. Se obtuvieron 8 muestras positivas en el tamizaje para WNV. Con el fin de corroborar este resultado, y considerando la gran reactividad antigénica cruzada de los flavivirus SLEV y WNV (ambos pertenecientes al serogrupo de la encefalitis japonesa), se titularon las 8 muestras en ensayo simultáneo para ambos virus, los resultados se presentan en la tabla 23. De acuerdo al criterio del CDC para la identificación por PRNT del agente etiológico, la muestra en cuestión debe presentar un título 4 veces mayor que el otro virus al cual se la enfrenta, para ser considerada positiva. Por esta razón se considera que 6 de las 8 muestras son reactivas para SLEV y las dos restantes se clasifican como inconclusas para flavivirus. Resultando una prevalencia general para SLEV de 50,1% (213/425) y 0% para WNV.

**Tabla 23.** Resultado de la titulación simultánea SLEV/WNV para los 8 sueros problema.

Nº	Suero		Título de anticuerpos		Resultado
	Procedencia	SLEV	WNV		
E07/204	Salto	1/10	1/20	Inconclusa	
E07/210	Canelones	1/80	1/10	SLEV	
E07/211	Colonia	1/40	1/10	SLEV	
E07/245	Paysandú	1/80	1/10	SLEV	
E07/274	Florida	1/10	1/10	Inconclusa	
E07/287	Canelones	1/80	1/10	SLEV	
E07/408	Soriano	1/80	1/20	SLEV	
E07/421	Treinta y Tres	1/40	1/10	SLEV	

#### 4.2.2 Tamizaje y titulación de sueros para Alphavirus

Los 425 sueros de equinos pertenecientes a 18 departamentos del país se procesaron también para la búsqueda de anticuerpos neutralizantes para los siguientes alphavirus: virus de la encefalitis equina del este (EEEV), virus de la encefalitis equina del oeste (WEEV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y virus Río Negro (RNV).

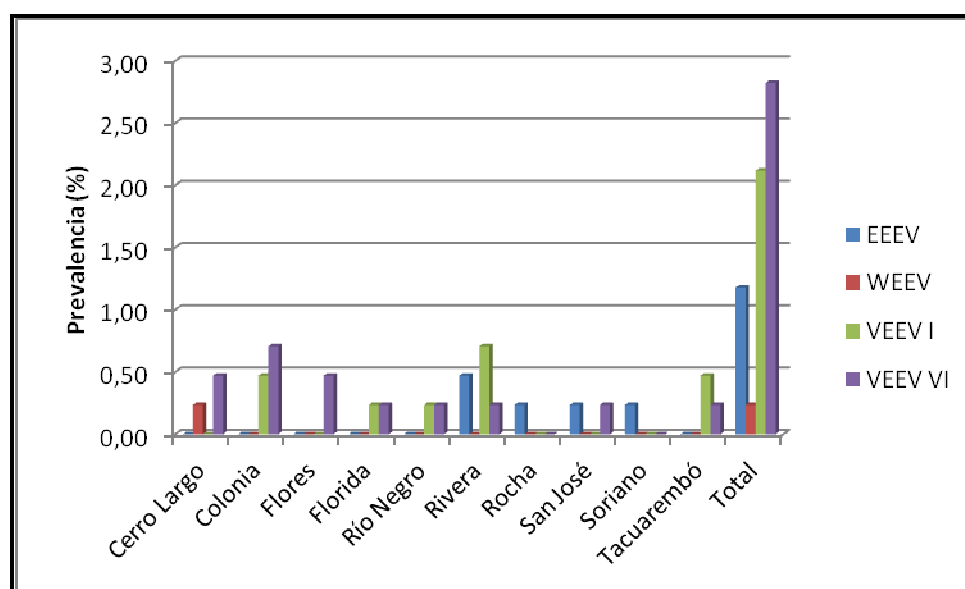
En la tabla 24 se presentan los resultados del tamizaje para los alphavirus ensayados agrupados por departamento. Se obtuvieron 5 sueros positivos para EEEV que representa una prevalencia general de 1,18%, pertenecientes a los departamentos de Rivera, Rocha, San José y Soriano. Mientras que para el tamizaje de WEEV se obtuvo un suero positivo (prevalencia general de 0,23%), perteneciente a un equino del departamento de Cerro Largo. Se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-VEEV en 9 sueros (prevalencia general: 2,12%), pertenecientes a los departamentos de Colonia, Florida, Río Negro, Rivera y Tacuarembó. Mientras que para RNV se detectaron 25 sueros con anticuerpos neutralizantes (prevalencia general: 5,88%), de los siguientes departamentos: Cerro Largo, Colonia, Flores, Florida, Lavalleja, Maldonado, Paysandú, Río Negro, Rivera, San José y Tacuarembó.



**Tabla 23.** Muestras positivas en el tamizaje para alphavirus, discriminadas por departamento.

Departamento	Nº muestras procesadas	EEEV		WEEV		VEEV		RNV	
		Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%
Artigas	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Canelones	15	0	0	0	0	0	0	0	0
Cerro Largo	32	0	0	1	0,23	0	0	2	0,47
Colonia	39	0	0	0	0	2	0,47	3	0,71
Durazno	15	0	0	0	0	0	0	0	0
Flores	27	0	0	0	0	0	0	2	0,47
Florida	21	0	0	0	0	1	0,23	1	0,23
Lavalleja	20	0	0	0	0	0	0	4	0,94
Maldonado	21	0	0	0	0	0	0	2	0,47
Paysandú	20	0	0	0	0	0	0	2	0,47
Río Negro	23	0	0	0	0	1*	0,23	4*	0,94
Rivera	43	2	0,47	0	0	3	0,71	2	0,47
Rocha	22	1	0,23	0	0	0	0	0	0
Salto	22	0	0	0	0	0	0	0	0
San José	24	1	0,23	0	0	0	0	1	0,23
Soriano	23	1	0,23	0	0	0	0	0	0
Tacuarembó	28	0	0	0	0	2	0,47	2	0,47
Treinta y tres	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>425</b>	<b>5</b>	<b>1,18</b>	<b>1</b>	<b>0,23</b>	<b>9</b>	<b>2,12</b>	<b>25</b>	<b>5,88</b>

\*: Corresponden a la misma muestra.



**Figura 24.** Distribución de prevalencia de anticuerpos neutralizantes para los alphavirus ensayados, por departamento.

Todos los sueros positivos en el tamizaje a una dilución 1:10 fueron posteriormente titulados para las siguientes diluciones: 1:20, 1:40 y 1:80. Los sueros positivos para EEEV mantuvieron su positividad únicamente a dilución 1:10. La muestra positiva para WEEV presentó un título de anticuerpos neutralizantes de 1:80. Las muestras positivas para ambos subtipos de VEEV fueron tituladas en simultáneo para los subtipos I, IV y VI. La inclusión del subtipo IV en la titulación se debe a la reciente evidencia de circulación del mismo en Argentina. Los resultados de la titulación en paralelo para los tres virus del complejo VEEV fueron los siguientes: 9 muestras positivas para VEEV I (prevalencia: 2,12%), con títulos de 1:10 a 1:80; 1 muestra positiva para PIXV (prevalencia: 0,23%), con título 1:40, 18 muestras positivas para RNV (prevalencia: 4,23%), con título de 1:10 a 1:80 y 3 muestras inconclusas (ver tabla 24).

**Tabla 24.** Resultado de la titulación simultánea VEEV/RNV/PIXV.

Nº	Suero Procedencia	Título de anticuerpos			Resultado
		VEEV	RNV	PIXV	
E07/009	Tacuarembó	1:10	-	-	VEEV
E07/022	Florida	1:10	-	-	VEEV
E07/037	Cerro Largo	-	1:10	-	RNV
E07/038	Cerro Largo	-	1:10	1:40	PIXV
E07/047	Rivera	1:10	-	-	VEEV
E07/048	Rivera	1:10	NR	NR	Inconclusa
E07/064	Flores	-	1:10	-	RNV
E07/073	Rivera	1:10	-	-	VEEV
E07/081	Tacuarembó	-	1:10	-	RNV
E07/085	Colonia	1:20	-	-	VEEV
E07/086	Colonia	1:10	-	-	VEEV
E07/104	Colonia	-	1:10	1:10	Inconclusa
E07/107	Florida	-	1:10	1:20	Inconclusa
E07/131	Flores	-	1:10	-	RNV
E07/187	Colonia	-	1:20	-	RNV
E07/188	Colonia	-	1:160	-	RNV
E07/220	Rivera	-	1:10	-	RNV
E07/230	Tacuarembó	-	1:10	-	RNV
E07/247	Río Negro	1:80	-	-	VEEV
E07/255	San José	-	1:10	-	RNV
E07/258	Tacuarembó	1:80	-	-	VEEV
E07/333	Lavalleja	-	1:10	-	RNV
E07/334	Lavalleja	-	1:10	-	RNV
E07/335	Lavalleja	-	1:10	-	RNV
E07/336	Lavalleja	-	1:10	-	RNV
E07/350	Maldonado	-	1:10	-	RNV
E07/353	Maldonado	-	1:10	-	RNV
E07/360	Paysandú	-	1:10	-	RNV
E07/362	Paysandú	-	1:10	-	RNV
E07/369	Río Negro	1:40	1:10	-	VEEV
E07/374	Río Negro	-	1:10	-	RNV

-: Negativo; NR: no se realiza.

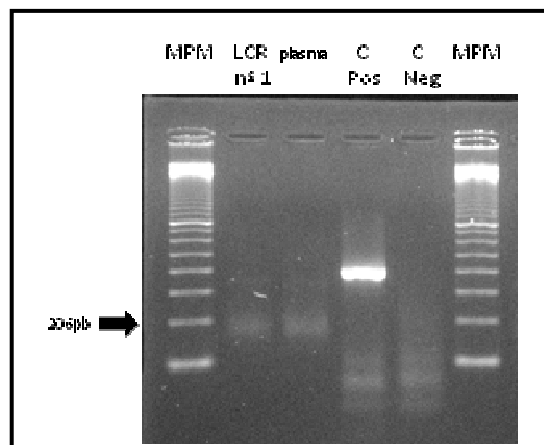
#### 4.3 Estudio de un caso fatal de encefalitis viral.

A través de un estudio colaborativo con el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) del Ministerio de Salud Pública y el Servicio de Neuropediatría del Hospital Británico (Montevideo), se analizaron dos muestras de líquido cefalorraquídeo y una de plasma de un caso fatal de encefalitis viral en abril de 2009 (ver anexo 9.3). Las muestras pertenecían a un varón de 14 años de edad presentando originalmente fiebre, astenia y dolores de cabeza, sin signos neurológicos (tomografía computarizada de cerebro normal). Posteriormente, comenzó la sintomatología neurológica (depresión de conciencia, hiperreflexia y signo de Babinski bilateral) y se realizó punción lumbar para obtención de líquido céfalo raquídeo (LCR). La primer muestra de LCR (LCR nº 1) fue sometida a estudios bacteriológicos, con resultados negativos. Ya en cuidados intensivos se diagnosticó clínicamente como encefalitis viral. En las posteriores 24-36 hs continuó empeorando (hipertensión intracraneal, depresión de conciencia a nivel más profundo, coma profundo) y al tercer día de internación falleció. Se extrajo nueva muestra de LCR (LCR nº 2) y sangre post-mortem.

Las tres muestras obtenidas del paciente (LCR nº 1, LCR nº 2 y plasma) fueron analizadas en el DLSP para la búsqueda de anticuerpos anti dengue y WNV utilizando ELISAs comerciales (Focus Technologies), MAC-ELISA para detección de IgM anti SLEV y dengue (Martin y cols., 2000). Las muestras de plasma y LCR fueron procesadas para extracción de ARN y analizadas por RT-PCR genérica anidada para Flavivirus, (Sanchez-Seco y cols., 2005), obteniéndose resultados negativos.

