

Picobirnavirus: nuevo agente viral como probable causante de la diarrea infecciosa aguda en lechones lactantes de granjas porcícolas del estado de Yucatán, México

Marylin Puerto Solís*
Fernando Isaías Puerto Manzano*
Nina Valadez González*
María del Refugio González Losa*
Gabriel Polanco Marín*

Abstract

A new group of RNA virus was described in 1988 by Pereira. This group of viruses has only two segments of RNA; it was called Picobinavirus (PBV). Since then, it has been reported in animals and humans in several countries, but not in Mexico. In this paper the finding of these viruses in Merida, Mexico is reported. Faecal specimens were obtained from two hundred and eighty nine pigs with diarrhoea during their first month of life. Stools were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Seventy four pigs showed electrophoretic pattern for rotavirus, whereas only three showed a typical electrophoretic pattern for PBV. Characterization of the strains showed segment sizes which ranged from 2600-1600 bp. The nucleic acid was shown double-stranded RNA by nuclease digestion. This pattern resembles PBV. These findings suggest that PBV could be a new group of virus associated with gastroenteritis in pigs.

Key words: PICOBIRNAVIRUSES, DIARRHOEA, DOUBLE-STRANDED RNA VIRUSES, PAGE.

Resumen

En 1988, en Brasil, Pereira describió un nuevo grupo de virus con genoma bisegmentado de ácido ribonucleico (ARN), al que nombró picobirnavirus (PBV), desde entonces éste se ha localizado en animales y en humanos de todo el mundo. En México no existe ningún dato sobre este virus, por lo que al encontrar patrones electroforéticos semejantes a los mencionados en tres muestras de heces de lechones con diarrea infecciosa aguda (DIA), se decidió identificar este hallazgo de dos segmentos de ARN encontrado por medio de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con tinción de nitrato de plata. De las muestras analizadas, 74 presentaron un patrón electroforético de 11 segmentos de ARN característico de los rotavirus (RV) y en 3 muestras se observaron únicamente 2 bandas con distribución diferente a los RV. A estas 3 muestras se les realizó digestión enzimática con DNAsa I y RNAsa A, encontrándose que corresponden a segmentos de ARN de doble cadena de aproximadamente 2600-1600 pares de bases, semejante a lo que se ha informado para los "picobirnavirus"; por lo que estos hallazgos sugieren la existencia de un virus con dos

Recibido el 27 de enero de 1997 y aceptado el 27 de mayo de 1997.

* Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguichi" de la Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 59 x Av Itzaes 490, Apartado Postal 2-1232, Mérida, 97240, Yucatán, México, e-mail psolis@tunku.uady.mx.

segmentos de doble cadena de ARN, que son partículas representativas de un nuevo virus intestinal, asociado con gastroenteritis en lechones, aunque no se conoce el papel que desempeña en ellas.

Palabras clave: PICOBIRNAVIRUS, DIARREA INFECCIOSA AGUDA, VIRUS DE ARN DE DOBLE SEGMENTO, PAGE.

Introducción

Los virus con genoma segmentado de ARN de doble cadena han sido descritos en animales, plantas, hongos y bacteria. Estos virus se han clasificado en dos familias, la Birnaviridae, que comprende a los virus con un genoma de dos segmentos, y la Reoviridae con un genoma de diez a doce segmentos.¹

Pereira *et al.*² describieron por primera vez un virus con genoma bisegmentado de ARN de doble cadena, cuyas características morfológicas y bioquímicas diferían de los conocidos anteriormente, por lo que lo clasificaron como un nuevo grupo de virus y lo nombraron Picobirnavirus (PBV).^{3,4}

Los PBV se detectaron primeramente en heces de ratas (*Oryzomys nigripes*) en Brasil, al identificar dos bandas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con tinción de nitrato de plata. Se observó que estos segmentos migran entre los segmentos tres y cuatro, y entre el cuatro y cinco del genoma de rotavirus, respectivamente. Mediante digestiones enzimáticas con proteinasa K, DNasa I, RNasa T1 y RNasa A, se ha demostrado que estas bandas corresponden a ARN de doble cadena. De acuerdo a la migración electroforética de estos dos segmentos, en comparación con los segmentos del genoma de rotavirus, se ha estimado que tienen alrededor de 1600 y 2600 pares de bases, respectivamente, esto es en base al valor calculado por Holmes para rotavirus. Por microscopía electrónica se han identificado partículas virales de 33 a 35 nm de diámetro, las cuales en gradientes con cloruro de cesio tienen una densidad de 1.39 a 1.42 g/ml.^{5,6}

Estos virus han sido detectados en heces fecales de ratas, cobayos, cerdos, pájaros, conejos y humanos con y sin diarrea, sin que se reconozca hasta el momento qué papel desempeña en la gastroenteritis, si es un nuevo virus intestinal que pueda estar ocasionando diarrea infecciosa aguda (DIA), que sea un virus oportunista, o que sea un virus emergente.⁷⁻¹⁴

Al estar analizando heces de lechones con DIA, para el diagnóstico de rotavirus (RV), utilizando PAGE, se observaron patrones electroforéticos que migraban igual a los identificados para PBV, por lo que se procedió a la caracterización de las muestras. De esta forma se demostró los primeros casos de este nuevo grupo de virus en Yucatán, México.

