

# ACOTACIONES SOBRE EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

BEDSY E. DUTARY\*

---

\* Asociado Pre-doctoral del Departamento de Virología del Laboratorio Conmemorativo Gorgas,

## ACOTACIONES SOBRE EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

Bedsy E. Dutary

La cepa enzoótica Magangué del virus de la encefalitis equina venezolana y sus dos variantes, placa grande (PG) y placa pequeña (PP), aislada en células Vero, se utilizaron para determinar si las dos subpoblaciones virales y la cepa original tenían diferente mortalidad en cobayos; los resultados mostraron que sí hay relación entre el tamaño de las placas y la sobrevivencia de los cobayos inoculados ( $X^2 = 4.8$ ;  $p < 0.05$ ). También se comparó la sensibilidad del método de cromatografía en columnas de hidroxipatito con la de cultivos en células Vero para la detección de subpoblaciones virales; las fracciones de mayor infectividad en la cepa original y sus dos variantes correspondieron a la misma molaridad 0.2; este método detectó solamente una población viral.

El virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) pertenece a la familia Togaviridae, género Alfavirus (1, 2). El estudio de ciento veinticuatro cepas aisladas

a través de Latinoamérica y de los Estados Unidos (3) demostró que es un complejo de virus antigénicamente diferenciable y con distintas manifestaciones patogénicas (Tabla 1). Las formas de actividad epizootica, I-ABC, son mortales para un alto porcentaje de caballos infectados; las formas de actividad enzoótica, I-D, I-E, I-Otro, II, III y IV, pueden infectar a los caballos, pero producen niveles bajos de viremia que generalmente no resultan en enfermedades clínicas (4).

Las cepas enzoóticas de este virus aisladas en Panamá (5), I-D y I-E, parecen mantenerse en la naturaleza en un ciclo que incluye mosquitos *Culex* del subgénero *Melanoconion* y roedores silvestres de las especies *Proechimys semispinosus* (mocangué) y *Sigmodon hispidus* (rata de algodón). Estos roedores se infectan y hacen circular el virus durante un período de dos a cuatro días, a niveles su-

TABLA No. 1

## GRUPOS ANTIGENICOS, FORMA Y DISTRIBUCION DE VIRUS DEL COMPLEJO VEE

GRUPO ANTIGENICO TIPO- SOTIPIPO	PROTOTIPO	FORMA DE ACTIVIDAD	AISLAMIENTO ORIGINAL AÑO-PAIS	AISLAMIENTOS POSTERIORES
I A	BECK- WYCKOFF	EPIZOOTICA	1938-VENEZUELA	PERU, ECUADOR, COLOMBIA VENEZUELA, COSTA RICA,
B	ICA	EPIZOOTICA	1946-PERU	NICARAGUA, SALVADOR, HONDURAS, GUATEMALA,
	MF-8	EPIZOOTICA	1969-HONDURAS	MEXICO, ESTADOS UNIDOS
C	P-676	EPIZOOTICA	1963-VENEZUELA	
D	3880	ENZOOTICA	1961-PANAMA	COLOMBIA, PANAMA
E	MENA II	ENZOOTICA	1961-PANAMA	PANAMA, CENTROAMERICA, MEXICO
OTRO	MAGANGUE	ENZOOTICA	1968-COLOMBIA	COLOMBIA, PERU
II	FLORIDA 1-7C	ENZOOTICA	1963-ESTADOS UNIDOS	ESTADOS UNIDOS
III	MUCAMBO	ENZOOTICA	1954-BRASIL	BRASIL, SURINAM, TRINIDAD
IV	PIXUNA	ENZOOTICA	1961-BRASIL	BRASIL

ficientes para infectar a los mosquitos que chupan de su sangre; ellos no mueren, sino que se recuperan de la infección. En este ciclo el hombre es sólo un huésped ocasional; sin embargo, los dos aislamientos originales de Panamá se lograron en seres humanos (6, 7, 8).