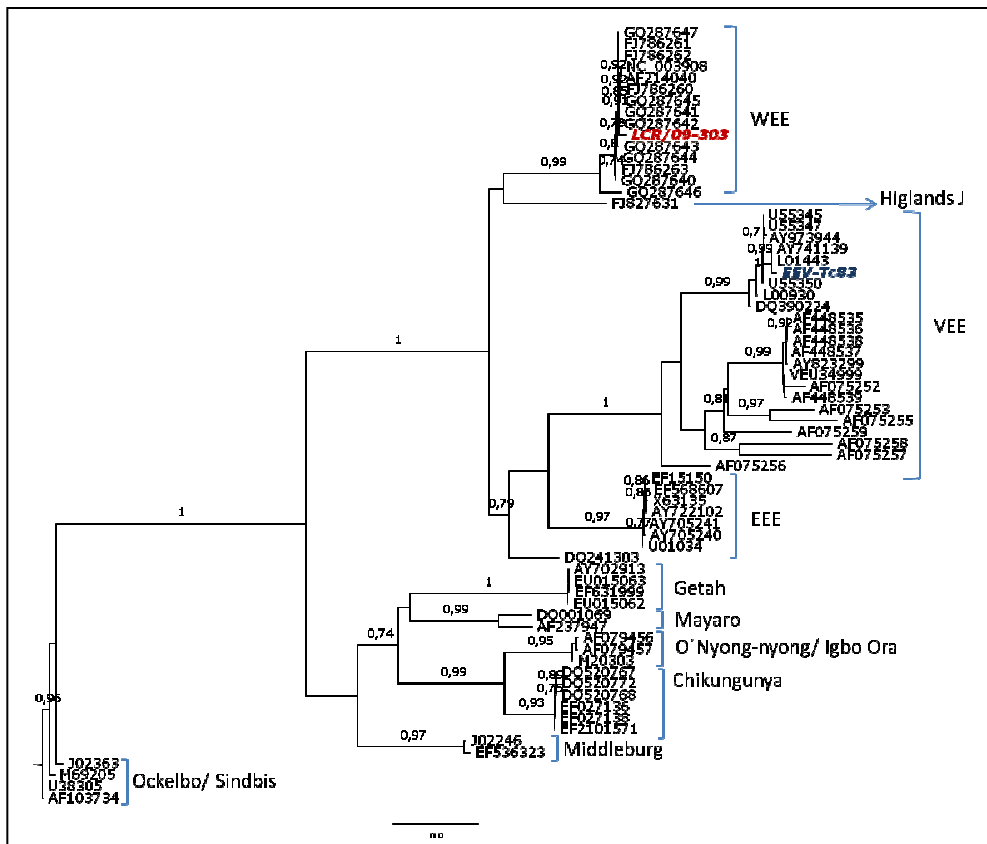
Posteriormente, en la Sección Virología de la Facultad de Ciencias, se procesaron los ARN obtenidos a partir de las tres muestras utilizando RT-PCR genérica anidada para Alphavirus, gen NSP4, 195pb (Sanchez-Seco y cols., 2001), logrando detectar alphavirus a partir del LCR nº1. Se realizaron ensayos de RT-PCR semi-anidada como se describe en el ítem 3.3.3.1 de materiales y métodos, obteniéndose un fragmento de NSP4 de 372 pb.

A continuación se realizó una RT-PCR anidada multiplex de NSP1 (Bronzoni y cols., 2004), obteniendo un amplicón de 208 pb, correspondiente al tamaño esperado para WEEV, a partir de LCR nº 1 y plasma (figura 24).



**Figura 25.** Amplicones obtenidos a partir de LCR nº 1 y plasma de muestra de encefalitis utilizando RT-PCR anidada multiplex de NSP1 (Bronzoni y cols., 2004), obteniéndose un fragmento de 208pb para WEEV y de 400pb para VEEV (C Pos). MPM: marcador de peso molecular de 100 a 3000pb.

El análisis filogenético de la secuencia obtenida a partir de la amplificación del LCR nº 1 (LCR 09-303) utilizando RT-PCR genérica semi- anidada para Alphavirus, gen NSP4, coincide con el resultado de la RT-PCR anidada multiplex de NSP1, agrupando con los WEEVs (aLRT=0.99) (figura 25). El análisis filogenético muestra que este virus está relacionado con cepas de WEEV provenientes de *Cx. tarsalis* de Estados Unidos. Notablemente el virus detectado en este estudio no se encuentra directamente relacionado a la cepa de WEEV GQ287646, proveniente de Chaco, Argentina.



**Figura 25.** Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud. El análisis corresponde a una región de 448 nucleótidos del gen que codifica NSP4. Se muestran los números de acceso del Genbank y valores soporte estadístico mayores a 0,70. La secuencia en color rojo corresponde a la muestra LCR 09-303 (LCR nº 1, en color rojo) y la secuencia en color azul EEV Tc-83 corresponde al control positivo (en color azul). WEE: encefalitis equina del oeste; VEE: encefalitis equina venezolana; EEE: encefalitis equina del este.

## 5. DISCUSIÓN

---

En la actualidad la emergencia y re-emergencia de los arbovirus es una problemática de gran importancia en salud pública, así como en sanidad animal. Los arbovirus circulan en la naturaleza de forma casi desapercibida, hasta que en un momento producen brotes en seres humanos y/o animales domésticos y salvajes.

### **5.1 De los resultados obtenidos en mosquitos**

Los antecedentes de circulación de arbovirus en Uruguay a la fecha son relativamente escasos, situación opuesta a la de los países vecinos (Argentina y Brasil). La amplia distribución de potenciales vectores como *Culex pipiens* y *Ochlerotatus albifasciatus* en nuestro país debe ser tomada en consideración debido al potencial de transmisión de un gran número de arbovirus por parte de los mismos. En el presente estudio se hizo énfasis en los posibles sitios de introducción de arbovirus al país a la hora de realizar las capturas de mosquitos. Por ello se seleccionaron los departamentos fronterizos con mayor circulación de personas, el área metropolitana del país y dos departamentos con actividad turística. El diseño de trapeo y el tipo de trampa y cebo utilizados permitió capturar una amplia gama de especies, todas ellas reportadas previamente en el país (Rossi, 2003), entre las cuales se observa una mayoría de mosquitos de los géneros *Culex* y *Ochlerotatus* en todas las localidades relevadas. Es de notar que, aunque *St. aegypti* está presente en el país, con índices LIRAA de riesgo medio en Salto y Paysandú, las capturas en estas localidades fueron bajas (1,4% y 0%, respectivamente). A pesar de que los índices LIRAA miden los niveles de infestación de *St. aegypti* en su estado larval, el hecho de que existan LIRAA altos se traduce en un mayor número de ejemplares adultos. El bajo número de ejemplares capturados en estos departamentos puede deberse a que esta es una especie que se captura principalmente a través de succión en módulos habitacionales, y en el caso de hacerlo con trampas de luz CDC, el mayor rendimiento se obtiene al adicionar octenol (Russell, 2004).

*Culex pipiens* es un complejo de varias sub-especies estrechamente relacionadas, entre ellas *Culex pipiens pipiens* y *Culex pipiens quinquefasciatus*. Este complejo se ha considerado como un gran problema en la taxonomía de mosquitos, ya que presentan diferentes características fisiológicas y comportamentales, pero sin una diferenciación morfológica distintiva (Fonseca y cols., 2004). En el presente trabajo se utiliza la clasificación taxonómica de Darsie, que permite clasificar como *Culex pipiens* (Darsie, 1985). Los mosquitos de este complejo son el vector principal de una gran parte de los arbovirus que circulan en la vecindad de Uruguay, como por ejemplo SLEV y WNV, entre otros. El hecho de que *Culex pipiens* represente el 83,6% de los mosquitos capturados y su amplia distribución en el país implica un riesgo real de emergencia de los arbovirus antes mencionados.

Del análisis de 3329 mosquitos se detectó la presencia de un flavivirus endógeno de *Culex*, denominado Culex Flavivirus (CxFV). La detección de CxFV en tres departamentos de Uruguay: Montevideo (barrios Cerrito y Villa García), Paysandú y Salto presentados en este trabajo, más el detectado en el año 2007 en Colonia (Burgueño, 2007), demuestran que el virus circula en el país y que presenta una distribución relativamente amplia (principalmente en el litoral y la zona sur del país). A su vez, la literatura al respecto publicada en los últimos años ha mostrado la presencia de este virus endógeno en diversas regiones del planeta. Desde la primera detección en Japón (Hoshino y cols., 2007) hasta ahora se han publicado hallazgos de CxFV en Guatemala (Morales-Betoulle y cols., 2008), México (Farfan-Ale y cols., 2009; Farfan-Ale y cols., 2010; Saiyasombat y cols., 2010), Uganda (Cook y cols., 2009), Estados Unidos (Blitvich y cols., 2009; Bolling y cols., 2011; Crockett y cols., 2012; Kim y cols., 2009; Newman y cols., 2011; Saiyasombat y cols., 2011), Japón (Hoshino y cols., 2012), China (Huanyu y cols., 2012) y Brasil (Machado y cols., 2012). Estos virus se transmiten principalmente por la vía vertical teniendo la transmisión venérea un rol minoritario (Bolling y cols., 2012; Saiyasombat y cols., 2011).

Desde los primeros reportes de la circulación de CxFV se han postulado dos efectos posibles que la presencia de este virus en un mosquito puede tener sobre la capacidad vectorial a los arbovirus. Uno de ellos es que CxFV module o suprima la respuesta inmune del mosquito, haciéndolo más susceptible a la infección con otros patógenos, actualmente no hay evidencias experimentales que apoyen ésta hipótesis. Otro efecto sería la exclusión por superinfección, en la que una célula infectada con un virus no puede ser infectada productivamente por otro virus estrechamente relacionado. Existen dos trabajos que evalúan el impacto de la infección con CxFV sobre la competencia vectorial de *Cx. pipiens* a WNV. En el primero no hubo impacto sobre la replicación, infección, difusión ni transmisión de WNV en ninguno de los grupos de mosquitos (Kent y cols., 2010). Mientras que, en un trabajo posterior, se reportó una posible supresión temprana (84-156hs post-infección) en la replicación de WNV (Bolling y cols., 2012). Además, en un estudio realizado en Chicago (Estados Unidos) se detectaron mosquitos *Cules spp.* co-infectados naturalmente con CxFV y WNV. Adicionalmente se comprobó que los pools de mosquitos infectados con WNV tenían una probabilidad 4 veces mayor de estar infectados con CxFV que los pools negativos para WNV (pareados espacio-temporalmente). Este trabajo sugiere que la infección con un flavivirus endógeno, en este caso CxFV, no excluye una infección secundaria con otro flavivirus (distante a nivel genético) como WNV (Newman y cols., 2011).

La posición basal de los flavivirus endógenos respecto a los demás flavivirus de mosquitos y garrapatas en filogenias construidas con secuencias completas de NS5 indicarían una relación ancestral de estos virus con sus vectores artrópodos (Cook y Holmes, 2006). Por otra parte, un estudio reciente realizado con un amplio muestreo de secuencias de diferentes genes indican que los flavivirus endógenos serían un grupo hermano respecto a los flavivirus de mosquitos y garrapatas, y su historia evolutiva denota la existencia de

múltiples introducciones y frecuentes saltos de huésped, así como ocasionales eventos de recombinación (Cook y cols., 2012).

La filogenias obtenidas en el presente trabajo están en concordancia con la clasificación actual de los flavivirus endógenos, con un clado asociado a *Stegomyia spp.* que incluye CFAV, AeFV y KRV y otro clado asociado a *Culex spp.* que incluye CxFV y Quan Binh virus, más Nakiwogo virus, que agrupa con los asociados a *Culex* pero infecta a *Mansonia spp* (Cook y cols., 2012). Como era esperable, los mejores valores de soporte estadístico se obtuvieron al utilizar las secuencias obtenidas de las RT-PCRs anidadas solapadas (Newman y cols., 2011), que permitieron amplificar 1308 nucleótidos del gen NS5. Este análisis filogenético solo incluyó dos (61 y 120) de los cinco pools positivos detectados, debido a que no fue posible lograr la amplificación de los otros 3 pools. Es de notar que en las 3 filogenias obtenidas con 137, 206 y 1308 pb se obtienen topologías concordantes. Este resultado confirma que el fragmento de 143pb de la RT-PCR anidada genérica (Sanchez Seco MP y cols) , aunque de pequeño tamaño, es altamente informativo y permite discriminar bien a la mayoría de los flavivirus, incluidos grupos divergentes como los flavivirus endógenos.