Material y método

Se estudiaron 19 granjas porcícolas del estado de Yucatán, México, de donde se obtuvieron 289 muestras de heces

de lechones con un cuadro de DIA. Las muestras fueron colectadas y conservadas a -20°C hasta su utilización.

Extracción viral y PAGE

La extracción del ARN genómico se realizó de acuerdo al método descrito para rotavirus.¹⁵ Los ácidos nucleicos fueron precipitados con etanol; se analizaron mediante la técnica de PAGE y los geles fueron teñidos con nitrato de plata.¹⁶

Digestión con nucleasas

La digestión con nucleasas se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook *et al.*¹⁷ Brevemente consiste en que la ADNasa I y la RNasa A pancreática* son utilizadas a concentraciones finales de 0.3 mg/ml y 40 mg/ml, respectivamente. Los sustratos utilizados fueron ADN del fago Lambda/Hind III (ADN de doble cadena) y un ARN de doble cadena extraído y purificado de heces fecales. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 1 h en un volumen final de 50 ml, posteriormente se le añadió a la mezcla de reacción un volumen igual de solución amortiguadora de muestras (Glicerol 50%, SDS 1%, EDTA 100 mM, azul de bromofenol 0.25% y xilen-cianol 0.25%) y se incubó a 56°C durante 15 min. Finalmente se realizó el análisis mediante PAGE.

Resultados

En el análisis de las 289 muestras de heces fecales de lechones con diarrea se obtuvo que 74 (26%) muestras resultaron positivas a RV; en tres muestras (1%) (Figura 1) se pudo observar la presencia de dos bandas, las cuales se encontraron entre los segmentos tres al cinco en rela-

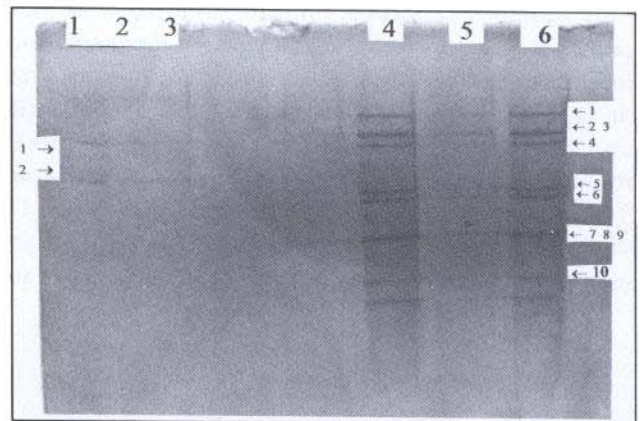


Figura 1. En los carriles 1, 2 y 3 del gel de poliacrilamida se observan los dos segmentos de ARN, en comparación con los últimos tres carriles que son muestras positivas a rotavirus.

* Sigma Chemical, ST. L. Missouri, USA.

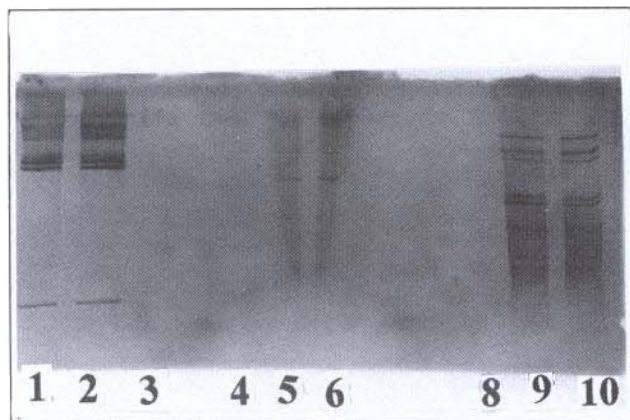


Figura 2. En este gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata se observa: En los carriles del 1 al 3, ADN del fago lambda: en el 1, sin digerir; 2, digerido con RNasa A; 3, digerido con DNasa I. En los carriles 4 a 6 los dos segmentos de ARN: 4, digestión con RNasa A; 5, digestión con DNasa I; 6, sin digerir. En los carriles 8 a 10 ARN de rotavirus: 8, digerida con RNasa A; 9, digerida con DNasa I; 10, sin digerir.

ción con los segmentos de rotavirus, lo cual corresponde a un tamaño molecular para el segmento mayor de 2600 pares de bases y para el menor de 1600 de acuerdo con la estimación de Holmes^{5,6} para RV (Figura 2). El patrón genómico de estas muestras fue muy similar entre sí y el patrón electroforético de las mismas es característico de los PBV.