El ciclo mosquito-roedor-mosquito es una forma de mantener enzoótico el virus, que es poco virulento para los equinos; pero existe gran interés general entre los epidemiólogos en conocer la procedencia del virus que es vi-

rulento para los equinos, que desata periódicas epidemio-epizootias en Suramérica, y que fue la causa de la epizootia de 1969, en Centroamérica.

A nosotros nos resulta atrayente la hipótesis de que una epizootia puede resultar de la extensión del virus VEE de un foco de actividad enzoótica, debido a la selección de subpoblaciones más virulentas, al pasar el virus por ciertas especies de mosquitos, o por determinados roedores silvestres, o tal vez, por el mismo caballo.

Para poner a prueba esta hipótesis necesitamos primero un modelo que detecte en el laboratorio, los grados de patogenicidad o virulencia de las subpoblaciones virales; y, además, un método que detecte pequeñas cantidades de virus epizootico potencialmente presente en cepas enzoóticas de VEE. Este trabajo utiliza al cobayo y las técnicas cromatográficas como posibles métodos para lograr nuestro objetivo.

### Materiales y Métodos

Se utilizaron la cepa Magangué y sus variantes, placa grande (PG) y placa pequeña (PP). Magangué pertenece al subtipo antigénico I-Otro (9) y siendo enzoótico, tiene características intermedias entre las cepas epizooticas y las enzoóticas de VEE (10). La cepa prototipo fue aislada en 1968 en Colombia de un grupo de mosquitos del género *Mansonia* (11), que no están comunmente indicados como vectores en el ciclo enzoótico. Esta cepa tuvo un pasaje en ratones lactantes y dos pasajes en células Vero. En células Vero fue posible aislar los dos tamaños de placa (9, 10, 12) que también utilizamos. Las PG midieron 2.3 mm y las PP 1.2 mm, bajo condiciones estandarizadas; ambas fueron pasadas una vez en ratones lactantes y cuatro veces en células Vero.

### Experimento en cobayos

Utilizamos doce *Cavia porcellus* (cobayos) de la cepa C-13, que ha demostrado ser un modelo con características similares a la de los caballos (13). Los organizamos en cuatro grupos, de pesos similares. Los pesos oscilaron entre 200 y 550 gramos.

Con estos cuatro grupos formamos al azar tres grupos de cuatro cobayos cada uno. Las inoculaciones fueron subcutáneas, con 0.2 ml de una dilución de virus que contenía 200 unidades formadoras de placas en 0.2 m. Al primer grupo se le inoculó la cepa original de Magangué; al segundo grupo, la cepa PG; y al tercero, la cepa PP. Los animales se colocaron en jaulas individuales y se observaron dos veces al día, durante diez días. Los cobayos que mostraron signos de enfermedad fueron sangrados retroorbitalmente y el suero se inoculó en células Vero para aislar el virus. Los cobayos sobrevivientes fueron anestesiados con éter y sangrados por punción cardíaca. El suero obtenido se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Prueba serológica

Los sueros de los animales sobrevivientes fueron examinados con la prueba de 90% de reducción de placas en neutralización (14) contra Magangué cepa original, PG y PP.



## Cromatografía en columnas

Las columnas utilizadas miden 0.9 x 10 cm; son de Pyrex, con un filtro synterex. La mezcla de hidroxipatito se obtuvo comercialmente (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif.). Las soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio de veinticinco *molaridades* ascendentes que iban de 0.05 M a 1.0 M, pH 7.0, se utilizaron para levigar la muestra de 2 ml de virus diluido 1:10 en solución salina balanceada de Hanks, con 1% de suero bovino fetal y antibiótico. Una vez que el virus entró en la columna, se le agregaron 2 ml de la solución amortiguadora con la *molaridad* inicial. El líquido atravesó la columna por gravedad. Cada fracción de 2 ml fue recogida en un tubo estéril mantenido a 4°C. Después de obtener todas las fracciones, se les agregó 1% de albúmina de plasma bovino y se guardó a -70°C.