En un trabajo previo, nuestro laboratorio realizó numerosos intentos de aislamiento de CpCol en células VeroE6 y C6/36, no lográndose aislar en ninguna oportunidad. La dificultad de aislar este virus ha sido reportada por otros autores (Díaz, comunicación personal). En el presente trabajo no se realizaron intentos de aislamiento, básicamente por la experiencia con CpCol, en la cual se gastó toda la muestra en los sucesivos intentos. Por ello se decidió no intentar el aislamiento con los nuevos pools positivos y así poder utilizar la muestra original para las extracciones de ARN y caracterización de los virus. Se realizaron aproximadamente 3 extracciones de cada pool para obtener material suficiente para la realización de las numerosas RT-PCRs que se describen en éste trabajo. Es muy probable que debido a los ciclos de congelación y descongelación hayan disminuido la carga viral en el pool y por lo tanto se haga difícil obtener fragmentos genómicos de gran tamaño.

La detección de CxFV en tres departamentos de Uruguay, Montevideo (barrios Cerrito y Villa García), Paysandú y Salto presentados en este trabajo, más el detectado en el año 2007 en Colonia (Burgueño, 2007), muestran que CxFV se distribuye en el litoral y sur del país.

## **5.2 De los resultados obtenidos en equinos**

En cuanto al estudio serológico en equinos, fue posible analizar entre 10 y 43 muestras por departamento, provenientes a su vez de 18 de los 19 departamentos del Uruguay. Los resultados obtenidos muestran la primera evidencia de circulación de SLEV y la posible circulación de WNV en caballos en el país. El SLEV presentaría además una amplia



distribución en el país y no parece tener restricciones geográficas, ya que se detectaron anticuerpos anti-SLEV en equinos de 17 de los 18 departamentos analizados. El estudio indicó una prevalencia general para SLEV del 50,1%, similar a la reportada en países vecinos. Un estudio realizado en varias provincias de Argentina en la década del 80 indicó prevalencias desde 42 a 75% en equinos (Monath y cols., 1985), en cambio un estudio publicado en 2012 a partir de muestras de la provincia de Santa Fe detectó una prevalencia del 12% (Tauro y cols., 2012). Tal como se consigna en el trabajo de Tauro y cols., es posible que esta diferencia pueda deberse a una subestimación de las prevalencias debido a los criterios de positividad utilizados. En nuestro trabajo se siguió el criterio de positividad utilizado por Monath, donde se toman como positivos aquellos sueros que neutralizan el 80% de las unidades formadoras de placas, a una dilución 1:10; junto con la titulación en paralelo entre ambos, considerando la presencia de cruce antigénico entre virus. En Brasil, un estudio realizado en Mato Grosso do Sul detectó una prevalencia de 50,9% (Rodrigues y cols., 2010) y, otro en la subregión de Nhecolândia, encontró una prevalencia de 43,7% (Pauvolid-Correa y cols., 2010).

La actividad de SLEV reportada en este trabajo está en concordancia con los antecedentes reportados en el país. En este sentido, estudios realizados en 1999 y 2001 en el DLSP, reportan la detección de anticuerpos contra este virus en un brote de febriles ocurrido en Rivera, así como en una encuesta serológica en muestras de banco de sangre (Delfraro, 2002). En ambos casos fueron utilizadas las técnicas de ELISA y PRNT.

A su vez, en el marco de la vigilancia de virus dengue en Uruguay, se han reportado 2 casos de encefalitis y síndrome febril "tipo dengue", los cuales fueron finalmente confirmados como infecciones por SLEV (2007 y 2008, fuente: DEVISA, MSP). Sumado a esto, en 2012 se confirman serológicamente dos casos de encefalitis por SLEV ocurridos en Montevideo y uno en San José (MSP, 2012). Estos hallazgos, sumado a los resultados en equinos encontrados en éste trabajo, indican que SLEV se encuentra ampliamente distribuido y circulando desde hace varios años en el país. El bajo número de casos humanos de infección por SLEV puede deberse a la escasa vigilancia de síndromes febriles en el país y también a infecciones asintomáticas. Es de notar que en el muestreo que se realizó en mosquitos en el presente estudio, no se encontraron pools positivos para SLEV. Es posible que esto se deba a que no fue posible realizar capturas en los domicilios y peridomicilios de los pacientes diagnosticados en el momento en que los mismos ocurrieron. Debido al comportamiento y características de los vectores potencialmente implicados en la transmisión, la mayor probabilidad de encontrar mosquitos positivos para SLEV se da cuando la captura se realiza en el momento y lugar en que ocurren los brotes (Díaz y cols., 2006).

SLEV y WNV pertenecen al mismo grupo antigénico, el grupo de la encefalitis japonesa, por ello las muestras positivas en el tamizaje de SLEV fueron posteriormente tamizadas para WNV. De las 8 muestras positivas para WNV, una, del departamento de Salto, podría

ser considerada como positiva, ya que la misma presentó un título de 1:10 para SLEV y de 1:20 para WNV cuando se analizaron en ensayo de titulación simultánea. Sin embargo, de acuerdo al criterio del CDC para la identificación por PRNT del agente etiológico, la muestra en cuestión debe presentar un título 4 veces mayor al de SLEV, para ser considerada positiva para WNV. Por lo tanto, consideramos a esta muestra como sospechosa para WNV, ya que si bien no cumple estrictamente con los criterios para ser considerada positiva, en varios ensayos realizados la misma presentó consistentemente el doble de título para WNV que para SLEV. Por tanto, la posible circulación de WNV en nuestro país merece mayores estudios, ya que en la misma época del primer aislamiento de WNV en Argentina a partir de un caballo (año 2006) se detectó un equino seropositivo que provenía de nuestro país. Recordemos además que los sueros equinos analizados en este trabajo fueron colectados en 2007. En cuanto a las otras 7 muestras positivas para WNV en el tamizaje, permanecieron con título 1:10 en la titulación, mientras que presentaron títulos mayores a 1:40 para SLEV, y por ello se consideran positivas para SLEV.

Los alfavirus estuvieron mucho menos representados en los sueros de equinos analizados, presentando prevalencias relativamente bajas en comparación con estudios en la región (Monath y cols., 1985; Pauvalid-Correa y cols., 2010). El EEEV presentó una prevalencia del 1,18% y se distribuyó en 4 departamentos (Rivera, Rocha, San José y Soriano). En el año 2006, nuestro laboratorio detectó genoma de EEEV en un pool de mosquitos *Culex pipiens*, capturados en la ciudad de Fray Bentos del departamento de Río Negro (Burgueño, 2007), sin embargo no se detectaron anticuerpos anti-EEEV en ninguno de los 23 sueros de equinos analizados de este departamento. Para WEEV se obtuvo una única muestra positiva, con título de 1:80 proveniente del departamento de Cerro Largo. Los virus del complejo VEE presentaron una distribución más amplia que los otros alfavirus estudiados, demostrando circulación de los tres virus estudiados: VEEV, PIXV y RNV, también en concordancia con estudios similares en la región (Monath y cols., 1985). El VEEV es el serotipo incluido en la vacuna comercial para encefalitis venezolana. Es posible que parte de esta prevalencia encontrada (2,12%) pueda deberse a que, a pesar que los equinos fueron referidos como “no vacunados”, alguno de ellos haya sido importado de países con vacunación para VEEV, como Estados Unidos.

### **5.3 De los resultados del estudio de un caso fatal de encefalitis viral**

La detección de WEEV en un caso humano fatal es de gran importancia epidemiológica, ya que es el primer reporte de WEE en el país, y el primer caso en la región identificado por métodos moleculares. Es posible que éste sea un evento relativamente inusual, ya que no hay evidencia de reciente circulación en la región y el paciente no había viajado fuera del país en los últimos meses. Del análisis de la secuencia viral, surge que este virus está más relacionado con virus de Estados Unidos que con cepas de Argentina. Esto podría ser simplemente un sesgo por falta de secuencias de la región, ya que sólo se dispone en las

bases de datos de 2 secuencias del gen NSP4 de WEEV de Argentina, o podría tratarse de un virus introducido recientemente en nuestro país.

Se reconoce que en nuestro país más del 50% de las encefalitis virales permanecen sin determinación del agente etiológico (Salamano, 2009), por lo que la incorporación de métodos sensibles y específicos de diagnóstico molecular pueden ser de gran utilidad. A partir de este hallazgo, el Ministerio de Salud Pública de nuestro país incorporó el diagnóstico molecular de alphavirus y flavivirus al algoritmo de vigilancia de las meningoencefalitis a líquido claro. Gracias a ello, fue posible diagnosticar un caso más (no fatal) de encefalitis por alfavirus utilizando métodos moleculares (Chiparelli, Morel y Burgueño, comunicación personal).

Hasta el momento no se han reportado epizootias ni casos humanos atribuibles a VEEV en Uruguay, pero la presencia de anticuerpos en equinos indica que al menos 3 subtipos circulan en el país, por tanto, estando presente varias especies de mosquitos que han sido reportados como vectores (*Ochlerotatus spp*, *Culex spp* y *Stegomyia spp*), no debería descartarse la posibilidad de brotes, tanto en humanos como en equinos.

Nuestros resultados sugieren que varios alfavirus se encuentran circulando en nuestro país. Algunos como WEEV y EEEV lo harían a baja intensidad, a juzgar por los valores de seroprevalencia en equinos, pero provocando casos esporádicos de encefalitis en humanos.

Por otro lado, los flavivirus, más específicamente SLEV circula en el país presentando una amplia distribución y prevalencia elevada en equinos, lo que condice con los casos documentados de encefalitis en humanos.

En conjunto, los resultados de las investigaciones presentadas en esta tesis son un aporte al conocimiento de la circulación de los arbovirus en el país. Este tipo de estudios, abarcando vectores y hospedadores finales brindan información útil, a ser utilizada en el diseño de estrategias de vigilancia prevención y control de las arbovirosis de interés sanitario.

## 6. CONCLUSIONES

---

- El presente trabajo es el primer estudio de circulación de arbovirus en mosquitos realizado en el Uruguay.
- Permitió ahondar en el conocimiento de la distribución de las especies de mosquitos vectores de arbovirus en los departamentos de Artigas, Canelones, Colonia, Montevideo, Paysandú, Río Negro, Rivera, Salto y Soriano.
- Se detectó la circulación del flavivirus endógeno CxFV en los departamentos de Salto, Montevideo y Paysandú, además del previamente reportado en Colonia. Dichos virus se caracterizaron a nivel molecular, llegando a analizar 1300 nucleótidos del gen NS5.
- Se realizó el primer estudio de circulación de arbovirus en equinos, cubriendo 18 de los 19 departamentos del país. El mismo demostró la circulación de alfavirus como VEEV, PIXV, RNV, WEEV y EEEV. En cuanto a los flavivirus, se detectaron elevadas prevalencias de anticuerpos neutralizantes para SLEV y una muestra que podría considerarse seropositiva para WNV.
- En el marco de estas investigaciones, fue posible identificar y caracterizar por primera vez a nivel molecular un caso de encefalitis por WEEV en la región.

## 7. PERSPECTIVAS

---

- Los roedores son hospedadores amplificadores de varios arbovirus, incluyendo WEEV y VEEV, entre otros. La Sección Virología tiene una amplia seroteca de roedores, cubriendo varios años, especies y localidades. Por estas razones se planea evidenciar la circulación de arbovirus en sueros de roedores del país, a través de la detección de anticuerpos neutralizantes.
- Las aves son hospedadores amplificadores de la mayoría de los arbovirus, por ello es sumamente importante estudiar la circulación de arbovirus en las mismas. Se plantea realizar un muestreo de aves a través de captura de las mismas con redes de niebla y posterior extracción de sangre, para así detectar anticuerpos neutralizantes contra los virus SLEV, WNV y EEEV.
- Como se mencionó en la tesis, *Culex pipiens* es estrictamente un complejo de sub-especies de mosquitos. Para conocer que sub-especies están presentes en Uruguay, y en especial, a qué sub-especie pertenecen los mosquitos en los que se detectó CxFV, nuestro grupo se encuentra optimizando una PCR que permite diferenciar entre las sub-especies *Culex pipiens pipiens* y *Culex pipiens quinquefasciatus*, basada en polimorfismos presentes en el segundo intrón del locus de la acetilcolinesterasa-2 (Smith y Fonseca, 2004). Este tipo de estudios son básicos para iniciar investigaciones sobre la competencia vectorial de las diversas sub-especies de *Culex* frente a diferentes arbovirus
- Se planea continuar con la vigilancia de arbovirus en mosquitos en el país, con especial énfasis en la captura en regiones no relevadas en el presente trabajo, así como ante la confirmación de casos de arbovirus en humanos.

