

Determinación electroforética del genoma de un virus asociado a encefalitis equina en el departamento de San Martín

Ana Hurtado Alendes, M.Sc.¹, Dra. Rosario Méndez López² y Ricardo Fujita, Ph.D.³

RESUMEN

La encefalitis equina es una enfermedad viral que afecta el sistema nervioso de caballos y otros mamíferos (incluyendo humanos). Desde 1984 se han detectado varios casos en el departamento de San Martín con sintomatología e histopatología semejantes a los alfavirus (genoma de 1 segmento de RNA), sin embargo los estudios serológicos y caracterización de microscopía electrónica sugerían la presencia de un orbivirus (genoma de 10 segmentos de RNA). Hipótesis inesperada por la ausencia de orbivirus asociados con encefalitis equina en el nuevo continente. El objetivo principal del proyecto es dilucidar a nivel molecular e identificar la naturaleza del virus asociado a la encefalitis equina en el departamento de San Martín. Utilizando las técnicas de electroforesis se determinó con mayor precisión el tipo de virus involucrado. Los análisis de ARN de aislamientos virales de animales enfermos y sanos colectados en 1997 de una zona endémica y de animales aparentemente sanos colectados en 2002 de la misma zona confirmaron que el genoma está constituido por 10 segmentos de ARN de cadena doble correspondiente al género orbivirus de la Familia de los Reoviridae. Estos datos determinan que el virus aislado en el departamento de San Martín es un orbivirus y que además es el primero causando encefalitis equina en Sudamérica.

Palabras claves: Encefalitis equina, orbivirus, electroforesis, análisis de genoma viral.

ABSTRACT

The equine encephalitis is a viral disease that affects nervous system of horses and other mammals (including humans). From 1984 several cases with symptomatology and histopathology similar with Alphavirus (1 segment RNA genome) have been detected in San Martin Department, nevertheless serology studies and characterization of elec-

tronic microscopy indicated compatibility with an orbivirus (10 segment RNA genome). The molecular characterization using electrophoresis will unequivocally determine the type of virus. The RNA analysis of viral isolations from healthy and ill animals collected in 1997 of an endemic zone and animals apparently healthy collected in 2002 from the same zone confirmed that the viral genome is constituted by 10 segments of RNA corresponding to orbivirus genus of the Family Reoviridae. These data reveal that the virus isolated in the San Martin Department is an orbivirus, the first one associated to equine encephalitis in the South America.

Key words: Equine encephalitis, orbivirus, electrophoresis, viral genome analysis.

INTRODUCCIÓN

Se asumía que la encefalitis equina en Sudamérica era causada sólo por los alfavirus: Eastern encephalomyelitis virus, Western encephalomyelitis virus y el Venezolano encephalomyelitis virus^{1,2,7,3}. En el departamento de San Martín se reportaron casos de encefalitis equina con síntomas e histopatología de Alfavirus desde el año 1984, ocurriendo la epizootia más severa en 1997, con la muerte de alrededor de un centenar de caballos⁶. Sorpresivamente, la caracterización serológica y de microscopía electrónica de necropsias de animales afectados indican que este virus no corresponde a los Alfavirus. En estudios paralelos de serología cruzada con el orbivirus de la lengua azul (BTV) realizados en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación (FMH, USMP) y de microscopía electrónica en el laboratorio del Servicio Veterinario de la Universidad de Iowa, Iowa, Estados Unidos, sugieren que este virus pertenece al género Orbivirus; pero de una cepa desconocida⁶. Esta ambigüedad ha impedido su correcta caracterización y en caso de una futura epidemia, afectará la toma de una decisión rápida

¹ Centro de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP).

² Laboratorio de Microbiología (FMH-USMP). Correspondencia: rfujita@rcp.net.pe ³ Centro de Genética y Biología Molecular Fac. Med. U.S.M.P.

y adecuada para su control, con vacunas y estrategias ad-hoc para evitar su diseminación. A nivel molecular se puede diferenciar ambos géneros ya que los alfavirus tienen un genoma de un segmento de RNA de doble hebra; mientras que los orbivirus tienen un genoma de 10 segmentos de RNA de doble hebra.

La encefalitis equina es un problema económico potencial no sólo restringido a la zona de San Martín; pues hay el peligro que se propague a otras zonas del territorio nacional y afecte la crianza y exportación de ejemplares como caballos de carrera y de paso. Además existe la posibilidad que algunos mutantes de este virus pasen a otras especies, incluyendo a la humana. Ya se ha encontrado el mismo virus en ovinos y bovinos y posiblemente se encuentren en otros reservorios domésticos y silvestres⁶. En caso de epizootia, será importante detectar y determinar a tiempo la cepa para aplicar una estrategia adecuada de control.