## Prueba de infectividad

Cada una de las 25 fracciones se tituló de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  y se inoculó 0.05 ml en cada hoyo de los platos Linbro (Linbro Chemical Co., New Haven, Conn.) de 96 hoyos que contenían monocapas de células Vero. Se permitió la adsorción del virus durante una hora y luego se le agregó el medio (15). Los platos se incubaron a 34°C durante 48 horas al cabo de las cuales se les agregó una segunda

capa de medio a la que se le añadió rojo neutral. Las placas se contaron a las 18 horas.

## Resultados

Los cuatro cobayos inoculados con la cepa original de Magangué se enfermaron, y tres de ellos murieron entre el cuarto y el sexto día. El cuarto cobayo que se recuperó, era el de mayor peso y edad; fue posible aislar el virus del suero de ese animal al cuarto día de inoculado. Dos cobayos inoculados con PG, murieron al sexto y al séptimo día, respectivamente. Los dos restantes no mostraron síntomas de infección, pero las pruebas de neutralización indicaron la formación de anticuerpos. Todos los cobayos que recibieron PP sobrevivieron, sin mostrar síntomas de infección por VEE; sin embargo, los cuatro desarrollaron anticuerpos neutralizantes con títulos de 1:16 a 1:64 (Tabla No. 2)

Con la técnica de la cromatografía en columna de hidroxipatito, las curvas de infectividad de las cepas usadas como controles fueron comparables a las obtenidas por Jahrling y Eddy (16) para esas mismas cepas de VEE. Las fracciones obtenidas en las columnas de hidroxipatito de la cepa original de Magangué y de PG y PP verificados en Vero presentaron una sola máxima de infectividad que correspondió en cada caso a la *molari-*

TABLA 2

EXPERIMENTO EN CAVIA *PORCELLUS* (COBAYOS)

INOCULADOS CON LA CEPA MAGANGUE

	ENFERMOS	MUERTOS	ANTICUERPOS EN SOBREVIVIENTES*
CEPA ORIGINAL	4/4	3/4	8
PG	2/4	2/4	4,4
PP	0/4	0/4	16,16,16,64

\* TITULOS DE LA NEUTRALIZACIÓN EFECTUADOS 10 DIAS DESPUES DE INOCULADOS

dad 0.2M. La cepa original de Magangué en la molaridad 0.2 mostró una mezcla de placas grandes y pequeñas, con una proporción más alta de placas grandes, mientras que PG sólo mostró placas grandes y PP sólo mostró placas pequeñas (Tabla No. 3).

### Discusión

La cepa Magangué fue seleccionada por tener la forma enzoótica de actividad. Son las cepas enzoóticas las que, a nuestro juicio, representan el punto de partida en estudios que tiendan a clarificar la aparición cíclica de las epizootias de VEE; además, Magangué posee dos tamaños de placas que representan las poblaciones heterogéneas que frecuentemente componen una población viral.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en cobayos, al inocular la cepa original y sus

variantes, demuestra diferente infectividad (chi cuadrada es 4.799;  $p = 0.03$ ); sí hay pues relación entre el tamaño de las placas y la sobrevivencia de los cobayos inoculados. La distinta infectividad de la cepa original y la de las poblaciones virales aisladas nos permite aceptar que las subpoblaciones virulentas contra las no virulentas pueden seleccionarse en un pasaje, dependiendo del sustrato usado para la multiplicación del virus, porque sabemos (17) que el cambio de hospedero o de tejidos específicos dentro del hospedero puede resultar en alteraciones significativas de las propiedades biológicas del virus.

La técnica cromatográfica, utilizando la forma hidroxipatito del fosfato de calcio, representaba otro método posible para la separación de las subpoblaciones virales que integran esta cepa de VEE. La técnica se basa