## 8. BIBLOGRAFÍA

---



Aguilar, P.V., Estrada-Franco, J.G., Navarro-Lopez, R., Ferro, C., Haddow, A.D., and Weaver, S.C. (2011). Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: hidden under the dengue umbrella. *Future Virol* 6, 721-740.

Albuquerque, I.G., Marandino, R., Mendonca, A.P., Nogueira, R.M., Vasconcelos, P.F., Guerra, L.R., Brandao, B.C., Aguiar, G.R., and Bacco, P.A. (2012). Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45, 128-129.

Arrigo, N.C., Adams, A.P., Watts, D.M., Newman, P.C., and Weaver, S.C. (2010). Cotton rats and house sparrows as hosts for North and South American strains of eastern equine encephalitis virus. *Emerg Infect Dis* 16, 1373-1380.

Aviles, G., Sabattini, M.S., and Mitchell, C.J. (1992). Transmission of western equine encephalomyelitis virus by Argentine *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 29, 850-853.

Azevedo, R.S., Silva, E.V., Carvalho, V.L., Rodrigues, S.G., Nunes-Neto, J.P., Monteiro, H., Peixoto, V.S., Chiang, J.O., Nunes, M.R., and Vasconcelos, P.F. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 15, 1830-1832.

Barrett, A.D. (2001). Flaviviruses. In *Encyclopedia of life sciences*, Nature, ed. (Nature Publishing Group, John Wiley & Sons, Ltd.).

Berge, T.O., Banks, I.S., and Tigertt, W.D. (1961). Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells. *Am J Hyg* 73, 209-218.

Bernardini, D.A. (2011). Neglected lessons from the 2009 dengue epidemic in Argentina. *Rev Saude Publica* 45, 3p.

Blitvich, B.J., Lin, M., Dorman, K.S., Soto, V., Hovav, E., Tucker, B.J., Staley, M., Platt, K.B., and Bartholomay, L.C. (2009). Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex flavivirus*, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J Med Entomol* 46, 934-941.

Bolling, B.G., Eisen, L., Moore, C.G., and Blair, C.D. (2011). Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg* 85, 169-177.

Bolling, B.G., Olea-Popelka, F.J., Eisen, L., Moore, C.G., and Blair, C.D. (2012). Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology* 427, 90-97.

Bosch, I., Herrera, F., Navarro, J.C., Lentino, M., Dupuis, A., Maffei, J., Jones, M., Fernandez, E., Perez, N., Perez-Eman, J., *et al.* (2007). West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 13, 651-653.

Bronzoni, R.V., Moreli, M.L., Cruz, A.C., and Figueiredo, L.T. (2004). Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 456-461.

Burgueño, A. (2007). Detección de arbovirus en mosquitos del Uruguay. In XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM (Asociación de Universidades del Grupo Montevideo) (Asunción, Paraguay).

Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., and Brandt, W.E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 ( Pt 1), 37-43.

Calzolari, M., Ze-Ze, L., Ruzek, D., Vazquez, A., Jeffries, C., Defilippo, F., Costa Osorio, H., Kilian, P., Ruiz, S., Fooks, A.R., *et al.* (2012). Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol*.

Camara, A., Diaz, G., Vega, V., Basualdo, M., and Contigiani, M. (2003). Seroprevalence of antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex (subtypes IAB and VI) in humans from General Belgrano island, Formosa, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45, 201-204.

Cammisa-Parks, H., Cisar, L.A., Kane, A., and Stollar, V. (1992). The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology* 189, 511-524.

Carrara, A.S., Coffey, L.L., Aguilar, P.V., Moncayo, A.C., Da Rosa, A.P., Nunes, M.R., Tesh, R.B., and Weaver, S.C. (2007). Venezuelan equine encephalitis virus infection of cotton rats. *Emerg Infect Dis* 13, 1158-1165.

CDC (2011). Confirmed and Probable Eastern Equine Encephalitis Cases, Human, United States, 1964-2010, By State. Centers for Disease Control and Prevention (USA, <http://www.cdc.gov/easternequineencephalitis/>).

Cerutti, F., Giacobini, M., Mosca, A., Grasso, I., Rambozzi, L., Rossi, L., and Bertolotti, L. (2012). Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasit Vectors* 5, 99.

Coimbra, T.L., Santos, C.L., Suzuki, A., Petrella, S.M., Bisordi, I., Nagamori, A.H., Marti, A.T., Santos, R.N., Fialho, D.M., Lavigne, S., *et al.* (2007). Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49, 221-224.

Cook, S., Bennett, S.N., Holmes, E.C., De Chesse, R., Moureau, G., and de Lamballerie, X. (2006). Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87, 735-748.

Cook, S., Moureau, G., Harbach, R.E., Mukwaya, L., Goodger, K., Ssenfuka, F., Gould, E., Holmes, E.C., and de Lamballerie, X. (2009). Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol* 90, 2669-2678.

Cook, S., Moureau, G., Kitchen, A., Gould, E.A., de Lamballerie, X., Holmes, E.C., and Harbach, R.E. (2012). Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *J Gen Virol* 93, 223-234.

Crabtree, M.B., Nga, P.T., and Miller, B.R. (2009). Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Arch Virol* 154, 857-860.

Crabtree, M.B., Sang, R.C., Stollar, V., Dunster, L.M., and Miller, B.R. (2003). Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch Virol* 148, 1095-1118.

Crockett, R.K., Burkhalter, K., Mead, D., Kelly, R., Brown, J., Varnado, W., Roy, A., Horiuchi, K., Biggerstaff, B.J., Miller, B., *et al.* (2012). *Culex flavivirus* and West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* populations in the southeastern United States. *J Med Entomol* 49, 165-174.

Chaves Tdo, S., Pellini, A.C., Mascheretti, M., Jahnel, M.T., Ribeiro, A.F., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F., and Boulos, M. (2012). Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 18, 529-530.

Darsie, R.F., Jr. (1985). Mosquitoes of Argentina. Part I: Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in english and spanish (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics* 17, 153-253.

de Almeida, M.A., Dos Santos, E., da Cruz Cardoso, J., da Fonseca, D.F., Noll, C.A., Silveira, V.R., Maeda, A.Y., de Souza, R.P., Kanamura, C., and Brasil, R.A. (2012). Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *Am J Primatol* 74, 68-76.

de Souza, R.P., Rocco, I.M., Maeda, A.Y., Spenassatto, C., Bisordi, I., Suzuki, A., Silveira, V.R., Silva, S.J., Azevedo, R.M., Tolentino, F.M., *et al.* (2011). Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1439.

Delfraro, A., ed. (2002). Arbovirus en Uruguay: Dengue – Diagnóstico. (2) 53-7. In: *Virus y Virología Médica en Uruguay*. Ed. Instituto de Higiene, Montevideo, 92 pp.

Diaz, L., Komar, N., Visintin, A., Dantur Juri, M.J., Stein, M., Lobo Allende, R., Spinsanti, L., Konigheim, B., Aguilar, J., Laurito, M., *et al.* (2008). West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg Infect Dis* 14, 689-691.

Diaz, L.A., Albrieu Llinas, G., Vazquez, A., Tenorio, A., and Contigiani, M.S. (2012). Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1489.

Diaz, L.A., Re, V., Almiron, W.R., Farias, A., Vazquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Aguilar, J., Spinsanti, L., Konigheim, B., Visintin, A., *et al.* (2006). Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis* 12, 1752-1754.

Dibo, M.R., Menezes, R.M., Ghirardelli, C.P., Mendonca, A.L., and Chiaravalloti Neto, F. (2011). [The presence of Culicidae species in medium-sized cities in the State of Sao Paulo, Brazil and the risk of West Nile fever and other arbovirus infection]. *Rev Soc Bras Med Trop* 44, 496-503.

Early, E., Peralta, P.H., and Johnson, K.M. (1967). A plaque neutralization method for arboviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 25, 741-747.

Elliott, R. M. (2009). "Bunyaviruses and climate change." *Clin Microbiol Infect* 15(6): 510-517.

Farfan-Ale, J.A., Lorono-Pino, M.A., Garcia-Rejon, J.E., Hovav, E., Powers, A.M., Lin, M., Dorman, K.S., Platt, K.B., Bartholomay, L.C., Soto, V., *et al.* (2009). Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 80, 85-95.

Farfan-Ale, J.A., Lorono-Pino, M.A., Garcia-Rejon, J.E., Soto, V., Lin, M., Staley, M., Dorman, K.S., Bartholomay, L.C., Hovav, E., and Blitvich, B.J. (2010). Detection of Flaviviruses and Orthobunyaviruses in Mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*.

Fernandez, Z., Richartz, R., Travassos da Rosa, A., and Soccol, V.T. (2000). [Identification of the encephalitis equine virus, Parana, Brazil]. *Rev Saude Publica* 34, 232-235.

Figueiredo, L.T. (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 224-229.

Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., and Wilkerson, R.C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303, 1535-1538.

Forrester, N.L., Kenney, J.L., Deardorff, E., Wang, E., and Weaver, S.C. (2008). Western Equine Encephalitis submergence: lack of evidence for a decline in virus virulence. *Virology* 380, 170-172.

Gaunt, M.W., Sall, A.A., de Lamballerie, X., Falconar, A.K., Dzhivanian, T.I., and Gould, E.A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol* 82, 1867-1876.

Githeko, A.K., Lindsay, S.W., Confalonieri, U.E., and Patz, J.A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ* 78, 1136-1147.

Gould, L.H., and Fikrig, E. (2004). West Nile virus: a growing concern? *J Clin Invest* 113, 1102-1107.

Gubler, D.J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33, 330-342.

Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.

Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., and Campbell, G.L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11, 1167-1173.

Holmes, E.C., and Twiddy, S.S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 3, 19-28.

Holzmann, I., Agostini, I., Areta, J.I., Ferreyra, H., Beldomenico, P., and Di Bitetti, M.S. (2010). Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am J Primatol* 72, 475-480.

Hollidge, B.S., Gonzalez-Scarano, F., and Soldan, S.S. (2010). Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 428-442.

Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Kobayashi, M. (2009). Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology* 391, 119-129.

Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M., and Sawabe, K. (2007). Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359, 405-414.

Hoshino, K., Takahashi-Nakaguchi, A., Isawa, H., Sasaki, T., Higa, Y., Kasai, S., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Kobayashi, M. (2012). Entomological surveillance for flaviviruses at migratory bird stopover sites in Hokkaido, Japan, and a new insect flavivirus detected in *Aedes galloisi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 49, 175-182.

Huanyu, W., Haiyan, W., Shihong, F., Guifang, L., Hong, L., Xiaoyan, G., Lizhi, S., Rayner, S., Aiqiang, X., and Guodong, L. (2012). Isolation and identification of a distinct strain of Culex Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China. *Virology* 9, 73.

Huhtamo, E., Moureau, G., Cook, S., Julkunen, O., Putkuri, N., Kurkela, S., Uzcategui, N.Y., Harbach, R.E., Gould, E.A., Vapalahti, O., *et al.* (2012). Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe. *Virology*.

Jentes, E.S., Pomeroy, G., Gershman, M.D., Hill, D.R., Lemarchand, J., Lewis, R.F., Staples, J.E., Tomori, O., Wilder-Smith, A., and Monath, T.P. (2011). The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis* 11, 622-632.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.

Kent, R.J., Crabtree, M.B., and Miller, B.R. (2010). Transmission of West Nile virus by Culex quinquefasciatus say infected with Culex Flavivirus Izabal. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e671.

Kihara, Y., Satho, T., Eshita, Y., Sakai, K., Kotaki, A., Takasaki, T., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Srisawat, R., Lapcharoen, P., *et al.* (2007). Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods* 146, 372-374.

Kim, D.Y., Guzman, H., Bueno, R., Jr., Dennett, J.A., Auguste, A.J., Carrington, C.V., Popov, V.L., Weaver, S.C., Beasley, D.W., and Tesh, R.B. (2009). Characterization of Culex Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology* 386, 154-159.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields Virology*, Vol 1 (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business).

Kucharz, E.J., and Cebula-Byrska, I. (2012). Chikungunya fever. *Eur J Intern Med* 23, 325-329.

Kuno, G., and Chang, G.J. (2005). Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* 18, 608-637.

Kuno, G., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N., and Cropp, C.B. (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* 72, 73-83.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Lindoso, J.A., and Lindoso, A.A. (2009). Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51, 247-253.

Long, K.C., Ziegler, S.A., Thangamani, S., Hausser, N.L., Kochel, T.J., Higgs, S., and Tesh, R.B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by Aedes aegypti. *Am J Trop Med Hyg* 85, 750-757.