La forma tradicional de determinar el serotipo es inoculando el aislamiento del virus en cerebro de ratones neonatos y en cultivo de células para luego efectuar el test de neutralización de placas. El tiempo mínimo en estos tests es de dos semanas; pero frecuentemente duran mucho más⁹. Recientemente se han propuesto pruebas específicas de grupo que permiten recortar el tiempo hasta un día, sea por la utilización de ELISA, caracterización electroforética o por la técnica de RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)⁹. El RT-PCR en combinación con la técnica de secuenciación, puede determinar con bastante resolución el tipo de virus así como los cambios sutiles en su genoma, que pasan desapercibidos con otras técnicas como las inmunológicas.

La hipótesis planteada aquí es que el virus asociado a la encefalitis equina de San Martín es del género Orbivirus y proponemos la caracterización molecular de su genoma con la técnica de electroforesis. De esta manera se determinará de forma definitiva e inequívoca el tipo de virus causante de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de las muestras de sangre de equinos

Entre los meses de febrero a agosto de 1997 se colectaron muestras de cerebro de caballos con síntomas de encefalitis en las provincias de Moyobamba y Mariscal Cáceres; también muestras de sangre de otros animales con síntomas como ovinos de la misma región y bovinos (Rioja), así como de vectores Culicoides en la provincia de Moyobamba.

En la semana del 3 al 7 de junio de 2002, al final de la época de lluvia (que es cuando aparecen los brotes), se realizó la colección de 60 muestras de sangre de ganado equino asintomático en varios distritos de las provincias de



Fig. 1. Distritos muestreados en las provincias de Rioja, Moyobamba, El Dorado y Mariscal Cáceres en el Departamento de San Martín.

Rioja, Moyobamba, Mariscal Cáceres y El Dorado (Fig. 1).

Se colectaron aprox. 5 ml. de sangre periférica de equinos en tubos vacutainer que contenían un anticoagulante (EDTA), y 5 ml. en tubos vacutainer sin anticoagulante. Las muestras colectadas en tubos con anticoagulante fueron utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos totales que serán útiles para el diagnóstico molecular y las muestras sin anticoagulante fueron utilizadas para el aislamiento viral.

Medio de cultivo celular

Después de probar varios medios de cultivo celular y varios porcentajes de suero bovino fetal se utilizó el medio de cultivo 199 y 10% de SBF para sembrar las células de mosquito C6/36, que se incubaron a 28°C hasta obtener monocapa de células. Se recuperaron los aislamientos de

la epizootia de 1997 almacenadas a -70°C , inoculando 200 ul del aislamiento correspondiente. Se evaluaron por 7 días o hasta observar efecto citopático.

Aislamiento viral

El aislamiento del virus de las muestras colectadas en el año 2002 se llevó a cabo en células C6/36 de mosquito. Se filtraron las muestras de coágulo maceradas con medio de cultivo en una proporción 1:1 utilizando filtros Millipore de $0.2\mu\text{M}$ y se inocularon 200 ul de las muestras filtradas en frascos de cultivos celulares de mosquito C6/36 de capacidad de 25 ml, cada muestra se inoculó por duplicado.

Se realizó un registro diario de la lectura de los cultivos celulares en busca del efecto citopático característico del aislamiento tipo (denominado 4020-97), comparando con los cultivos normales por un total de dos semanas y fueron guardados a -70°C para la realización de un pasaje ciego del pool de los dos frascos por muestra.

Se realizó un pasaje general a nuevos cultivos celulares de C6/36 para ser observados microscópicamente por otras dos semanas. Se continúan los pasajes sólo en las muestras que den indicios positivos, luego se guardan a -70°C para la extracción del ARN. Para la titulación del virus, las muestras positivas se inocularon en cultivos celulares de C6/36 en diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ para determinar cualitativamente la cantidad de virus presente por muestra.

Extracción del ARN viral

Para la estandarización del método de extracción del ARN se seleccionó a la cepa tipo 4020-97 y se probaron varios métodos de extracción^{13,2,4,1}.

