

ARTÍCULO ORIGINAL

Primera evidencia de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (arenavirus) en roedores *Mus musculus* capturados en la zona urbana del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia

Anaís Castellar^{1,2}, Marco Guevara¹, Juan D. Rodas³, Andrés F. Londoño³, Esteban Arroyave³, Francisco J. Díaz⁴, Silvana Levis⁵, Pedro J. Blanco^{1,2}

¹ Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

² Programa de doctorado en Medicina Tropical, Sistema de Universidades Estatales-Caribe, Sincelejo, Colombia

³ Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio Maiztegui", Pergamino, Argentina

Introducción. El virus de la coriomeningitis linfocítica es un arenavirus del Viejo Mundo que se hospeda en el ratón casero (*Mus musculus*), y puede causar infecciones congénitas, hidrocefalia, coriorretinitis y falla orgánica múltiple en pacientes receptores de trasplantes. En Colombia aún no se ha reportado la enfermedad mediante diagnóstico clínico, pero en estudios serológicos se ha detectado la infección por el virus Pichindé en roedores en los departamentos del Cauca y Valle del Cauca, y por el virus Guanarito, en roedores en Córdoba.

Objetivo. Detectar el virus de la coriomeningitis linfocítica en *M. musculus* en el municipio de Sincelejo.

Materiales y métodos. Se evaluaron 80 muestras de plasma mediante la prueba ELISA usando antígeno del virus de la coriomeningitis linfocítica. Además, se empleó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) anidada en muestras de animales seropositivos y seronegativos para la detección del segmento S.

Resultados. Se encontró una seroprevalencia de 10% (8/80) y se detectó el genoma viral en 16 muestras de cerebro; el alineamiento (en la *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST) y el análisis filogenético (mediante el programa MrBayes, versión 3.2.2) confirmaron que correspondía al virus de la coriomeningitis linfocítica.

Conclusión. Los resultados indicaron que la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica en humanos podría ocurrir en el área urbana de Sincelejo, aunque hasta la fecha no se hayan reportado casos.

Palabras clave: coriomeningitis linfocítica; arenavirus; ratones; ensayo de inmunoadsorción enzimática, ELISA; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3226>

First evidence of lymphocytic choriomeningitis virus (Arenavirus) infection in *Mus musculus* rodents captured in the urban area of the municipality of Sincelejo, Sucre, Colombia

Introduction: The lymphocytic choriomeningitis virus is an Old World arenavirus that infects *Mus musculus*, and can cause congenital hydrocephalus, chorioretinitis and multisystemic failure in transplant human recipients. Although the disease has not been clinically diagnosed in Colombia yet, there have been reports of infection with the Pichindé virus in rodents from Cauca and Valle del Cauca departments, and with the Guanarito virus in rodents from Córdoba department.

Objective: To identify the lymphocytic choriomeningitis virus from *Mus musculus* captured in the municipality of Sincelejo.

Materials and methods: We evaluated 80 samples of plasma by ELISA using antigen from lymphocytic choriomeningitis virus. Additionally, a nested RT-PCR was performed to seropositive and seronegative samples for the S-segment.

Contribución de los autores:

Anaís Castellar: revisión de la literatura científica, recolección y análisis de datos y redacción del manuscrito

Marco Guevara y Esteban Arroyave: trabajo de campo y organización de los datos

Juan D. Rodas y Andrés Londoño: trabajo de laboratorio, asesoría en la revisión y aportes a la discusión

Francisco J. Díaz: revisión crítica y asesoría del contenido, aportes a la discusión y análisis filogenéticos.

Silvana Levis: donación de reactivos no comerciales y asesoría en los ensayos, revisión crítica y aportes a la discusión

Pedro J. Blanco: contribución en el diseño del estudio, participación en la fase de campo y revisión crítica del manuscrito

Results: We found a 10% seroprevalence (8/80) and the viral genome was detected in 16 brain samples; the alignment (BLAST) and the phylogenetic analysis (MrBayes, version 3.2.2) confirmed the presence of the lymphocytic choriomeningitis virus.

Conclusion: The results indicated that human infection with the lymphocytic choriomeningitis virus in humans could occur in the urban area of Sincelejo, although no cases have been reported so far.

Key words: Lymphocytic choriomeningitis; arenavirus; mice; enzyme-linked immunosorbent assay, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3226>

Los arenavirus son agentes infecciosos esféricos o pleomorfos con un diámetro de 50 a 300 nm y glucoproteínas incrustadas en una envoltura lipídica y algunos ribosomas en su interior, las cuales son responsables de su apariencia arenosa cuando se observan mediante microscopía electrónica (1). Los arenavirus son los agentes etiológicos de algunas de las enfermedades emergentes más temidas y de mayor letalidad, tales como la fiebre de Lassa y las fiebres hemorrágicas suramericanas, caracterizadas por daño vascular, renal, hepático y neurológico (2).

La familia Arenaviridae consta de un único género, *Arenavirus*, que comprende 25 especies virales reconocidas por el *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Estos agentes se han clasificado de acuerdo con sus propiedades antigénicas, en dos grupos: el complejo serológico Tacaribe, el cual incluye virus autóctonos del Nuevo Mundo, y el complejo serológico Lassa-Coriomeningitis Linfocítica, conformado por virus autóctonos de África y por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), conocidos como el grupo del Viejo Mundo (3-5).

Su genoma está constituido por ARN de cadena bisegmentada y presenta una estrategia de codificación en ambos sentidos. Los dos segmentos se designan como L (*large*) y S (*small*). El primero codifica para la polimerasa viral y para Z, que es una proteína de unión a cinc. El segundo segmento codifica para la nucleoproteína estructural y el precursor de la glucoproteína que da origen a las proteínas de envoltura G1 y G2. El virus tiene un ciclo de replicación no lítico limitado al citoplasma (4).

Usualmente, cada arenavirus infecta una especie de roedor en el cual se hospeda naturalmente, con excepción del virus Tacaribe, cuyo aislamiento se ha asociado con murciélagos *Artibeus* spp. (6). Por ello, la distribución del virus en la naturaleza depende de la distribución geográfica del huésped. Sin embargo, el LCMV es el único virus que exhibe una distribución mundial debido a su asociación con el ratón cosmopolita *Mus musculus* (7,8).