MacLachlan, N.J., and Dubovi, E.J. (2011). *Fenner's veterinary virology*, 4th ed. (Academic Press, Elsevier Inc.).

Machado, D.C., Mondini, A., Santana, V.D., Yonamine, P.T., Chiaravalloti Neto, F., Zanotto, P.M., and Nogueira, M.L. (2012). First Identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology*.

Mahy, B.W.J., and van Regenmortel, M.H.V. (2008). *Encyclopedia of Virology, Vol 1* (Academic Press, Elsevier Inc.).

Martin, D.A., Muth, D.A., Brown, T., Johnson, A.J., Karabatsos, N., and Roehrig, J.T. (2000). Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 38, 1823-1826.

Mattar, S., Edwards, E., Laguado, J., Gonzalez, M., Alvarez, J., and Komar, N. (2005). West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis* 11, 1497-1498.

Miller, B. (2008). *Encyclopedia of Virology, Vol 1* (Elsevier Inc.).

Mitchell, C.J., Monath, T.P., Sabattini, M.S., Cropp, C.B., Daffner, J.F., Calisher, C.H., Jakob, W.L., and Christensen, H.A. (1985). Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 34, 945-955.

Mitchell, C.J., Monath, T.P., Sabattini, M.S., Daffner, J.F., Cropp, C.B., Calisher, C.H., Darsie, R.F., Jr., and Jakob, W.L. (1987). Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of western equine encephalitis in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 36, 107-113.

Monath, T.P., Sabattini, M.S., Pauli, R., Daffner, J.F., Mitchell, C.J., Bowen, G.S., and Cropp, C.B. (1985). Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic surveys and sentinel equine program. *Am J Trop Med Hyg* 34, 966-975.

Mondini, A., Cardeal, I.L., Lazaro, E., Nunes, S.H., Moreira, C.C., Rahal, P., Maia, I.L., Franco, C., Gongora, D.V., Gongora-Rubio, F., *et al.* (2007). Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13, 176-178.

Morales-Betoulle, M.E., Monzon Pineda, M.L., Sosa, S.M., Panella, N., Lopez, M.R., Cordon-Rosales, C., Komar, N., Powers, A., and Johnson, B.W. (2008). *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *J Med Entomol* 45, 1187-1190.

Morales, M.A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, J.B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., Pigretti, S., Menchaca, H., Garrido, N., *et al.* (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12, 1559-1561.

Moreno, E.S., Rocco, I.M., Bergo, E.S., Brasil, R.A., Siciliano, M.M., Suzuki, A., Silveira, V.R., Bisordi, I., and Souza, R.P. (2011). Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of Sao Paulo, Brazil, 2008. *Rev Soc Bras Med Trop* 44, 290-296.

Mourao, M.P., Bastos Mde, S., de Figueiredo, R.P., Gimaque, J.B., Galusso Edos, S., Kramer, V.M., de Oliveira, C.M., Naveca, F.G., and Figueiredo, L.T. (2012). Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 42-46.

Ministerio da Saude, Brasil (2012). Boletim Epidemiológico. Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Brazil), pp. 20.

Ministerio de Salud, Argentina (2009). Enfermedades infecciosas: Dengue. Diagnóstico. Guías para el equipo de salud. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación (Buenos Aires, Argentina), pp. 55.

Ministerio de Salud, Argentina (2010). Enfermedades infecciosas: Fiebre Amarilla. Guías para el equipo de salud. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación (Buenos Aires, Argentina).

Ministerio de Salud, Argentina (2011). Probable brote de encefalitis por flavivirus en la provincia de San Juan, M.d.S. Dirección de Enfermedades Transmisibles por Vectores, Presidencia de la Nación, ed., pp. 5.

Ministerio de Salud, Argentina (2012). Actualización de la situación de vigilancia de dengue en la República Argentina al 08-06-2012. Ministerio de la Salud, Presidencia de la Nación (Buenos Aires, Argentina), pp. 3.

Ministerio de Salud Pública, Uruguay (2011). Actualización Dengue: situación de dengue en el país y la región, M.d.S.P. Departamento de Vigilancia en Salud, ed. (Montevideo), pp. 6.

Ministerio de Salud Pública, Uruguay (2012). Boletín epidemiológico, actualizado a la semana epidemiológica 24, M.d.S.P. Departamento de Vigilancia en Salud, ed. (Montevideo), pp. 16.

Newman, C.M., Cerutti, F., Anderson, T.K., Hamer, G.L., Walker, E.D., Kitron, U.D., Ruiz, M.O., Brawn, J.D., and Goldberg, T.L. (2011). *Culex flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 1099-1105.

Organización Mundial de Salud (1985). Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organ Tech Rep Ser 719, 1-116.

Organización Panamericana para la Salud (2010). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. (La Paz, Bolivia).

Pabbaraju, K., Ho, K.C., Wong, S., Fox, J.D., Kaplen, B., Tyler, S., Drebot, M., and Tilley, P.A. (2009). Surveillance of mosquito-borne viruses in Alberta using reverse transcription polymerase chain reaction with generic primers. *J Med Entomol* 46, 640-648.

Parreira, R., Cook, S., Lopes, A., de Matos, A.P., de Almeida, A.P., Piedade, J., and Esteves, A. (2012). Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Res*.

Pauvolid-Correa, A., Morales, M.A., Levis, S., Figueiredo, L.T., Couto-Lima, D., Campos, Z., Nogueira, M.F., da Silva, E.E., Nogueira, R.M., and Schatzmayr, H.G. (2011). Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106, 467-474.

Pauvolid-Correa, A., Tavares, F.N., Costa, E.V., Burlandy, F.M., Murta, M., Pellegrin, A.O., Nogueira, M.F., and Silva, E.E. (2010). Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolandia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 829-833.

Pisano, M.B., Dantur, M.J., Re, V.E., Diaz, L.A., Farias, A., Sanchez Seco, M.P., Tenorio, A., Almiron, W.R., and Contigiani, M.S. (2010a). Cocirculation of Rio Negro Virus (RNV) and Pixuna Virus (PIXV) in Tucuman province, Argentina. *Trop Med Int Health* 15, 865-868.

Pisano, M.B., Re, V.E., Diaz, L.A., Farias, A., Stein, M., Sanchez-Seco, M.P., Tenorio, A., Almiron, W.R., and Contigiani, M.S. (2010b). Enzootic activity of pixuna and Rio Negro viruses (Venezuelan equine encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 199-201.

Pisano, M.B., Spinsanti, L.I., Diaz, L.A., Farias, A.A., Almiron, W.R., Re, V.E., and Contigiani, M.S. (2012). First detection of Rio Negro virus (Venezuelan equine encephalitis complex subtype VI) in Cordoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 125-128.

Powers, A.M., Brault, A.C., Shirako, Y., Strauss, E.G., Kang, W., Strauss, J.H., and Weaver, S.C. (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol* 75, 10118-10131.

Powers, A.M., and Logue, C.H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88, 2363-2377.

ProMED-mail (2005). Encephalitis, equine - Uruguay: request for information, I.S.f.I. Diseases, ed. (Miami, USA).

ProMED-mail (2008). Yellow fever - South America (16): Argentina, Paraguay, I.S.f.I. Diseases, ed. (Miami, USA).

Racloz, V., Ramsey, R., Tong, S., and Hu, W. (2012). Surveillance of dengue fever virus: a review of epidemiological models and early warning systems. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1648.

Reisen, W.K. (2003). Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res* 61, 139-183.

Rocco, I.M., Santos, C.L., Bisordi, I., Petrella, S.M., Pereira, L.E., Souza, R.P., Coimbra, T.L., Bessa, T.A., Oshiro, F.M., Lima, L.B., *et al.* (2005). St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47, 281-285.

Rocco, I.M., Silveira, V.R., Maeda, A.Y., Silva, S.J., Spenassatto, C., Bisordi, I., and Suzuki, A. (2012). First isolation of Dengue 4 in the state of Sao Paulo, Brazil, 2011. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54, 49-51.

Rodrigues, S.G., Oliva, O.P., Araujo, F.A., Martins, L.C., Chiang, J.O., Henriques, D.F., da Silva, E.V., Rodrigues, D.S., dos Prazeres, A.C., Tavares-Neto, J.C., *et al.* (2010). Epidemiologia do vírus da encefalite Saint Louis na Amazônia brasileira e no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: elevada prevalência de anticorpos em equinos. *Rev Pan-Amaz Saude* 1, 6.

Rogers, D.J., Wilson, A.J., Hay, S.I., and Graham, A.J. (2006). The global distribution of yellow fever and dengue. *Adv Parasitol* 62, 181-220.

Romano-Lieber, N.S., and Iversson, L.B. (2000). [Serological survey on arbovirus infection in residents of an ecological reserve]. *Rev Saude Publica* 34, 236-242.

Rossi, G. C. and M. Martínez (2003). "Mosquitos (Diptera: Culicidae) del Uruguay." *Entomol. Vect.* 10(4): 469-478.

Russell, R.C. (2004). The relative attractiveness of carbon dioxide and octenol in CDC- and EVS-type light traps for sampling the mosquitoes *Aedes aegypti* (L.), *Aedes polynesiensis* Marks, and *Culex quinquefasciatus* say in Moorea, French Polynesia. *J Vector Ecol* 29, 309-314.



Sabattini, M.S. (2010). Importancia actual de los arbovirus en Argentina. Sitio Argentino de Producción Animal (Río Cuarto, Córdoba, Argentina).

Sabattini, M.S., Daffner, J.F., Monath, T.P., Bianchi, T.I., Cropp, C.B., Mitchell, C.J., and Aviles, G. (1991). Localized eastern equine encephalitis in Santiago del Estero Province, Argentina, without human infection. *Medicina (B Aires)* 51, 3-8.

Saiyasombat, R., Bolling, B.G., Brault, A.C., Bartholomay, L.C., and Blitvich, B.J. (2011). Evidence of efficient transovarial transmission of Culex flavivirus by Culex pipiens (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 48, 1031-1038.

Saiyasombat, R., Dorman, K.S., Garcia-Rejon, J.E., Lorono-Pino, M.A., Farfan-Ale, J.A., and Blitvich, B.J. (2010). Isolation and sequence analysis of Culex flavivirus from Culex interrogator and Culex quinquefasciatus in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Arch Virol* 155, 983-986.

Salvatella Agrelo, R. (1997). Aedes aegypti (Diptera, Culicidae), notificación de su presencia en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 13, 118-121.

Salamano, R., Scavone, C., Baz, M., Rey, A., González, G., Perna, A., Cardinal, P., Lewin, S., Arbiza, J., Ruchansky, D. (2009). Meningitis y encefalitis virales en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 25, 212-228.

Sanchez-Seco, M.P., Rosario, D., Domingo, C., Hernandez, L., Valdes, K., Guzman, M.G., and Tenorio, A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 126, 101-109.

Sanchez-Seco, M.P., Rosario, D., Quiroz, E., Guzman, G., and Tenorio, A. (2001). A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods* 95, 153-161.

Sang, R.C., Gichogo, A., Gachoya, J., Dunster, M.D., Ofula, V., Hunt, A.R., Crabtree, M.B., Miller, B.R., and Dunster, L.M. (2003). Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water Aedes mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol* 148, 1085-1093.

Seijo, A., Morales, A., Poustis, G., Romer, Y., Efron, E., Vilora, G., Lloveras, S., Giamperetti, S., Puente, T., Monroig, J., *et al.* (2011). [Outbreak of St. Louis encephalitis in the Metropolitan Buenos Aires Area]. *Medicina (B Aires)* 71, 211-217.

Seijo, A., Romer, Y., Espinosa, M., Monroig, J., Giamperetti, S., Ameri, D., and Antonelli, L.G. (2009). [Outbreak of indigenous dengue in the Buenos Aires Metropolitan Area. Experience of the F. J. Muniz Hospital]. *Medicina (B Aires)* 69, 593-600.

Shope, R.E., Causey, O.R., and De Andrade, A.H. (1964). The Venezuelan Equine Encephalomyelitis Complex of Group a Arthropod-Borne Viruses, Including Mucambo and Pixuna from the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 13, 723-727.

Silva, M.L., Galiza, G.J., Dantas, A.F., Oliveira, R.N., Iamamoto, K., Achkar, S.M., and Riet-Correa, F. (2011). Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 23, 570-575.

Smith, J.L., and Fonseca, D.M. (2004). Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70, 339-345.