Los medios de cultivos celulares inoculados y congelados a -70°C fueron descongelados y repartidos en tubos de centrifuga para rotor JA 20.1, aproximadamente 5 ml. por tubo. Se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos de ultracentrifuga para rotor R-65 para ser centrifugados nuevamente a 55,000 rpm por 150 minutos. El pellet fue utilizado para la extracción del ARN, según la metodología de Chomczynski y Sacchi² con algunas modificaciones. Se le adicionó 300 ul del buffer denaturante (4M guanidina, 25mM citrato de sodio, 0.5% sarkosyl) y 0.1% de 2 mercaptoetanol. Se le adicionó 1/10 de acetato de sodio 2M y 2 vol. de fenol saturado en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC): cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), se incubó sobre hielo por 15 min. y se centrifugó a 12,500 rpm por 5 min. Se le adicionó 1 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico y se volvió a centrifugar. Se le agregó 1 vol. de isopropanol, se incubó a -20°C por 1.5 horas y se centrifugó a 12,500 rpm por 15 min. Se resuspendió en 100 ul de la solución tampón denaturante, se volvió a precipitar con isopropanol a -20°C por toda la noche y se volvió a

centrifugar. Al final de la extracción el pellet fue resuspendido en 30 ul de agua destilada estéril tratado con DEPC.

Caracterización del tamaño y componentes del genoma viral

La electroforesis en geles de agarosa se realizó siguiendo los procedimientos rutinarios de análisis de ácidos nucleicos de Sambrook y col.¹⁰. Se corrieron 5 ul de las muestras en geles de agarosa al 1% preparados con TBE 1X-DEPC. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio 0.5 ug/ml y las bandas fueron visualizadas sobre un transiluminador u.v.

RESULTADOS

Caracterización de aislamientos virales de 1997, que inducen efecto citopático

Los mejores resultados fueron obtenidos con el medio 199 más 10% de suero bovino fetal inactivado. Las células C6/36 en crecimiento fueron inoculadas con 17 aislamientos de virus procedentes de animales enfermos y sanos colectados en el año 1997, se evaluó por 7 días hasta observar el efecto citopático 4+ correspondiente al prototipo 4020-97 (Fig. 2).

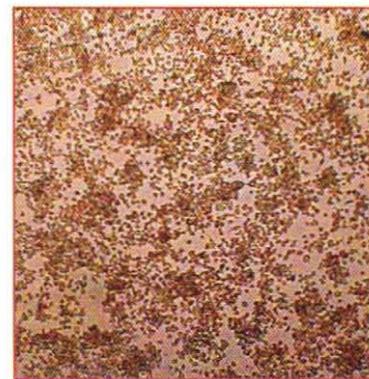


Fig. 2. Efecto citopático 4+ en células de mosquito C6/36 inoculadas con el aislamiento 4020-97.

Sólo 14 aislamientos mostraron efecto citopático indicando presencia viral, de los cuales se cosecharon aquellos cultivos celulares que presentaron efecto citopático 4+ y se guardaron a -70°C para posteriormente proceder a la extracción del ARN. Los aislamientos que se seleccionaron para la extracción del ARN fueron:

- 4856 Piura P5 (4+), J014 cerebro S.M. P2 (4+), CR004 P4 (4+), Bovino Rioja (4+)? Animales enfermos
- 4020 P24 (4+)? Animal sano
- 6002 P2? Control densovirus
- Control de células de mosquito P72

Lugar (Provincia)	Número de positivos/muestra total
Rioja	1/15
Moyobamba	1/15
El Dorado	2/15
Mariscal Cáceres	0/15
Total de positivos	4/60

Tabla 1. Resultados del aislamiento viral de las muestras colectadas en el departamento de San Martín en 2002.

Caracterización de aislamientos de 2002 muestran presencia de virus latentes en animales sanos

Las muestras colectadas en el año 2002 fueron inoculadas sobre la monocapa de células de mosquito C6/36 mantenidas en medio de cultivo celular 199 enriquecidas con 10% de suero bovino fetal. El efecto citopático se observó a los 7 días después de la inoculación (Fig. 2). Los resultados se muestran en la Tabla N° 1.

Dos métodos fueron los que dieron los mejores resultados (Fig. 3), el método basado en la extracción con isotiocianato de guanidina² y el método utilizando el Trizol (Invitrogen), seleccionándose al primero por su versatilidad y bajo costo.