En Colombia se comprobó la presencia del virus Pichindé, un arenavirus poco patogénico, hace más de 40 años en áreas de los departamentos del Valle del Cauca y de Cauca (7). Se determinó, asimismo, la presencia de anticuerpos reactivos contra los virus Guanarito y Pichindé en roedores capturados en el departamento de Córdoba (8); más recientemente, en un estudio de vigilancia del LCMV en roedores en ese departamento, aunque no se encontraron individuos seropositivos, no se descartó su circulación, ya que la muestra incluía sobre todo ejemplares jóvenes (9). La falta de métodos diagnósticos de laboratorio ha impedido la confirmación de posibles casos clínicos autóctonos de infección por el LCMV, y clínicamente es muy difícil hacer el diagnóstico diferencial de estas infecciones dada la presencia de otras enfermedades febriles endémicas en la región, como dengue, paludismo y leptospirosis.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del LCMV en una población de roedores *M. musculus* de Sucre y demostrar su circulación en una zona donde podría llegar a tener efectos zoonóticos.

Materiales y métodos

Tipo y zona de estudio

Se hizo un estudio descriptivo para determinar la infección por LCMV en una población de roedores *M. musculus* capturados en la zona urbana del municipio de Sincelejo, ubicado en el noroeste de Colombia, a 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de latitud oeste, y perteneciente a la subregión Montes de María. La zona de estudio presenta bosque seco

Correspondencia:

Anaís Castellar, Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre, Carrera 14 N° 16B-32, Sincelejo, Colombia

Teléfono: (52) 282 0830
anaiscastellar@gmail.com

Recibido: 14/03/16; aceptado: 16/06/16

tropical (bs-T), y tiene una altura sobre el nivel del mar de 213 m y una temperatura promedio anual de 27 °C. El estudio se hizo en muestras de plasma y cerebro de roedores *M. musculus* urbanos capturados según los lineamientos establecidos por los *Centers for Disease Control* (CDC) de Estados Unidos para el muestreo de pequeños mamíferos destinados a estudios virológicos (10), y se contó con la autorización de la Corporación Autónoma Regional de Sucre (CARSUCRE).

Los roedores se capturaron con trampas de captura viva Sherman (8 x 9 x 23 cm; Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL) y Tomahawk, durante 39 noches entre marzo del 2010 y enero del 2011. Las trampas fueron cebadas con pescado enlatado, maní o avena mezclada con vainilla, e instaladas desde las 16:00 hasta las 06:00 horas; se colocaron en el domicilio y el peridomicilio, en un radio de hasta 25 m de distancia de las viviendas elegidas aleatoriamente en cada una de las nueve comunas que conforman el municipio de Sincelejo.

Datos reproductivos y medidas morfométricas

El procesamiento de los roedores se hizo al aire libre de acuerdo con las normas de bioseguridad establecidas para este fin (10); los ratones fueron anestesiados con isoflurano, se determinó su peso, y se registraron los datos reproductivos y las medidas morfométricas.

Obtención de las muestras

Se tomó una muestra de sangre de cada roedor por punción cardíaca, usando jeringas tratadas con anticoagulante (EDTA). Cada muestra de 1.200 g se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El plasma se transfirió a un nuevo vial, el cual se rotuló con el código de identificación del animal y se conservó a -20 °C en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre hasta el momento de la prueba de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

Diseción de los roedores capturados

Los roedores fueron sacrificados por dislocación cervical y después se hizo una incisión en la piel sobre la línea media de cada animal, desde el borde inferior del esternón hasta el pubis, y se separó completamente la piel del tejido muscular; la piel se almacenó individualmente a -86 °C en el laboratorio hasta su montaje. A continuación, se removió la cabeza de los individuos procesados y se limpió el cráneo ejerciendo presión con una jeringa con agua destilada para extraer el cerebro. Los

cráneos se secaron al aire libre y conjuntamente con los parámetros morfométricos y la piel de los animales, se utilizaron para la identificación taxonómica con base en las claves genéricas para roedores del Nuevo Mundo (11).

Detección de anticuerpos específicos contra LCMV

La detección de anticuerpos IgG contra LCMV se hizo mediante la técnica ELISA indirecta; para ello, se siguió el protocolo del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio Maiztegui" de Pergamino en Argentina. Se utilizaron antígenos preparados en este Instituto a partir de lisado de células Vero infectadas con una cepa humana de LCMV de Argentina (número de identificación Hu23435), suero de control positivo (líquido ascítico hiperinmune de ratones sensibilizados con LCMV) y suero de control negativo (obtenido de plasma de ratones BALB/c mediante ELISA indirecta). Tanto el antígeno como los controles para la prueba de ELISA procedían del Instituto.

Al inicio del procedimiento, se sensibilizó la mitad de la placa de ELISA con 100 µl de antígeno de LCMV (1 µg/µl) y, la otra mitad, con 100 µl de lisado de células Vero (antígeno de control negativo) con la misma dilución, y se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente, la placa se lavó cinco veces con solución tampón de lavado (PBS con pH 7,4 más Tween 20 al 0,1 %). Para las diluciones de las muestras de plasma, se utilizó el factor de dilución 4 en una solución de PBS (pH 7,4) más Tween 20 (0,5 %) más 5 % de leche descremada, y se usó con una dilución de 1:100 tanto para las muestras como para los controles positivo y negativo. A continuación, se incubó la placa a 37 °C durante 60 minutos en cámara húmeda y, al cabo de cinco enjuagues con solución tampón de lavado, se agregaron 100 µl de conjugado anti-IgG de ratón 1/32.000 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Cat. 474.1806), y se repitió el paso de incubación y lavado de la placa. Seguidamente, se agregaron 100 µl de sustrato ABTS a cada pozo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos, protegido de la luz. Por último, se midió la absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda entre 405 y 410 nm.

Para validar el punto de corte previamente establecido (0,2) para la prueba, se determinó que la media más tres desviaciones estándar del valor de las densidades ópticas de los sueros usados como control negativo (suero de ratones BALB/c obtenido mediante ELISA indirecta), fuera inferior

al valor mencionado. Los resultados de cada muestra se calcularon restando a cada valor de densidad óptica del pozo con antígeno positivo el equivalente de la absorbancia correspondiente a la dilución con el antígeno negativo.