TABLA 3

INFECTIVIDAD EN CELULAS VERO DE LA CEPA MAGANGUE  
LEVIGADAS CON DIFERENTES MOLARIDADES  
EN COLUMNAS DE FIBROXIAPATITO

MOLARIDAD	ORIGINAL	PC	PP
0.005	0	0	0
0.05	0	0	0
0.075	0	0	0
0.1	0	0	0
0.125	0	$1 \times 10^2$	0
0.15	$3 \times 10^2$	$3 \times 10^3$	$2 \times 10^1$
0.175	$5 \times 10^3$	$2 \times 10^4$	$3 \times 10^3$
0.2	$1 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
0.225	$8 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
0.25	$1 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^4$
0.275	$7 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
0.3	$1 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$
0.325	$1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$	$4 \times 10^2$
0.35	$5 \times 10^1$	$2 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
0.4	$1 \times 10^1$	$8 \times 10^1$	$9 \times 10^1$
0.425	$1 \times 10^1$	$8 \times 10^1$	$2 \times 10^2$
0.45	$1 \times 10^1$	$8 \times 10^1$	$5 \times 10^1$
0.475	$1 \times 10^1$	$3 \times 10^1$	$1 \times 10^1$
0.5	$1 \times 10^1$	0	0
0.6	0	0	0
0.7	0	0	0
0.8	0	0	0
0.9	0	0	0
1.0	0	0	0

en los diferentes grados de adhesión de las proteínas a las superficies sólidas, debido a las cadenas iónicas de hidrógeno o hidrofóbicas (18). Nuestros experimentos, sin embargo, lograron detectar una población viral con una sola máxima de infectividad correspondiente a la *molaridad* 0.2. Cuando utilizamos las variantes separadas en células Vero nuevamente obtuvimos, en cada caso, la máxima infectividad en

la misma *molaridad*, 0.2. Entonces no parece haber relación entre las subpoblaciones aisladas en Vero, siguiendo como criterio el tamaño de las placas y las poblaciones logradas en las columnas hidroxiapatito, que son función de las cargas en la superficie del *virion*.

La técnica cromatográfica, sin embargo, nos permitió comparar la máxima infectividad de la cepa Magangué con la de las cepas

utilizadas por Jahrling y Eddy (16). La cepa Magangué estaría incluida en el grupo I-A, en el cual la mayor infectividad está entre las molaridades 0.192 y 0.220. Esto es similar a lo logrado por Pedersen y Eddy (19) en electroforesis y sitúa a la cepa Magangué en el patrón alfa, junto con las cepas "Trinidad-donkey" y "TC-83", ambas I-A (3). Todo esto puede ser indicativo de las relaciones genéticas entre la cepa Magangué y las otras cepas del grupo I-A. Podríamos decir que Magangué posee cierta relación con las cepas enzoóticas I-ABC y que bajo condiciones experimentales podemos lograr la selección que explicaría la hipótesis propuesta. Sin embargo, debemos tener presente que la cepa Magangué y la "Trinidad-donkey" presentan tanto orígenes geográficos como

propiedades antigénicas diferentes.

## SUMMARY

Guinea pigs were infected with an enzootic strain of VEE (Magangué) and 2 cloned subpopulations (large and small plaque) to determine if a difference in mortality ratios existed. Results showed 75% mortality among guinea pigs inoculated with parental virus, 50% among those inoculated with large plaque variants and 0% of those inoculated with small plaque. An attempt was made to separate large and small plaque subpopulation variants using hydroxylapatite column chromatography. Peak infectivity for parental strain, large and small plaque subpopulations were all found at 0.2 M and could not be differentiated using this technique.

## BIBLIOGRAFIA

1. Catalogue of Arthropod-Borne viruses of the World. US Public Health Serv Pub US Dept Hlth Ed Wlfr, 1967
2. Melnick JL: Classification and Nomenclature of Viruses. Prog Med Virol 17: 290-294, 1974
3. Young N, Johnson KM: Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance. Am J Epidemiol 89: 286-307, 1969
4. Johnson KM, Martin DH: Venezuelan equine encephalitis. Ad Vet Sc Comp Med 18: 79-116, 1974
5. Galindo P, Srihongse S, Rodaniche E, Grayson MA: An ecological survey for arbovirus in Almirante, Panama, 1959-1962. Am J Trop Med Hyg 15: 385-400, 1966
6. Johnson KM, Shelokov A, Peralta PH, Dammin GJ, Young N: Recovery of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in Panama: A fatal case in man. Am J Trop Med Hyg 17: 432-440, 1968