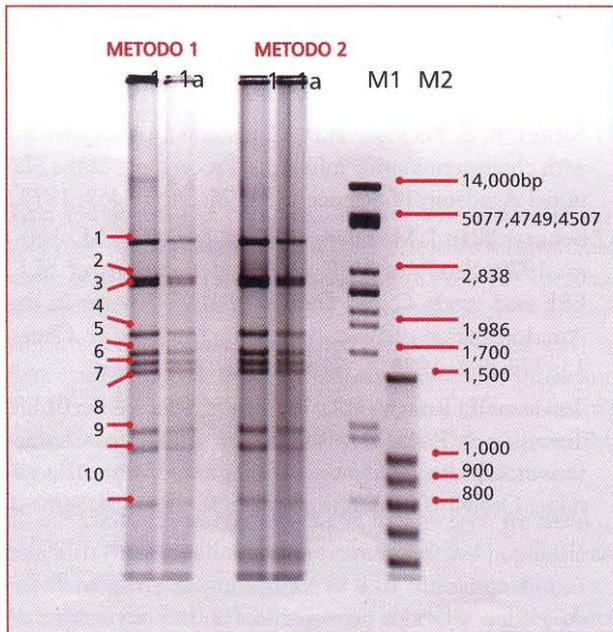


Fig. 3. Electroferotipo de la cepa tipo 4020-97 utilizando dos métodos de extracción de ARN. Método 1=Guanidina, Método 2=Trizol

Utilizando el método de extracción con isotiocianato de guanidina se evaluaron otras muestras colectadas en el año 1997 (5 muestras) y 2002 (2 muestras). En la figura 4 se evidencia que los electroferotipos de las muestras colectadas en el año 1997 son los mismos que las muestras colectadas en el año 2002 de animales asintomáticos. Los patrones electroforéticos con 10 fragmentos de ARN de doble cadena confirman que las muestras de virus aisladas en el año 1997 y 2002 son orbivirus (Fig. 4).

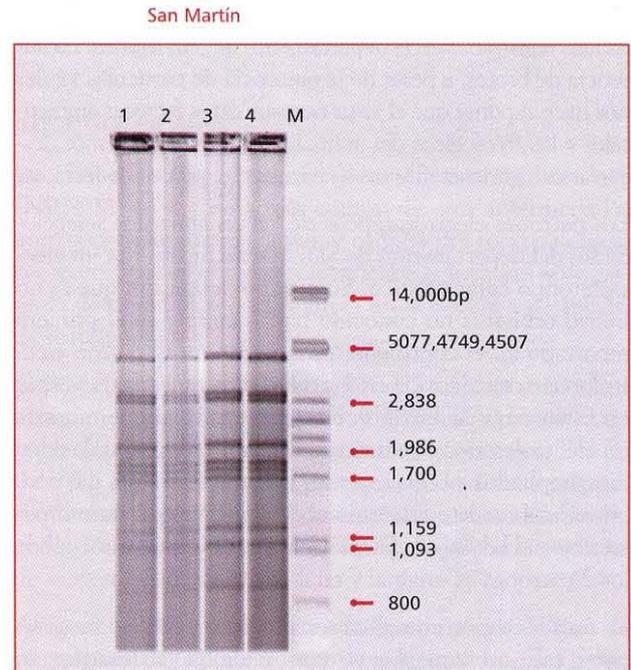


Fig. 4. Electroferotipos de las muestras colectadas en el año 1997 y 2002 en el departamento de San Martín. 1=4020, 2=J014, 3=9R, 4=6D.

DISCUSIÓN

La caracterización molecular de los virus causantes de enfermedades nos permite identificar rápidamente el tipo de patógeno involucrado, esto es importante porque determinará la estrategia para decidir de forma rápida y acertada las medidas a tomar, dependiendo de la naturaleza del virus. La técnica molecular, como la caracterización electroforética, cumple este requisito porque permite en este trabajo dilucidar entre un alfavirus, cuyo genoma tiene un segmento de simple cadena de RNA con un orbivirus de 10 segmentos de doble cadena.

Si bien no hay pruebas biológicas de causalidad directa entre el nuevo orbivirus descrito aquí y la encefalitis equina, su presencia en cultivos derivados de sangre y cerebro de animales

afectados inducen a pensar que es un factor asociado a la enfermedad. Por ejemplo, la presencia de partículas virales en el cerebro de un caballo (J014) apoyaría la hipótesis que el virus se encuentra asociado a la encefalitis equina. Otros orbivirus han sido relacionados con enfermedades en artiodáctilos como el virus que causa "Hemorragia Epizootica en Venados" (epizootic hemorrhagic disease of deer) y la "Enfermedad Africana de Caballos" (African Horse sickness). Estudios futuros deben incluir inoculación a equinos y otros artiodáctilos para un seguimiento clínico en diferentes condiciones de stress similares a las que desencadenaron las epizootias registradas en el departamento de San Martín. La ausencia de brotes, a pesar de la presencia de partículas virales nos hace suponer que el virus necesita otros factores ambientales y los fisiológicos del animal. Aunque no podemos descartar categóricamente un alfavirus en el proceso infeccioso.