Extracción de ARN a partir de las muestras de cerebro de los roedores

La extracción del ARN viral se hizo en los roedores seropositivos y en los seronegativos. Se analizaron 80 muestras de cerebro de *M. musculus* capturados en el área urbana del municipio de Sincelejo. Las muestras seropositivas se procesaron de manera individual, en tanto que las seronegativas se procesaron en grupos de tres individuos. En los grupos positivos según la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), las muestras se sometieron de forma individual a una nueva extracción de ARN y a una nueva RT-PCR.

La extracción se hizo con el reactivo Trizol LS (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN extraído se volvió a suspender en 40 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato y se calentó durante cinco minutos a 65 °C en bloque seco, se adicionó 1 µl de inhibidor de ARNasa y se almacenó a -80 °C hasta su uso; después, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 a densidades ópticas de 230, 260 y 280 nm, con el fin de calcular las relaciones de 260/280 para estimar los niveles de contaminación con ADN, fenol, alcohol y proteínas.

RT-PCR anidada para la detección de ARN de LCMV en muestras de cerebro

Para la detección de ARN de LCMV, se emplearon 200 ng de ARN total en la transcripción inversa con la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen), según indicaciones del fabricante. En la primera ronda de amplificación se usaron los cebadores AREN 1+ (5'-2367CWATRTANGGCCA ICCITCICC2388-3') y AREN1- (5'2789TNRWYAA YCARTTYGGIWCIRTKCC2813-3') (12), los cuales amplifican una región de 450 pb correspondiente a la nucleoproteína viral dentro del segmento S de los arnavirus, bajo las siguientes condiciones: 3 µl de solución tampón para PCR 10X (Invitrogen), 1 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM), 2 µl de cebador AREN 1+ (10 pmol), 2 µl de cebador AREN 1- (10 pmol), 1,1 µl de sulfato de magnesio (MgSO₄) (50 mM) y 0,24 µl de Taq polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerase®, Invitrogen), en un volumen final de 30 µl. La reacción tuvo un tiempo de transcripción inversa de 60 minutos a 40 °C, una

desnaturalización inicial a 94 °C durante un minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, alineamiento a 45 °C durante un minuto, una extensión a 72 °C durante 30 segundos y una fase posterior de extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

En la segunda ronda se usó 1 µl del producto amplificado, con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 45 °C durante un minuto, una extensión a 72 °C durante 30 segundos y una fase de extensión final a 72 °C durante cinco minutos, utilizando los cebadores AREN2+ (5'-²³⁹⁶CANANYTTTANARNAIRTTYTCR TAIGG₂₄₂₄-3') y AREN2- (5'-²⁵⁶⁷AGYYTNKNNGC NGCIGTIAARGC₂₅₈₉-3') (12), los cuales amplifican un fragmento interno de 200 pb. Para validar los resultados de cada una de las reacciones de PCR, se utilizó como control positivo ARN de LCMV donado amablemente por Silvana Levis del INEVH, y, como control negativo, se utilizó agua ultrapura en lugar de ácidos nucleicos.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, previa tinción con SYBR Safe® (Termo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) según las especificaciones del fabricante. El gel se corrió en solución tampón TBE 0,5X durante 30 minutos a 130 voltios y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de los productos amplificados se determinó con el uso de un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, 100-1500 pb – Invitrogen).

Por último, los productos amplificados se purificaron y secuenciaron en ambos sentidos (13,14), empleando los mismos cebadores de la reacción original mediante el sistema de electroforesis capilar ABI 3730.

Determinación genética y análisis filogenético del arnavirus LCMV obtenido a partir de cerebro de *Mus musculus*

Las secuencias obtenidas se editaron en la aplicación Trace Data File Viewer/Editor. Posteriormente, se creó una secuencia de consenso por aislamiento con la herramienta Alignment Explorer y se comparó con las secuencias depositadas en Genbank mediante una búsqueda de alineamiento local con el programa BLAST (15). Las secuencias obtenidas a partir del cerebro de los roedores en estudio y las secuencias de referencia consignadas en Genbank fueron alineadas usando el programa

Clustal W (16). Los programas y aplicaciones empleados en este proceso de edición, búsqueda y alineamiento están contenidas en el programa Mega, versión 5.2 (16).

También, se determinó el modelo que mejor explicara la variación observada entre las secuencias, al cual se aplicaron los algoritmos usados para hacer la reconstrucción filogenética, con el fin de determinar el estatus taxonómico del arnavirus que infectaba la población de roedores en el estudio. En este proceso de reconstrucción se usó el método bayesiano, usando el programa MrBayes, versión 3.2.2, y la visualización y edición de los árboles se hicieron con el programa FigTree, versión 1.4.

Consideraciones éticas

Los protocolos para la toma de muestras de sangre y disección de los roedores fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética de la Universidad de Sucre.

Resultados

Caracterización de los roedores capturados

Todos los roedores capturados en el área urbana de Sincelejo se clasificaron dentro de la familia Muridae, subfamilia Murinae y las siguientes especies: 101 individuos (80,2 %) de la especie *M. musculus* y 25 (19,8 %) de la especie *Rattus rattus*. No hubo captura de roedores silvestres y la identificación taxonómica solo se hizo hasta la categoría de especie en cada caso. Las pieles recolectadas de los roedores se almacenaron en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Detección de anticuerpos específicos contra LCMV en roedores *Mus musculus*

De las 80 muestras de plasma analizadas mediante ELISA, el 10 % (8/80) resultaron reactivas para el antígeno de LCMV (figura 1a). Sin embargo, dado que se consideró seropositiva cualquier muestra con valor de densidad óptica igual o superior a 0,2, por lo menos hasta una dilución de 1:400, se determinó que las ocho muestras de plasma de *M. musculus* fueron positivas (figura 1b) después de realizar las titulaciones de cada una. Las diluciones ensayadas fueron de 1:100, 1:400, 1:1.600 y 1:6.400 mediante la técnica ELISA indirecta. Estos roedores se capturaron en cuatro comunas de la zona urbana del municipio de Sincelejo (comunidades 5 a 8, cuadro 1).

Detección del genoma de arnavirus en muestras de cerebro de *Mus musculus*

Se logró identificar el genoma viral en una de las ocho muestras seropositivas (CL005, cuadro 1). El tamaño del producto esperado fue de 200 pb en la segunda ronda de amplificación. Asimismo, se encontró que 16 de las 80 muestras seronegativas (18,7 %) amplificaron el segmento de interés en la segunda ronda de amplificación (cuadro 1) y, de estas, cuatro también amplificaron en la primera ronda, exhibiendo un fragmento de 450 pb en la electroforesis (figura 2).