Somma-Moreira, R.E., Campione-Piccardo, J., Russi, J.C., Hortal de Giordano, M., Bauzá, C.A., Peluffo, G., and Tosi, H.C. (1970). Arbovirus en el Uruguay. *Arch Pediat Uruguay* 41, 5.

Spinsanti, L., Basquiera, A.L., Bulacio, S., Somale, V., Kim, S.C., Re, V., Rabbat, D., Zarate, A., Zlocowski, J.C., Mayor, C.Q., *et al.* (2003). St. Louis encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years. *Emerg Infect Dis* 9, 271-273.

Spinsanti, L. I., L. A. Diaz, *et al.* (2008). "Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005." *J Clin Virol* 42(1): 27-33.

Stollar, V., and Thomas, V.L. (1975). An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* 64, 367-377.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.

Tauro, L., Marino, B., Diaz, L.A., Lucca, E., Gallozo, D., Spinsanti, L., and Contigiani, M. (2012). Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 553-556.

Teixeira, M.G., Costa, M.C., Coelho, G., and Barreto, M.L. (2008). Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14, 1663.

Temporao, J.G., Penna, G.O., Carmo, E.H., Coelho, G.E., do Socorro Silva Azevedo, R., Teixeira Nunes, M.R., and da Costa Vasconcelos, P.F. (2011). Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17, 938-940.

Torres-Estrada, J.L., and Rodriguez, M.H. (2003). [Physico-chemical signals involved in host localization and in the induction of mosquito bites]. *Salud Publica Mex* 45, 497-505.

Tyler, S., Bolling, B.G., Blair, C.D., Brault, A.C., Pabbaraju, K., Armijos, M.V., Clark, D.C., Calisher, C.H., and Drebot, M.A. (2011). Distribution and phylogenetic comparisons of a novel mosquito flavivirus sequence present in *Culex tarsalis* Mosquitoes from western Canada with viruses isolated in California and Colorado. *Am J Trop Med Hyg* 85, 162-168.

Vasconcelos, P.F. (2010). Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Publica* 44, 1144-1149.

Vasconcelos, P.F., Da Rosa, J.F., Da Rosa, A.P., Degallier, N., Pinheiro Fde, P., and Sa Filho, G.C. (1991). [Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33, 465-476.

Vazquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Palacios, G., Molero, F., Reyes, N., Ruiz, S., Aranda, C., Marques, E., Escosa, R., Moreno, J., *et al.* (2011). Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 223-229.

Weaver, S.C., and Barrett, A.D. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2, 789-801.

Weaver, S.C., Kang, W., Shirako, Y., Rumenapf, T., Strauss, E.G., and Strauss, J.H. (1997). Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol* 71, 613-623.

Weaver, S.C., Powers, A.M., Brault, A.C., and Barrett, A.D. (1999). Molecular epidemiological studies of veterinary arboviral encephalitides. *Vet J* 157, 123-138.

Weaver, S.C., and Reisen, W.K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85, 328-345.

Weaver, S.C., Winegar, R., Manger, I.D., and Forrester, N.L. (2012). Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res* 94, 242-257.

Wilcox, B.A., and Colwell, R.R. (2005). Emerging and reemerging infectious diseases: biocomplexity as an interdisciplinary paradigm. *EcoHealth* 2, 244-257.

Wilder-Smith, A., Ooi, E.E., Vasudevan, S.G., and Gubler, D.J. (2010). Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep* 12, 157-164.

Zacks, M.A., and Paessler, S. (2010). Encephalitic alphaviruses. *Vet Microbiol* 140, 281-286.

Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Pattinson, J.R., Griffiths, P.D., and D., S.B. (2004). Principles and practice of clinical virology, Vol 1 (Chichester, England).

**9. ANEXOS**

---

## 9.1 Tabla general de los pools de mosquitos procesados

Pool	Departamento	Sitio	Tipo de captura	Fecha	Especie	Sexo	Cantidad	Alimentada
18	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	50	-
19	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	50	-
20	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	28	-
21	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
22	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	22	no
23	Montevideo	Unión	manual	18/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	14	no
24	Montevideo	Unión	manual	02/01/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	17	-
25	Salto	Salto09	CDC modelo 512	19/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	no
26	Salto	Salto03	CDC modelo 512	19/02/2009	<i>Psorophora sp.</i>	F	1	no
27	Salto	Salto03	CDC modelo 512	19/02/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
28	Montevideo	Buceo	manual	19/02/2009	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	6	no
29	Montevideo	Cuchilla Pereyra	manual	24/03/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	8	no
30	Montevideo	Cuchilla Pereyra	manual	24/03/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	4	-
31	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	19/03/2009	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	F	1	no
32	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	19/03/2009	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	F	1	no
33	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	19/03/2009	<i>Culex spp</i>	F	9	no
34	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	20/03/2009	<i>Mansonia titillans</i>	F	1	no
35	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	21/03/2009	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	F	1	no
36	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	22/03/2009	<i>Culex sp.</i>	M	1	-
37	Montevideo	Bañados de Carrasco	CDC modelo 512	23/03/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
38	Rivera	Rivera03	CDC modelo 512	19/04/2009	<i>Stegomyia fluviatilis</i>	F	1	no
39	Rivera	Rivera 02	manual	19/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
40	Rivera	Rivera03	CDC modelo 512	15/04/2009	<i>Culex sp</i>	F	1	no
41	Rivera	Rivera 02	manual	15/04/2009	<i>Culex spp</i>	F	7	no
42	Rivera	Rivera03	CDC modelo 512	16/04/2009	<i>Culex spp</i>	F	45	no
43	Rivera	Rivera 02	manual	16/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	4	no
44	Rivera	Rivera01	CDC modelo 512	16/04/2009	<i>Culex spp</i>	F	2	si
45	Rivera	Rivera01	CDC modelo 512	16/04/2009	<i>Culex spp</i>	M	8	-
46	Rivera	Rivera01	CDC modelo 512	16/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	14	no
47	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	30/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
48	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	30/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
49	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	30/04/2009	<i>Culex bidens</i>	F	3	no
50	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	05/05/2009	<i>Culex dolosus</i>	F	1	no
51	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	05/05/2009	<i>Culex spp</i>	F	7	no
52	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	05/05/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
53	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	05/05/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
54	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	30/04/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
55	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	04/05/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
56	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	04/05/2009	<i>Culex spp</i>	F	4	no

57	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	04/05/2009	<i>Culex spp</i>	F	5	si
58	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	04/05/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	45	no
59	Salto	Salto05	CDC modelo 512	23/11/2009	<i>Culex apicinus</i>	F	1	no
60	Salto	Salto02	CDC modelo 512	23/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	2	-
61	Salto	Salto02	CDC modelo 512	23/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	3	si
62	Salto	Salto02	CDC modelo 512	23/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	11	no
63	Salto	Salto02	CDC modelo 512	24/11/2009	<i>Psorophora ciliata</i>	F	2	no
64	Salto	Salto08	CDC modelo 512	24/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	7	no
65	Salto	Salto08	CDC modelo 512	24/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
66	Salto	Salto09	CDC modelo 512	24/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	no
67	Salto	Salto07	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	F	4	no
68	Salto	Salto07	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
69	Salto	Salto07	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	19	no
70	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	5	si
71	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	3	no
72	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	5	-
73	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	28	no
74	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	45	no
75	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
76	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
77	Salto	Salto02	CDC modelo 512	25/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	12	no
78	Salto	Salto04	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Culex coronator</i>	F	1	no
79	Salto	Salto04	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Psorophora sp.</i>	F	1	no
80	Salto	Salto02	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	6	no
81	Salto	Salto02	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	3	no
82	Salto	Salto02	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	F	1	no
83	Salto	Salto11	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
84	Salto	Salto11	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
85	Salto	Salto11	CDC modelo 512	26/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	58	no
86	Salto	Salto06	manual	26/11/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
87	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	03/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	44	no
88	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	03/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
89	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	03/12/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	3	no
90	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	03/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	1	no

91	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	03/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	39	no
92	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	04/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
93	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	04/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
94	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	04/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
95	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	04/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	24	no
96	Paysandú	Paysandú 01	manual	04/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
97	Paysandú	Paysandú02	CDC modelo 512	05/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
98	Paysandú	Paysandú02	CDC modelo 512	05/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
99	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	2	-
100	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	si
101	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
102	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
103	Paysandú	Paysandú 01	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	2	si
104	Paysandú	Paysandú 01	manual	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	M	2	-
105	Paysandú	Paysandú 01	manual	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	5	no
106	Paysandú	Paysandú 01	manual	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	4	si
107	Paysandú	Paysandú 01	manual	06/12/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	3	no
108	Paysandú	Paysandú 01	manual	06/12/2009	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	3	si
109	Paysandú	Paysandú03	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	40	no
110	Paysandú	Paysandú03	CDC modelo 512	06/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	33	no
111	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	20/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	36	no
112	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	18/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	38	no
113	Montevideo	Belvedere	CDC modelo 512	18/12/2009	<i>Culex pipiens</i>	F	5	si
114	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	09/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	36	no
115	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	09/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
116	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	09/03/2010	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
117	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	10/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	42	no
118	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	10/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
119	Canelones	Atlántida	CDC modelo 512	10/03/2010	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
120	Montevideo	Barrio Cerrito	manual	13/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	4	no
121	Montevideo	Barrio Cerrito	manual	13/03/2010	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
122	Montevideo	Barrio Cerrito	manual	13/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	2	-
123	Montevideo	Barrio Cerrito	manual	19/03/2010	<i>Culex spp</i>	F	6	no
124	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	48	no

125	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	20	no
126	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
127	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex spp</i>	F	6	no
128	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	13	no
129	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	15	no
130	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
131	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	17	no
132	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	6	no
133	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	10	no
134	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	26	no
135	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex spp</i>	F	5	no
136	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	16	no
137	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex spp</i>	F	2	no
138	Montevideo	Barrio Villa García	CDC modelo 512	24/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	25	no
139	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	8	no
140	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	37	no
141	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	3	si
142	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	11	no
143	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	27	no
144	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
145	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	3	si
146	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	24	no
147	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 512	25/03/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	37	no
148	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	3	no
149	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
150	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	26	no
151	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	2	si
152	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	10	no
153	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	3	si
154	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	17	no
155	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	13	no
156	Artigas	Artigas01	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	2	no
157	Artigas	Artigas01	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	16	no
158	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	2	si



159	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	13/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	14	no
160	Artigas	Artigas03	CDC modelo 512	14/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	15	no
161	Artigas	Artigas01	CDC modelo 512	14/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	6	no
162	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	14/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	9	no
163	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	14/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	1	si
164	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
165	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	2	no
166	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	29	no
167	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	12	no
168	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	24	no
169	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	12	no
170	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	27	no
171	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	12	no
172	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Ochlerotatus albifascatus</i>	F	1	no
173	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
174	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	12	no
175	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	6	no
176	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
177	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	11	no
178	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	3	si
179	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	20	no
180	Artigas	Artigas02	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	12	no
181	Artigas	Artigas04	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	24	no
182	Artigas	Artigas04	CDC modelo 512	15/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	20	no
183	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	17/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	3	no
184	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	17/05/2010	<i>Culex spp</i>	F	3	no
185	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	17/05/2010	<i>Ochlerotatus ...</i>	F	17	no
186	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	17/05/2010	<i>Ochlerotatus ...</i>	F	1	si
187	Canelones	Los Titanes	CDC modelo 512	17/05/2010	<i>Ochlerotatus ...</i>	F	20	no
188	Salto	Salto10	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex spp</i>	F	3	no
189	Salto	Salto10	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	8	no
190	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	18	no
191	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
192	Salto	Salto02	CDC modelo 712	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	10	si