Los patrones electroforéticos de los aislamientos seleccionados del departamento de San Martín mostraron un electroferotipo característico. Su estudio demuestra que es un nuevo orbivirus no conocido hasta ahora y es el primero reportado en el continente sudamericano. El patrón electroforético es idéntico en las diferentes muestras, excepto en la muestra de bovino colectado en Rioja que muestra un electroferotipo ligeramente diferente. Avances de estudios ampliados a otras regiones nos muestran que hay otro orbivirus presente en equinos de Piura con el mismo patrón que el bovino de Rioja. Quedaría a demostrar cuál de los 2 patrones es original y cuál deriva del otro.

La secuenciación completa sería imprescindible para comparar este orbivirus nuevo con aquellos ya descritos en otras regiones (BTV, o la Hemorragia Epizootica en Venados) y ver sus relaciones filogenéticas. Además el clonamiento de los fragmentos completos sería de mucho interés para iniciar estudios de expresión de proteínas para la obtención de vacunas recombinantes.

Ana Hurtado Alendes
 Facultad de Medicina Humana
 Universidad de San Martín de Porres

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Billinis, Ch., M. Koumbati, V. Spyrou, K. Nomikou, O. Mangana, Ch. A. Panagiotidis; Ana Hurtado A Fac. Med. USMP. Papadopoulos. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *J. of Virol. Methods* 98: 77-89; 2001.
- 2 Chomczynski, P. ; N. Sacchi. Single-step method by RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159; 1987.
- 3 Griffin, D.E. Alfavirus pathogenesis and immunity. In Schlesinger S., Schlesinger M.J. eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York.: 209-249; 1986.
- 4 Koekemoer, J.J.O., A.C. Potgieter, J.T. Paweska; A.A. Van Dijk.. Development of probes for typing African horsesickness virus isolates using a complete set of cloned VP2-genes. *J. of Virol. Methods* 88: 135-144; 2000.
- 5 Méndez, R., A. Hurtado, R. Fujita, C. Calisher. A novel orbivirus associated with equine meningoencephalitis in the subtropical upper jungle of Perú. En preparación; 2005.
- 6 Méndez, R. Prevalencia de anticuerpos VEE y EEE en población humana y equina de la selva peruana.. *Revista Horizonte Médico*(1-2): 48-54; 2002.
- 7 Méndez M.R., F. Bullon, G. Calderón, S. Sánchez; F. Sipan. Brote de Encefalitis equina del Este en el Departamento de San Martín – Perú 1979. *Bol. Del Instituto Nacional de Salud* 3(3): 108-112; 1982.
- 8 Roy, P, Ritter Jr., G.D., Akashi, H., Collison E. ; Inaba Y. A genetic probe for identifying bluetongue virus infections in vivo and in vitro. *Journal of General Virology* 66: 1613-1619; 1985.
- 9 Sailleau, C., Hamblin, C., Paweska, J.T. ; Zientara, S. Identification and differentiation of the nine African horse sickness virus serotypes by RT-PCR amplification of serotype-specific genome segment 2. *Journal of General Virology* 81: 831-837; 2000.
- 10 Sambrook, J., E.F. Fritschk, and T. Maniatis. *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA; 1989.
- 11 Sanger, F, S. Nicklen; A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 74: 5463-5467; 1977.
- 12 Scherer W.F, J. Madalengoitia, O. Meneses; M. Acosta. 1979. Study of VEE virus and isolations of SLE, EEE and group C and Guama group arbovirus in the Amazon region of Perú, *Bull. Pan. Am. Health Organ* 13: 272-284; 1975.
- 13 Travassos da Rosa, A.P.A., R.B. Tesh,, F.P. Pinheiro, J.F.S. Travassos da Rosa, P.H. Peralta; D.L. Knudson. Characterization of the Changuinola Serogroup Viruses (Reoviridae: Orbivirus). *Intervirology* 21: 38-49; 1984.

Agradecimiento: Esta investigación se viene realizando gracias a fondos provenientes de la Universidad de San Martín de Porres y a una subvención del Consejo Nacional de Tecnología del Perú (423-2001- CONCYTEC- OAJ).