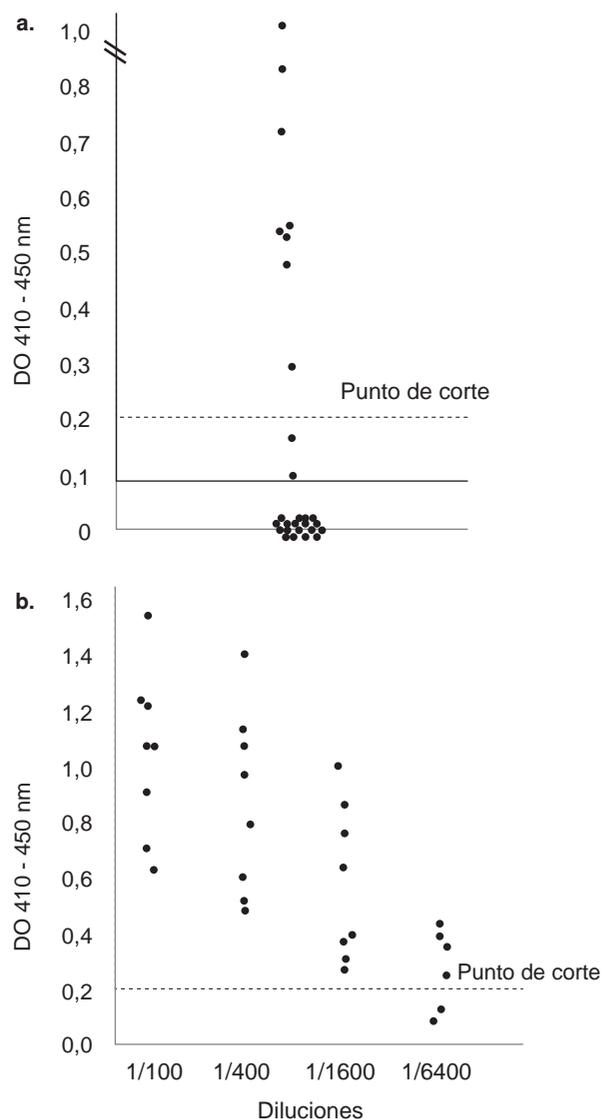
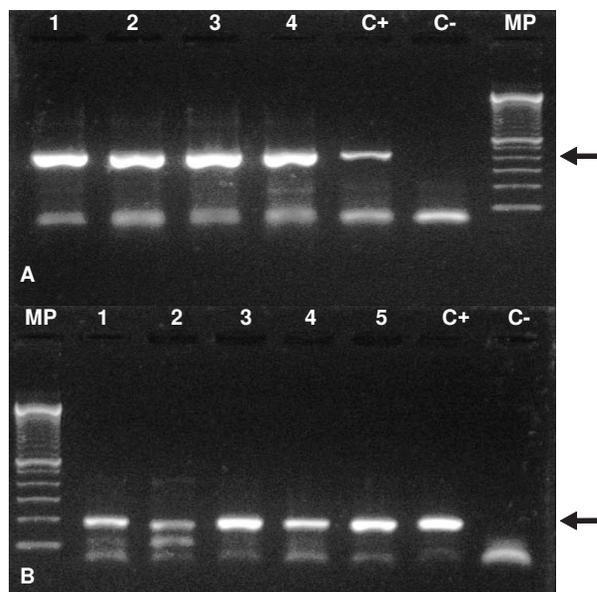


Figura 1. Valores de absorbancia a 410-450 nm detectados en las muestras de plasma de los roedores *M. musculus* analizadas mediante ELISA usando antígeno del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). **a.** Muestras serorreactivas. **b.** Titulación de muestras seropositivas.

Cuadro 1. Zona de captura de los roedores positivos según la prueba ELISA o la RT- PCR

Comuna	Código	Barrio	ELISA	PCR
3	MG018	Sinaí	-	+
5	JG001	Ciudad Jardín	+	-
	JG002	Ciudad Jardín	-	+
	JG024	El Cauca	+	-
	JG020	El Cauca	+	-
	JG023	El Cauca	+	-
	MG031	Palermo	-	+
	MG019	La Palma	-	+
6	JB005	Centro	-	+
	MG010	Centro	-	+
	MG026	Juan Bosco	+	-
	JB004	Juan Bosco	-	+
	LB011	Versalles	+	-
7	CL002	Versalles	-	+
	JB007	Versalles	-	+
	JG019	Puerta Roja	+	-
	JG025	Puerta Roja	-	+
	JR005	Puerta Roja	-	+
	LB004	Margaritas	-	+
	MG028	Libertad	-	+
8	LB013	Recreo	-	+
	CL005	Simón Bolívar	+	+
	CL004	Simón Bolívar	-	+

* Única muestra serorreactiva detectada mediante RT-PCR

**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para separar los productos de la RT-PCR anidada que resultaron después de amplificar un fragmento del segmento S (nucleoproteína) del LCMV. Las muestras se extrajeron de los cerebros de roedores *M. musculus* capturados en Sincelajo. Las flechas indican el fragmento amplificado: en el plano superior (A) se observan productos generados en la primera ronda (con un tamaño de 450 pb); en el plano inferior (B) se muestran algunos productos obtenidos en la segunda ronda (con un tamaño de 200 pb). C-: control negativo; C+: control positivo (ARN de LCMV); MP: marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen).

Secuenciación y alineamiento del segmento genómico

Se obtuvieron 20 amplicones provenientes de 16 cerebros de roedores *M. musculus*; sin embargo, solo se pudieron recuperar 16 secuencias de consenso para el análisis: cuatro muestras correspondientes al segmento de 450 pb y 12 pertenecientes a la secuencia de 200 pb.

El alineamiento local con la herramienta BLAST reveló que los fragmentos secuenciados correspondían a la posición entre los nucleótidos 2.387 y 2.792 del segmento S, el cual codifica para la nucleoproteína de LCMV y está registrado en GenBank con el número de acceso NC004294LCMV. Además, se encontraron 69 sitios variables, de los cuales 15 fueron informativos por parsimonia. Asimismo, en la búsqueda que se hizo confrontando una de las secuencias obtenidas con las secuencias encontradas en la base de datos GenBank, se encontró una identidad del 89 % con la secuencia JN6879491 correspondiente a la cepa 201102714 de un virus LCMV aislado a partir del lavado broncoalveolar de una persona con trasplante en Atlanta, Estados Unidos (17).