Con la digestión enzimática se observó que estas dos bandas no son digeridas por la ADNasa I, pero son completamente digeridas por la ARNasa A pancreática, lo cual demuestra que son moléculas de ARN de doble cadena.

Discusión

Las bandas detectadas en las tres muestras por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida y digestión enzimática nos permiten inferir la presencia de un grupo de virus con genoma bisegmentado de ARN de doble cadena.

De las 289 muestras de heces de lechones con DIA examinadas, tres (1%) presentaron dos bandas propias de los PBV. Este porcentaje es semejante a lo que han informado otros autores en estudios con animales. Así tenemos que Pereira, en Brasil, registra una frecuencia de 0.45%^{3,4,7,12,14} y Ludert *et al.*,^{7,13} en Venezuela, del 0.5%. Sin embargo, Gallimore *et al.*^{8,10,11} que trabajaron con niños sanos y con DIA registraron frecuencias que fluctuaron entre 3.5% y 15%.

Los hallazgos descritos en este trabajo son de relevancia epidemiológica, no solamente por ser la primera ocasión que se informa sobre la presencia de estos virus en el estado de Yucatán, sino porque actualmente se desconoce si estos virus juegan algún papel en la génesis de la diarrea; sin embargo, el hecho de haberlos encontrado

en un grupo de lechones con DIA hace pensar en otro grupo de virus causante de la misma.

Con base en estos resultados es importante planear estudios epidemiológicos encaminados a conocer la frecuencia y características de distribución de estos virus en granjas porcícolas, así como aislarlos para clasificarlos, realizar estudios *in vitro* y determinar su papel como agente etiológico de la DIA, tanto en animales de importancia económica, como en los seres humanos.

Referencias

- Murphy FA, Kings DW. Virus taxonomy. In: Fields BN, Knipe DM, editors. Virology. Vol 1. New York: Raven Press, 1990:9-35.
- Pereira HG, Flewett TH, Candeias JAN, Barth OM. A virus with bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. J Gen Virol 1988;69:2749-2754.
- Pereira HG, de Araujo HP, Fialho AM, de Castro L, Monteiro SP. A virus with bisegmented double stranded RNA genome in guinea pig intestines. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989;84:137-140.
- Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JMS, Andrade ZP. Novel viruses in human faeces. Lancet 1988;9:103-104.
- Holmes IH. Rotaviruses. In: Joklik WK, editor. The reoviridae. New York: Plenum, 1983:359-423.
- Desselberger U, McCrae M. The rotavirus genome In: Raming RF, editor. Rotaviruses, current topics in microbiology and immunology. Berlin: Springer-Verlag, 1994:31-66.
- Ludert JE, Hidalgo M, Gil F, Liprandi F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double-stranded RNA genome. Arch Virol 1991;117:97-107.
- Gallimore C, Appleton H, Lewis D, Green J, Brown D. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. J Med Virol 1995;45:135-140.
- Alfieri AF, Alfieri AA, Resende JS, Resende NA. A new bisegmented double-stranded RNA virus in avian feces. Arq Bras Med Vet Zoot 1989;40:437-440.
- Gallimore C, Green J, Casemore D, Brown D. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. Arch Virol 1995;140:1275-1278.
- Gallimore C, Lewis D, Brown D. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. Arch Virol 1993;133:63-73.
- Gatti MSV, de Pestana AF, Ferraz MMG. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. Res vet Sci 1989;47:397-398.
- Ludert JE, Liprandi F. Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. Res Virol 1993;144:219-224.
- Monteiro SP, Pereira HG, Fialho AM, Leite JPG. Viruses with segmented double-stranded RNA in chickens. Arq Bras Med Vet Zoot 1991;42:141-146.
- Puerto FI, Polanco G, Puerto M, Ortega G, Góngora R. Diarrea infantil aguda por rotavirus en una población pediátrica de Mérida, Yuc., México. Bol Med Hosp Infant 1989; 46:171-174.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 1982; 16: 473-477.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Nucleases digestion. In: Irwin N, Ford N, Nolan Ch, Ferguson M, Ockler M, editors. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:5.83-4, 7.75-76.