193	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	30	no
194	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	39	no
195	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	35	no
196	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex spp</i>	F	10	no
197	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	13	si
198	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	57	no
199	Salto	Salto02	CDC modelo 512	07/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	12	no
200	Salto	Salto05	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	3	si
201	Salto	Salto05	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	22	no
202	Salto	Salto05	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	23	no
203	Salto	Salto05	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	16	no
204	Salto	Salto05	CDC modelo 512	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	25	no
205	Salto	Salto04	CDC modelo 712	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	3	no
206	Salto	Salto04	CDC modelo 712	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	17	no
207	Salto	Salto04	CDC modelo 712	06/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	10	no
208	Salto	Salto04	CDC modelo 712	06/12/2010	<i>Culex spp</i>	F	18	no
209	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	20	no
210	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	5	-
211	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	4	-
212	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	29	no
213	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	M	4	-
214	Salto	Salto01	CDC modelo 512	10/12/2010	<i>Culex pipiens</i>	F	54	no
215	Soriano	Soriano01	CDC modelo 512	25/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	14	no
216	Soriano	Soriano01	CDC modelo 712	25/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	M	3	-
217	Soriano	Soriano01	CDC modelo 712	25/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	4	no
218	Río Negro	Arrayanes	CDC modelo 512	26/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	3	no
219	Río Negro	Arrayanes	CDC modelo 712	26/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	15	no
220	Soriano	Soriano02	CDC modelo 512	26/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	5	no
221	Soriano	Soriano01	CDC modelo 512	27/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
222	Soriano	Soriano01	CDC modelo 512	27/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	11	no
223	Soriano	Soriano01	CDC modelo 712	27/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
224	Soriano	Soriano01	CDC modelo 712	27/02/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	6	no
225	Colonia	Colonia centro	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	2	no
226	Colonia	Colonia centro	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	17	no
227	Colonia	Colonia centro	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Psorophora ferox</i>	F	3	no

228	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	52	no
229	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Mansonia titillans</i>	F	8	no
230	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	18/03/2011	<i>Mansonia titillans</i>	M	1	-
231	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	19	no
232	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	17	no
233	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Mansonia titillans</i>	F	4	no
234	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Psorophora sp.</i>	F	1	no
235	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 712	19/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	51	no
236	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 712	19/03/2011	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
237	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 712	19/03/2011	<i>Mansonia titillans</i>	F	3	no
238	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	52	no
239	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Mansonia titillans</i>	F	8	no
240	Colonia	Colonia (Laguna de los Patos)	CDC modelo 512	19/03/2011	<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	F	1	no
241	Salto	Salto01	CDC modelo 512	15/04/2011	<i>Stegomyia aegypti</i>	F	6	no
242	Salto	Salto01	CDC modelo 512	15/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	1	no
243	Salto	Salto02	CDC modelo 712	15/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	4	no
244	Salto	Salto02	CDC modelo 712	15/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
245	Salto	Salto01	CDC modelo 512	16/04/2011	<i>Stegomyia aegypti</i>	F	1	no
246	Salto	Salto01	CDC modelo 512	16/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	2	no
247	Salto	Salto01	CDC modelo 712	16/04/2011	<i>Stegomyia aegypti</i>	F	4	no
248	Salto	Salto01	CDC modelo 712	16/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	5	no
249	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
250	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	25	no
251	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	51	no
252	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	50	no
253	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	30	no
254	Montevideo	Barrio Belvedere	CDC modelo 712	27/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	1	si
255	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 512	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	30	no
256	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 512	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	32	no
257	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 712	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	2	si
258	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 712	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	35	no
259	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 712	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	M	1	-
260	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 712	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	45	no
261	Montevideo	Barrio Colón	CDC modelo 712	28/04/2011	<i>Culex pipiens</i>	F	48	no

En verde se señalan los pools de mosquitos positivos obtenidos en el presente trabajo.

9.2 Tabla general con los resultados del procesamiento de los sueros de equinos.

Muestras		WEEV (Cor 87)		EEEV (Cor 55)		VEEV (TC-83)		RNV (Cor 663)		PIXV (Pixuna)	SLEV (78V6507)		WNV (E/7229/06)	
Nombre	Departamento	Tam 1:10	Tít	Tam 1:10	Tít	Tam 1:10	Tít	Tam 1:10	Tít	Tít	Tam 1:10	Tít	Tam 1:10	Tít
E07/001	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/002	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/003	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/004	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/005	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/006	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/007	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/008	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/009	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	Neg	x	x	x
E07/010	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/011	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/012	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	X
E07/013	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/014	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/015	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/016	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg		x	X
E07/017	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/018	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	X
E07/019	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/020	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	X
E07/021	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	X
E07/022	Florida	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	Neg	x	x	X
E07/023	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	X
E07/024	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/025	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/026	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/027	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/028	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/029	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/030	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/031	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/032	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/033	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/034	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/035	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/036	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/037	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Pos	1/80	NR	Neg
E07/038	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	1/40	Pos	1/10	NR	Neg
E07/039	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/040	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/041	Durazno	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/042	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/043	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/044	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/045	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/046	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/047	Rivera	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	Neg	x	x	x
E07/048	Rivera	Neg	x	Pos	1/10	Pos	NR	Pos	NR	NR	Neg	x	x	x
E07/049	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/050	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/051	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/052	Rocha	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/053	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/054	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x

E07/055	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/056	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/057	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/058	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/059	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/060	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/061	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/062	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/063	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/064	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Pos	1/80	NR	Neg
E07/065	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/066	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/067	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/068	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/069	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/070	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/071	Rivera	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/072	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/073	Rivera	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	Pos	1/20	NR	Neg
E07/074	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/075	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/076	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/077	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/078	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/079	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/080	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/081	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/082	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/083	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/084	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/085	Colonia	Neg	x	Neg	x	Pos	1/20	Neg	X	Neg	Pos	1/80	NR	Neg
E07/086	Colonia	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	X	Neg	Neg	x	x	x
E07/087	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/088	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/089	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/090	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/091	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/092	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/093	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/094	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/095	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/096	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/097	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/098	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/099	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/100	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/101	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/102	Cerro Largo	Pos	1/80	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/103	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/104	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	1/10	Pos	1/20	NR	Neg
E07/105	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/106	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/107	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	1/20	Neg	x	x	x
E07/108	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/109	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/110	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/111	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/112	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/113	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/114	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x

E07/115	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/116	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	x	NR	Neg
E07/117	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/118	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/119	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/120	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/121	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/122	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/123	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/124	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/125	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/126	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/127	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/128	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/129	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/130	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/131	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Pos	1/40	NR	Neg
E07/132	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/133	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/134	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/135	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/136	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/137	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/138	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/139	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/140	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/141	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/142	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	>1/80	NR	Neg
E07/143	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/144	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	>1/80	NR	Neg
E07/145	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/146	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/147	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/148	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/149	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/150	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/151	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/152	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/153	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/154	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/155	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/156	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/157	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	-	x	x
E07/158	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/80	NR	Neg
E07/159	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/160	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/161	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/162	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/163	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/164	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/165	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	NR	Neg
E07/166	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/167	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/168	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/169	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/170	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/171	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/172	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/173	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/20	NR	Neg
E07/174	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x

E07/175	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/176	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	>1/80	NR	Neg
E07/177	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/178	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/40	NR	Neg
E07/179	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/180	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	x	x
E07/181	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	>1/80	NR	Neg
E07/182	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos		Neg	x
E07/183	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	Neg	x
E07/184	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Neg	x	Neg	x
E07/185	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	X	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/186	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	Neg	x
E07/187	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/20	Neg	Neg	x	Neg	x
E07/188	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/160	Neg	Pos	1/10	Neg	x
E07/190	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/191	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	Neg	x
E07/192	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/193	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/194	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/195	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/196	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/197	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/198	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/199	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/200	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/201	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/202	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/203	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/204	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Pos	1/20
E07/205	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/206	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/207	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/208	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/209	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/210	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	Pos	1/10
E07/211	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	Pos	1/10
E07/212	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/213	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/214	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/215	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/216	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/217	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/218	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/219	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/220	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/221	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/222	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/223	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/224	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/225	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/226	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/227	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/228	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/229	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/230	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Pos	1/10	Neg	x
E07/231	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/232	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/233	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/234	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/235	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x

E07/236	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/237	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/238	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/239	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/240	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/241	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/242	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/243	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/244	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/245	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	Pos	1/10
E07/246	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/247	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Pos	1/80	Neg	x	Neg	Pos	1/10	Neg	x
E07/248	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/249	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/250	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/251	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/252	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/253	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/254	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/255	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/256	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/257	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/258	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Pos	1/80	Neg	x	Neg	Neg	x	x	x
E07/259	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/260	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/261	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/262	Artigas	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/263	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/264	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/265	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/266	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/267	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/268	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/269	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/270	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/271	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/272	Colonia	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/273	Flores	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/274	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Pos	1/10
E07/275	Florida	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/276	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/277	Maldonado	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/278	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/279	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/280	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/281	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/282	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/283	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/284	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/285	Tacuarembó	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/286	Rivera	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/287	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	Pos	1/10
E07/288	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/289	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/290	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/291	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/292	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/293	Canelones	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	-	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/294	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/295	Cerro Largo	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x





E07/357	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/358	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/359	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/360	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/361	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/362	Paysandú	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Pos	1/10	Neg	x
E07/363	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/364	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos		x	Pos	1/10	Neg	x
E07/365	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/366	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/367	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/368	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/369	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Pos	1/40	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/370	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/371	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/372	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/373	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/374	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Pos	1/10	Neg	Neg	x	x	x
E07/375	Río Negro	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/376	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/377	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/378	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/379	Rocha	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/380	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/381	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/382	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/383	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/384	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/385	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/386	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/387	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/388	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/389	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/390	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/391	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/392	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/393	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/394	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/395	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/396	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/397	Salto	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/398	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/399	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/400	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/401	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/402	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/403	San José	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/404	San José	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/405	Soriano	Neg	x	Pos	1/10	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/406	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/407	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/408	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/80	Pos	1/10
E07/409	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/410	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/411	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/412	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/413	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/414	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
E07/415	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
E07/416	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x

<b>E07/417</b>	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/418</b>	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/419</b>	Soriano	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/420</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/421</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/40	Pos	1/10
<b>E07/422</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/423</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/424</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
<b>E07/425</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Neg	x	x	x
<b>E07/426</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x
<b>E07/427</b>	Treinta y Tres	Neg	x	Neg	x	Neg	x	Neg	x	x	Pos	1/10	Neg	x

Abreviaturas: EEEV: virus de la encefalitis equina del este; Neg: muestra no reactiva en el tamizaje; NR: no se realiza; PIXV: virus Pixuna; Pos: muestra reactiva en el tamizaje; RNV: virus Río Negro; SLEV: virus de la encefalitis de San Luis; Tam: tamizaje; Tít: Título; VEEV: virus de la encefalitis equina venezolana, WEEV: virus de la encefalitis equina del oeste; x: no corresponde realizar. Entre paréntesis de los virus ensayados se encuentra el nombre de la cepa utilizada.

## 9.3 Artículo del caso fatal de WEEV.

### LETTERS

be a potential hazard for invading species. Avian malaria should therefore be considered a threat for exotic parrots in Europe until results of further epidemiologic and experimental studies are available. Because many European bird species have been introduced to the native range of the psittacines studied here, a concern has been expressed that these parasites already have become established in these areas and are affecting the natural populations.

**Philipp Olias, Maria Wegelin,  
Wolfgang Zenker,  
Sabrina Freter,  
Achim D. Gruber,  
and Robert Klopffleisch**

Author affiliations: Freie Universität, Berlin, Germany (P. Olias, S. Freter, A.D. Gruber, R. Klopffleisch); IDEXX Diavet Labor, Bäch, Switzerland (M. Wegelin); and Animal Clinic Neuwiesen, Uster, Switzerland (W. Zenker)

DOI: 10.3201/eid1705.101618

### References

1. Atkinson CT, van Riper C III. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In Loya JE, Zuk M, editors. Bird-parasite interactions. Ecology, evolution, and behavior. New York: Oxford University Press; 1991. p. 19–48.
2. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol*. 2008;47:261–73. doi:10.1016/j.ympev.2007.11.012
3. van Riper C III, van Riper SG, Goff ML, Laird M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol Monogr*. 1986;56:327–44. doi:10.2307/1942550
4. Scheuerlein A, Ricklefs RE. Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proc Biol Sci*. 2004;271:1363–70. doi:10.1098/rspb.2004.2726
5. Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW. Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *J Nat Hist*. 1993;27:993–1001. doi:10.1080/00222939300770621
6. Stidworthy MF, Greenwood AG. Deaths in aviary birds associated with protozoal megaloschizonts. *Vet Rec*. 2006;159:606. doi:10.1136/vr.159.18.606
7. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol*. 2004;90:797–802. doi:10.1645/GE-184R1
8. Krizanauskienė A, Hellgren O, Kosarev V, Sokolov L, Bensch S, Valkiūnas G. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. *J Parasitol*. 2006;92:1319–24. doi:10.1645/GE-873R1
9. Ricklefs RE, Fallon SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc Biol Sci*. 2002;269:885–92. doi:10.1098/rspb.2001.1940
10. Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J. Malavi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resources*. 2009;9:1353–8. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x

Address for correspondence: Philipp Olias, Department of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 15, 14163 Berlin, Germany; email: olias.philipp@vetmed.fu-berlin.de

## Fatal Human Case of Western Equine Encephalitis, Uruguay

**To the Editor:** The genus *Alphavirus* (family *Togaviridae*) comprises 29 viral species (1), grouped in at least 7 antigenic complexes by their serologic cross-reactivity (2). They are maintained in nature through enzootic cycles involving arthropods as vectors with subsequent amplification in small mammals or birds, and epizootic cycles between mosquitoes and large mammals such as horses or humans.