Estos porcentajes permitieron confirmar que el material genético amplificado correspondía a un arnavirus de la especie LCMV. También, se hizo el análisis con las 12 secuencias obtenidas de la segunda ronda de amplificación, cuyo tamaño después de la edición fue de 200 pb. Se encontraron 40 sitios variables, de los cuales siete fueron parsimoniosamente informativos. El alineamiento local permitió determinar que estas secuencias se encontraban entre las posiciones 2.433 y 2.586 de la región que codifica para la nucleoproteína en el segmento S del LCMV, registrado en GenBank con el número de acceso GQ862982.1LCMV.

Genotipificación de las especies del género *Arenavirus* obtenidas a partir de cerebro de roedores *Mus musculus*

Las secuencias amplificadas en la primera ronda de la RT-PCR anidada tenían una longitud de 450 pb, la cual se redujo a 404 pb después de suprimir los segmentos correspondientes a los cebadores. A partir de estas secuencias, y de las secuencias homólogas del género *Arenavirus* consignadas en GenBank, se hizo el análisis de distancias y el filogenético, con el objetivo de estimar la diversidad y determinar la identidad taxonómica de las secuencias obtenidas.

Con el programa MEGA, versión 5.2, se calcularon las distancias genéticas pareadas no corregidas (distancias p) dentro de la especie LCMV (distancia intraespecífica) y entre los miembros del género *Arenavirus* (distancia interespecífica). Se encontró que las distancias intraespecíficas calculadas en la especie LCMV fluctuaron entre 0 y 0,250, en tanto que las distancias interespecíficas variaron entre 0,378 y 0,508 (no se muestran datos). Al comparar las cuatro secuencias virales obtenidas se observaron entre siete y 19 diferencias en los nucleótidos (distancias p entre 0,017 y 0,047), y entre 0 y 2 diferencias en los aminoácidos (distancias p entre 0,000 y 0,0150).

Antes del análisis filogenético, se determinó que el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor explicaba la diversidad observada en los datos

era el general con tiempo reversible (GTR), así como la distribución gamma (G) de la variación entre sitios y una proporción de sitios invariables (I) (GTR + G + I). Este modelo se utilizó para el análisis filogenético con el método de probabilidad bayesiana MrBayes, versión 3.2.2.

El árbol resultante de este análisis segregó claramente los arenavirus del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo en clados independientes y con el máximo soporte probabilístico. Entre los del Nuevo Mundo (parte superior de la figura 3), se evidenciaron varios subclados, uno de los cuales incluyó los virus causantes de las fiebres hemorrágicas suramericanas (Junín, Machupo, Guanarito, Chaparé y Sabiá) en un grupo parafilético con otros considerados no patógenos (Tacaribe, Amapari, Cupixi). Otra rama incluyó los cinco arenavirus conocidos de

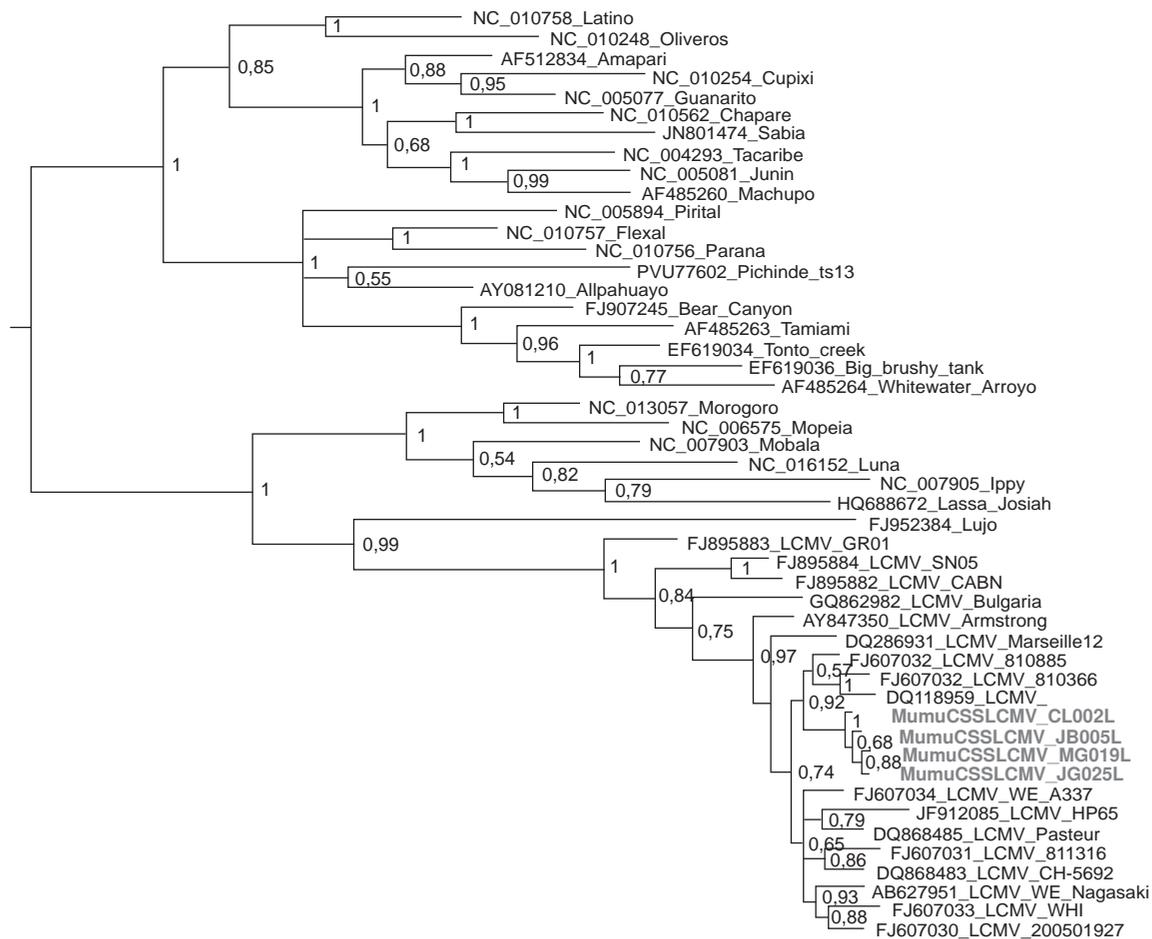


Figura 3. Árbol filogenético obtenido utilizando un fragmento de 404 nucleótidos del segmento S de diferentes aislamientos de LCMV, incluidas cuatro secuencias encontradas en *M. musculus* (en color gris) en el departamento de Sucre, Colombia, y otras especies de arenavirus. Se hicieron dos búsquedas paralelas con el método bayesiano durante 1'000.000 de generaciones muestreando uno de cada 1.000 estados. El modelo de sustitución utilizado fue el GTR + G + I. Los valores cercanos a los nodos corresponden a las probabilidades posteriores de los clados correspondientes. El análisis se hizo con el programa MrBayes, v3.2.2. El árbol está enraizado en el punto medio y fue editado con FigTree, v1.4.

Norteamérica (Bear Canyon, Tamiami, Tonto Creek, Big Brushy Tank y Whitewater Arroyo), los cuales aparecieron como un grupo monofilético, lo que sugiere que se originaron a partir de los arenavirus suramericanos.

En el clado de los arenavirus del Viejo Mundo (parte inferior de la figura 3) aparecen todos los aislamientos de LCMV formando un grupo monofilético sólido y lejanamente relacionado con Lujo, un arenavirus detectado por primera vez en Suráfrica.

Las cuatro secuencias obtenidas de *M. musculus* en este estudio formaron, a su vez, un grupo monofilético anidado dentro del clado de LCMV, lo cual confirmó su identidad como secuencias de esta especie.

Determinación de posibles zonas de riesgo en el área urbana de Sincelejo

El análisis de correspondencias múltiples indicó que hubo predominio de individuos seropositivos detectados mediante ELISA en la comuna 5, en tanto que los individuos positivos por RT-PCR provenían de las comunas 5, 6 y 7. Asimismo, se evidenció la prevalencia de hembras entre los individuos *M. musculus* positivos (figura 4).

Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación se suman a los estudios sobre la caracterización de las infecciones por arenavirus en reservorios naturales a nivel mundial y constituyen el primer reporte de LCMV en Colombia.

Se encontraron anticuerpos contra LCMV en 8 (10 %) de los 80 roedores de la especie *M. musculus* capturados en el municipio de Sincelejo. El resultado difiere de los datos recabados para el departamento de Córdoba, con los cuales se determinó una seroprevalencia de 0 % en esta especie de roedores. Sin embargo, la ausencia de animales seropositivos no indica que el virus no esté en circulación, aunque podría plantearse que la muestra recolectada presentaba un sesgo dado el alto porcentaje de individuos jóvenes capturados, por lo cual se propone la captura de una muestra mayor de individuos *M. musculus* urbanos para describir mejor la condición ecoepidemiológica de la población de roedores frente a la prevalencia de LCMV en ese departamento (9).

La seroprevalencia hallada en este trabajo se encuentra dentro del rango de las tasas de países europeos como España y Alemania (3,6 a 11,7 %) (18), y es similar a la detectada en *Mus* spp. en

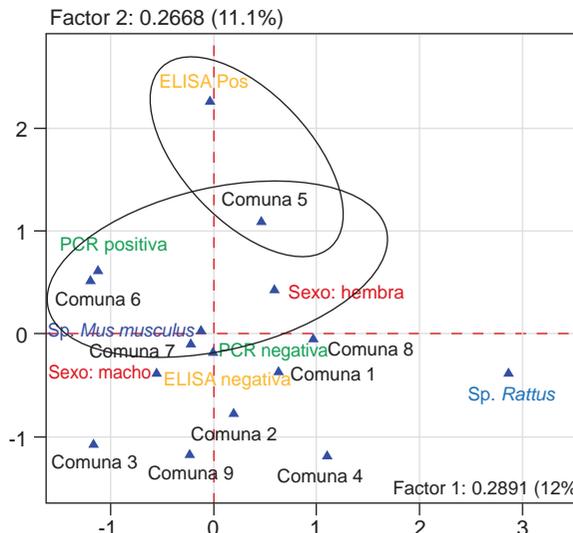


Figura 4. Plano 1-2 del análisis de correspondencias múltiples entre zona, sexo, especie e individuo seropositivo, y RT-PCR positiva para LCMV. En el análisis se muestra que hubo predominio de individuos seropositivos al emplear la prueba ELISA en la comuna 5 y que los individuos positivos detectados en la RT-PCR provenían de las comunas 5, 6 y 7.

las Américas (9 %), y a la reportada en un estudio serológico del virus LCMV en Argentina, en el cual se encontraron anticuerpos anti-LCMV evaluados mediante ELISA en 9,4 % de los roedores analizados de la especie *M. musculus* (19). Estos valores dependen de muchos factores que afectan las dinámicas ecológicas del virus y del roedor reservorio, entre ellos, las variables relacionadas con la estructura del paisaje (20), la frecuencia o densidad poblacional (21,22), el efecto de dilución (23,24), la recrudescencia viral (25), la variabilidad climática y la fragmentación del hábitat (26). La gran proporción de *M. musculus* seropositivos encontrados en esta investigación sugiere que hay circulación del virus LCMV en los roedores urbanos del municipio de Sincelejo.

El LCMV es el único miembro de la familia Arenaviridae con actividad en todos los continentes, debido a que su reservorio es un roedor cosmopolita (19). Los análisis llevados a cabo en el estudio de un caso de encefalitis por LCMV en una zona periurbana de una ciudad en Argentina, mostraron que 10,3 % de las personas seropositivas para LCMV residían en la localidad donde se reportó el caso (19). El comportamiento doméstico y peridoméstico de varias especies de roedores reservorios es un factor que facilita la transmisión del virus a humanos (27). La infección con este virus es asintomática o cursa como una enfermedad

leve y transitoria; sin embargo, se ha implicado en la meningitis aséptica (28) y en la transmisión de madre a hijo durante el embarazo, lo cual puede provocar la muerte del feto, secuelas neurológicas y coriorretinopatía (29). Por lo tanto, el LCMV se considera un agente de importancia sanitaria que debe ser vigilado en viviendas, instalaciones y en bioterios (30).