Few reports have been made of the circulation of alphaviruses in Uruguay. A serologic study conducted in 1970

found antibodies to western (WEEV) and eastern equine encephalitis viruses by using complement fixation and hemagglutination inhibition tests in serum specimens from children (3). In 1972–1973, epizootics in horses caused by WEEV were reported in Argentina and Uruguay, and WEEV was isolated from a sick horse (4).

We report a fatal case of viral encephalitis in April 2009 in Montevideo, Uruguay, in a previously healthy 14-year-old boy. Four days before he sought treatment, he had fever, asthenia, and headaches. At hospital admission (April 12, 2009), he was febrile and without neurologic signs; amoxicillin treatment was initiated. Results of a computed tomography scan of the brain were normal.

On day 1, headache, vomiting, neck stiffness, and partial left seizures on the left side developed. Also exhibited were consciousness depression (Glasgow Coma Scale 12 points), hyperreflexia, and bilateral Babinski sign. A cerebrospinal fluid (CSF) sample was negative for bacteria in cultures. An electroencephalogram showed diffuse brain suffering. The patient was brought to the intensive care unit with a clinical diagnosis of viral encephalitis. Over the next 24–36 hours, intracranial hypertension developed, and medical treatment was given (sedation, hyperventilation, mannitol, and barbiturates). Consciousness depression progressed to a deeper level, and a computed tomography scan of the brain showed dilatation of the temporal ventricles and compression of the peritroncal and sylvian cisterns. During the next 48 hours, the coma level went deeper, reaching 6 on the Glasgow Scale. Another CSF specimen was taken, and PCR results were negative for herpesvirus and enterovirus. Glasgow Coma Scale level was 3 on April 15, and a decompressive craniectomy was done. Seventy-two hours after admission, the patient died.

The patient's plasma and CSF were tested for antibodies to dengue and West Nile viruses (immunoglobulin M and G) through ELISA (Focus Technologies, Cypress, CA, USA) and for St. Louis encephalitis and dengue virus by M antibody-capture-ELISA (5). RNA was extracted from plasma and CSF, followed by a generic nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) for flaviviruses (6). Serologic and molecular test results were negative for the above-mentioned pathogens. Then we performed a generic nested RT-PCR (7), which amplifies 448 bp at first round and 195 bp (second round) of the alphavirus NSP4 gene. Also, a heminested PCR was done (products 372 bp and 303 bp); RNA from Venezuelan equine encephalitis virus Tc-83 (provided by M. Contigiani, Universidad de Córdoba) was used as positive control. The target region is informative enough to allow the precise identification of the most relevant alphaviruses by sequencing and phylogenetic analysis. Alphavirus genome amplification was achieved for the CSF specimen collected at admission to the hospital. Plasma and a second CSF specimen were PCR negative. To confirm these findings, another nested RT-PCR reaction targeting the NSP1 gene was done as described previously (8). A 208-bp amplicon, which corresponded to the expected size for WEEV, was obtained from plasma and the first CSF specimen.

Sequence analyses were conducted on the NSP4 fragments. Maximum likelihood (9) and Bayesian (10) phylogenetic analyses gave similar results. The Figure, panel A, shows that sample LCR/09-303 is part of a well-supported clade (aLRT = 0.99), which groups WEEVs. The sequence LCR/09-303 is a sister taxon to sequences GQ287641 and GQ287642, with poor support (Figure, panel B) (online Appendix Table; [www.cdc.gov/EID/content/17/5/952-app1.htm](http://www.cdc.gov/EID/content/17/5/952-app1.htm)). These are reference

WEEV USA strains (Imperial and Kern) obtained from *Culex tarsalis* mosquitoes. Our sample and the mentioned sequences are part of a well-supported clade (aLRT = 0.85), together with GQ287645, AF214040, and FJ786260. These are also USA strains; 2 were isolated from infected

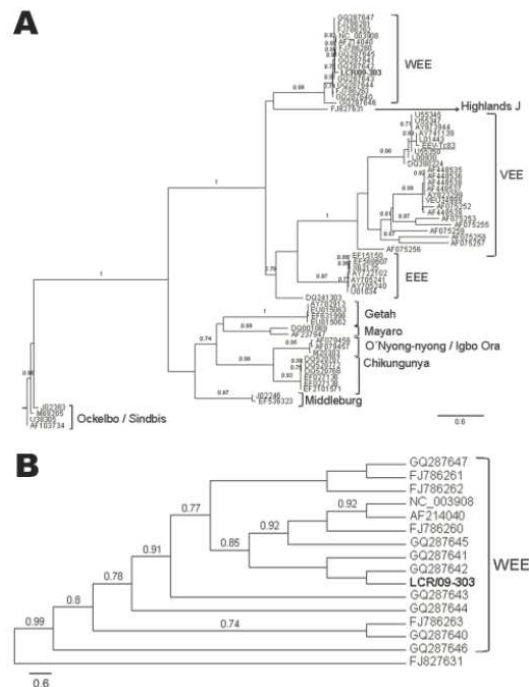


Figure. A) Phylogenetic tree obtained by maximum likelihood analysis of sequences corresponding to the alphavirus NSP4 gene. Alignment used in the analysis had 448 bp and was conducted by using BioEdit software version 7.0.9.0 ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html)). Estimation of the suitable model of nucleotide substitution was carried out by using Modelgenerator (<http://bioinf.may.ie/software/modelgenerator>). Phylogenetic analysis was run on the PhyML web server ([www.atgc-montpellier.fr/phyml](http://www.atgc-montpellier.fr/phyml)), with the following settings: nucleotide substitution model: general time reversible + proportion in variant +  $\Gamma$ ; proportion of invariable sites: 0.39; gamma distribution parameter  $\alpha$ : 0.67; node support: approximate likelihood-ratio test (only values over 0.70 are shown). Sequences included in the analysis were the following: human encephalitis case-patient; LCR/09-303 (**boldface**); reverse transcription-PCR positive control (Venezuelan equine encephalitis virus [VEEV]-Tc83) (282 nt); FJ786261; western equine encephalitis virus (WEEV): AF214040, GQ287647, GQ287646, GQ287645, GQ287644, GQ287643, GQ287642, GQ287641, GQ287640, FJ786263, FJ786262, FJ786260, NC003908; Highlands J virus, FJ827831; Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), L01443, DQ390224, AF075255, AY823299, AF448539, AF448538, AF448537, AF448536, AF448535, AF075252, U34999, AF075259, AF075256, AF075253, AF075257, AF075258, AY973944, L00930, AY741139, U55350, U55347, U55345; eastern equine encephalitis virus (EEEV), AY722102, U01034, EF568607, EF15150, AY705241, AY705240, X63135, DQ241303; Getah virus, EU015063, EU015062, EF631999, AY702913; Mayaro virus, AF237947, DQ001069; M20303; O'nyong-nyong virus, AF079456; Igbo Ora virus, AF079457; chikungunya virus, EF210157, EF027138, EF027136, DQ520772, DQ520768, DQ520767; Middleburg virus, EF536323, J02246; Ockelbo virus, M69205; Sindbis virus, AF103734, U38305, J02363, M69205. B) Detail of the WEEV clade, showing the relationships between the sample LCR/09-303 and the rest of the WEEVs included in the analysis. Scale bars indicate expected nucleotide changes per site.

## LETTERS

horses and 1 from *Cx. tarsalis* mosquitoes. Notably, our sequence is distantly related to GQ287646, which was isolated from *Culex* spp. mosquitoes in Chaco, Argentina. The nucleotide sequence of the positive control VEEV-Tc83 is correctly placed in the VEEV clade.

Clinical and laboratory findings showed that the illness described here was compatible with viral encephalitis. Using a generic RT-PCR assay on an early CSF sample, we amplified a partial sequence (NSP4 gene) of an alphavirus. Phylogenetic analyses showed that the patient's sequence grouped with sequences from WEEV, with high statistical support. A second RT-PCR assay on the NSP1 gene enabled us to obtain an amplification of 208 bp, which is consistent with the expected size for WEEV. Therefore, we concluded that the fatal disease was likely caused by WEEV. Since the 1970s, to our knowledge, the presence of WEEV (or other alphaviruses) in Uruguay has not been documented. Moreover, no recent reports have been made of genome detection of WEEV in encephalitis cases in the region.

Although the case described here may be rare, the etiology of many viral encephalitides in Uruguay remains unknown. Serologic studies in horses and studies to detect arboviruses in mosquito populations are being conducted to investigate the status of arbovirus infections in Uruguay.

### Acknowledgments

We thank José C. Russi for his invaluable scientific advice and encouragement during all the stages of this work and Gabriela Algorta for her help and interest in our research.

**Adriana Delfraro,  
Analía Burgueño, Noelia Morel,  
Gabriel González, Alicia García,  
Juan Morelli, Walter Pérez,  
Héctor Chiparelli,  
and Juan Arbiza**

Author affiliations: Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (A. Delfraro, A. Burgueño, J. Arbiza); Ministerio de Salud Pública, Montevideo (N. Morel, H. Chiparelli); and Hospital Británico, Montevideo (G. González, A. García, J. Morelli, W. Pérez)

DOI: 10.3201/eid1705.101068

### References

1. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Philadelphia: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Griffin DE. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology, 5th ed. vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
3. Somma Moreira RE, Campione-Piccardo J, Russi JC, Hortal de Giordano M, Bauzá CA, Peluffo G, et al. Arbovirus en el Uruguay. Arch Pediatr Urug. 1970;41:359-63.
4. Acha P, Szyfres B. Clamidirosis, rickettsiosis y virosis. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, 3rd ed., vol. 2. Washington: World Health Organization; 2003. p. 425.
5. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. J Clin Microbiol. 2000;38:1823-6.
6. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. J Virol Methods. 2005;126:101-9. doi:10.1016/j.jvromet.2005.01.025
7. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. J Virol Methods. 2001;95:153-61. doi:10.1016/S0166-0934(01)00306-8
8. Bronzoni RVM, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol. 2005;43:696-702. doi:10.1128/JCM.43.2.696-702.2005
9. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 2003;52:696-704. doi:10.1080/10635150390235520
10. Ronquist F, Huelsenbeck JP, van der Mark P. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny, v. 3.1. 2005 [cited 2010 Jul 1]. <http://mrbayes.csit.fsu.edu>

Address for correspondence: Adriana Delfraro, Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay; email: [adriana@fcien.edu.uy](mailto:adriana@fcien.edu.uy)

## Widespread Availability of Artemisinin Monotherapy in the United States

**To the Editor:** Artemisinin-based combination therapies are recommended as first line treatments for *Plasmodium falciparum* malaria in most areas of the world. The article by Shahinas et al. (1) describes a patient who had *P. falciparum* malaria after returning from Nigeria. Her isolate had an elevated 50% inhibitory concentration to artemisinin derivatives. She had obtained artesunate in Nigeria and took it weekly for malaria prophylaxis, which might have contributed to the relative resistance found.

In 2009, one artemisinin-based combination therapy (artemether/lumefantrine) became available for use in the United States. However, it is not widely appreciated that artemisinin is actually available in the United States as an herbal supplement for over-the-counter purchase (2). It is marketed for general health maintenance and for treatment of parasitic infections and cancers (Figure), although as with other supplements it is not intended to diagnose, treat, cure, or prevent any disease. As in the patient described by Shahinas et al., widespread use

#### **9.4 Artículos en proceso de redacción.**

Burgueño A, Cabrera A, Martínez M, Berois M, Arbiza J, Delfraro A. *Culex Flavivirus detection in Uruguay.*

Burgueño A, Spinsanti L, Díaz L, Rivarola E, Contigiani M, Arbiza J Delfraro A. *Seroprevalence of Saint Louis encephalitis virus in asymptomatic horses, Uruguay.*