Los análisis filogenéticos a partir de las secuencias en estudio indicaron que los virus del género *Arenavirus* se agruparon formando dos clados independientes constituidos por, al menos, 25 especies, y por los virus del serocomplejo Tacaribe y Lassa-coriomeningitis linfocítica, lo cual coincide con lo evidenciado por Zapata, *et al.* (5). En el árbol se observa que las secuencias de Sincelejo conformaron un grupo monofilético con altos valores de soporte de la rama, cuyo ancestro común está relacionado con el ancestro que dio origen a los LCMV, lo cual demuestra la identidad de estos virus.

La hipótesis plantea que estos ratones fueron introducidos en las Américas a bordo de los barcos exploradores y conquistadores españoles y portugueses, y que tiempo después llegaron a Norteamérica con los colonos ingleses; en épocas más recientes, dicho movimiento probablemente se ha visto facilitado por los medios modernos de transporte, el comercio y los viajes (31), de tal forma que la larga historia de asociación de los ratones caseros con la actividad humana ha adquirido dimensiones globales.

Además, las tablas de distancias genéticas pareadas (no se muestran los datos) indicaron que los valores de las distancias genéticas entre las especies del género *Arenavirus* fluctuaron entre 0,378 y 0,508, valores superiores a los que se obtuvieron entre las secuencias aisladas de los virus que infectaban a los roedores capturados en Sincelejo y de los demás virus de LCMV, los cuales exhiben valores comprendidos entre 0 y 0,250. Tales valores denotan, además, los límites de divergencia intraespecífica e interespecífica que sirven para diferenciar los miembros de las especies del género *Arenavirus*, los cuales, conjuntamente con los resultados e interpretaciones derivadas de los análisis filogenéticos, permitieron confirmar la identidad específica de los aislamientos obtenidos de los roedores en el área de estudio.

Mediante el análisis de correspondencias múltiples se observó la relación entre los individuos seropositivos, los positivos por RT-PCR y el sitio de

captura. Se encontró una asociación con los roedores capturados en la comuna 5, la cual incluye barrios ubicados alrededor del actual mercado público, así como del sector donde funcionaba hace 20 años, aproximadamente, ese mismo mercado, y donde aún se concentra gran parte de la actividad comercial del municipio, por lo cual es probable que los roedores positivos para LCMV fueran descendientes de aquellos llegados con los comerciantes cuando se reubicó el mercado. En cuanto a la presencia de ratones positivos en las comunas 6 y 7, es importante anotar que la adaptabilidad y la flexibilidad de su comportamiento individual, así como su diseño corporal simple, su alta tasa reproductiva, una alimentación generalista y el patrón de comportamiento propio de la especie *M. musculus* han impedido su erradicación (31), lo cual explicaría la presencia de individuos positivos en estas dos comunas cercanas a la 5.

El análisis de los datos reproductivos de los roedores evidenció que dos hembras positivas para LCMV estaban preñadas, y debe señalarse que este virus puede transmitirse de la madre a su descendencia a través de la placenta (32,33). Cuando el LCMV infecta a ratones en el útero o en el período neonatal, produce una infección persistente sin signos clínicos evidentes hasta que ocurre la glomerulonefritis por la formación de los inmunocomplejos. Este fenotipo clínico, característico de las infecciones por LCMV, está mediado por anticuerpos y ocurre cuando los animales se infectan antes o inmediatamente después del nacimiento. La infección del timo resulta en el desarrollo de células T tolerantes al LCMV sin función efectora para destruir las células infectadas, producir citocinas y reclutar células mononucleares en el sitio de la replicación viral, lo cual genera incapacidad para eliminar el virus (34). Mientras esta reacción de los linfocitos T citotóxicos está deshabilitada, se producen anticuerpos antivirales que circulan en el suero y forman complejos inmunitarios (35) que no son detectados fácilmente con la prueba serológica empleada en este estudio, fenómeno que podría explicar el hecho de haber obtenido secuencias de LCMV a partir de varios ratones seronegativos en la prueba ELISA.

Al nacer, o cuando se encuentran en el útero, los ratones infectados con LCMV desarrollan una infección para toda su vida que resulta en una enfermedad crónica caracterizada por la acumulación de los complejos virus-anticuerpos en los riñones y la subsecuente fijación del complemento

que, finalmente, produce una glomerulonefritis crónica fatal (36); además, desarrollan una infección viral difusa sistémica, incluida la infección neuronal generalizada (37). Después de la infección de los ratones, tanto la nucleoproteína como las glucoproteínas de la envoltura se expresan en las neuronas infectadas durante la primera semana y, aunque en las siguientes diez semanas la expresión de las glucoproteínas disminuye gradualmente, no hay disminución en los niveles de la nucleoproteína. Este fenómeno también podría tener un papel en la persistencia, ya que la ausencia de glucoproteínas (la única proteína viral expresada en la superficie celular) convertiría a las neuronas en blancos poco aptos para el reconocimiento de anticuerpos (38).

En estos ratones el virus infeccioso se excreta de forma permanente en la orina, la saliva y la leche (39), de manera que la transmisión del LCMV en roedores huéspedes naturales puede ocurrir verticalmente, horizontalmente o durante las relaciones sexuales. Sin embargo, la transmisión horizontal y la vertical pueden conducir a resultados diferentes: la primera puede causar viremia transitoria, en tanto que la segunda puede producir una infección crónica (32).

Se ha calificado al LCMV como un teratógeno fetal subdiagnosticado (40). Por ello, en el municipio de Sincelejo debería considerarse el diagnóstico en niños con hidrocefalia, microcefalia o macrocefalia, calcificaciones intracraneales, coriorretinitis o hidropesía no inmunitaria inexplicables. El diagnóstico diferencial de una infección congénita por LCMV incluye toxoplasmosis, rubéola, infecciones por citomegalovirus, virus herpes simple, enterovirus, parvovirus humano B12 y sífilis. La infección también se ha diagnosticado erróneamente como síndrome neurológico, oftalmológico y cromosómico (40).

En este sentido, se necesitan estudios adicionales para determinar la prevalencia de esta infección en las poblaciones humanas del municipio de Sincelejo y análisis prospectivos para establecer la importancia del LCMV como agente causal de enfermedades del sistema nervioso central y de las infecciones congénitas en este y otros municipios de Colombia.

Agradecimientos

Al programa “Estrategia de sostenibilidad 2015-2016” de la Universidad de Antioquia.

Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

División de Investigación de la Universidad de Sucre

Referencias

1. **York J, Berry JD, Stroher U, Li Q, Feldmann H, Lu M, et al.** An antibody directed against the fusion peptide of Junin virus envelope glycoprotein GPC inhibits pH-induced membrane fusion. *J Virol.* 2010;84:6119-29. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02700-09>
2. **Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT.** Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:229-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000300003>
3. **Charrel RN, de Lamballerie X, Emonet S.** Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11:362-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.001>
4. **Charrel RN, de Lamballerie X.** Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet Microbiol.* 2010;140:213-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.027>
5. **Zapata JC, Salvato SM.** Arenavirus variations due to host-specific adaptation. *Viruses.* 2013;5:241-78. <http://dx.doi.org/10.3390/v5010241>
6. **Childs JE, Kaufmann AF, Peters CJ, Ehrenberg RL.** Hantavirus infection--southwestern United States: Interim recommendations for risk reduction. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 1993;42:1-13.
7. **Trapido H, Sanmartín C.** Pichindé virus, a new virus of the Tacaribe group from Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1971;20:631-41.
8. **Mattar S, Guzmán C, Arrázola J, Soto E, Barrios J, Pini N, et al.** Antibody to arenaviruses in rodents, Caribbean Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1315-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101961>
9. **Arrázola-D J, Londoño A, Arroyabe E, Rodas J, Salazar-Bravo J, Mattar-VS.** Vigilancia del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en roedores reservorios de Córdoba (Colombia). *Rev Méd Evidencias.* 2014;3:5-14.
10. **Mills J, Childs J, Ksiazek T, Peters CJ, Velleca WM.** Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta, GA: CDC; 1998.
11. **Nowak R.** Walker's Mammals of the World. Sixth edition. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1999. p. 1-2015.
12. **Ledesma J, Fedele CG, Carro F, Lledó L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, et al.** Independent lineage of lymphocytic choriomeningitis virus in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1677-80. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1510.090563>
13. **Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al.** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986;321:674-9. <http://dx.doi.org/10.1038/321674a0>
14. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry.* 1977;16:5463-7.

15. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-80. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
16. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
17. **Macneil A, Stroher U, Farnon E, Campbell S, Cannon D, Paddock CD, et al.** Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis, United States, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1256-62. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.120212>
18. **Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, Tagliapietra V, Cattadori I, Perkins SE, et al.** Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. *Epidemiol Infect.* 2006;134:830-6. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268805005431>
19. **Riera L, Castillo E, Del Carmen-Saavedra M, Priotto J, Sottosanti J, Polop J, et al.** Serological study of the lymphochoriomeningitis virus (LCMV) in an inner city of Argentina. *J Med Virol.* 2005;76:285-9. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20357>
20. **Glass GE, Shields T, Cai B, Yates TL, Parmenter R.** Persistently highest risk areas for hantavirus pulmonary syndrome: Potential sites for refugia. *Ecol Appl.* 2007;17:129-39.
21. **Madhav NK, Wagoner KD, Douglass RJ, Mills JN.** Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus antibody in Montana deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and implications for human disease risk. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:353-64. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2006.0605>
22. **Lehmer E, Clay C, Pearce-Duvel J, St Jeor S, Dearing M.** Differential regulation of pathogens: The role of habitat disturbance in predicting prevalence of Sin Nombre virus. *Oecologia.* 2008;155:429-39. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-007-0922-9>
23. **Tersago K, Schreurs A, Linard C, Verhagen R, van Dongen S, Leirs H.** Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:235-44. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2007.0160>
24. **Suzan G, Marce E, Giermakowski JT, Armien B, Pascale J, Mills J, et al.** The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panamá. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1149:80-3. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1428.063>
25. **Kuenzi AJ, Douglass RJ, Bond CW, Calisher CH, Mills JN.** Long-term dynamics of Sin Nombre viral RNA and antibody in deer mice in Montana. *J Wildl Dis.* 2005;41:473-81. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-41.3.473>
26. **Hjelle B, Glass GE.** Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Niño-southern oscillation. *J Infect Dis.* 2000;181:1569-73. <http://dx.doi.org/10.1086/315467>
27. **Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, et al.** Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med.* 2006;354:2235-49. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa053240>
28. **Buchmeier MJ, Peters CJ.** Arenaviridae: The viruses and their replication. 5th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1791-828.
29. **Jamieson D, Bell M, Rasmussen S, Kourtis A.** Lymphocytic choriomeningitis virus: An emerging obstetric pathogen? *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1532-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2005.11.040>
30. **Takagi T, Ohsawa M, Morita C, Sato, H, Ohsawa K.** Genomic analysis and pathogenic characteristics of lymphocytic choriomeningitis virus strains isolated in Japan. *Comp Med.* 2012;62:185-92.
31. **Musser G, Carleton M.** Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference: Superfamily Muridae. 3rd edition. Washington, DC: Smithsonian Institution; 2005. p. 894-1531.
32. **Tagliapietra V, Rosa R, Hauffe HC, Laakkonen J, Voutilainen L, Vapalahti O, et al.** Spatial and temporal dynamics of lymphocytic choriomeningitis virus in wild rodents, northern Italy. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1019-25. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1507.081524>
33. **Zinkernagel RM.** Immunity, immunopathology and vaccines against HIV? *Vaccine.* 2002;20:1913-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00066-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00066-X)
34. **Peters CJ, Wilson MR.** Diseases of the central nervous system caused by lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses. *Handb Clin Neurol.* 2014;123:671-81. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00033-X>
35. **King CC, Jamieson BD, Reddy K, Bali N, Concepcion RJ, Ahmed R.** Viral infection of the thymus. *J Virol.* 1992;66:3155-60.
36. **Oldstone MB, Frank FJ.** Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. I. Relationship of antibody production to disease in neonatally infected mice. *J Exp Med.* 1969;129:483-505.
37. **Rodríguez M, Buchmeier MJ, Oldstone MB, Lampert PW.** Ultrastructural localization of viral antigens in the CNS of mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Am J Pathol.* 1983;110:95-100.
38. **Nathanson N, Ahmed R, Biron C, Briton M, González-Scarano F, Griffin D, et al.** Viral pathogenesis and immunity. Second edition. California, USA: Academic Press; p. 2007. p. 265.
39. **Heeney JL.** Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and prevention. *J Intern Med.* 2006;260:399-408. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01711.x>
40. **Mets MB, Barton LL.** Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: Decade of rediscovery. *Clin Infect Dis.* 2006;33:70-4. <http://dx.doi.org/10.1086/321897>