

## ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR TEMPRANA DE ALFAVIRUS POTENCIALMENTE EPIDÉMICOS

### STRATEGIES FOR EARLY MOLECULAR DETECTION OF POTENTIALLY EPIDEMIC ALPHAVIRUSES

ZAMBRANO, JULIO

*Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Dpto. de Virología, Universidad Central de Venezuela, Escuela de Medicina Luis Razetti, Cátedra de Bioquímica.*

*jjzambrano66@gmail.com*

#### Resumen

El género Alfavirus incluye virus causantes de encefalitis: Encefalitis Equina del Este, EEE, Encefalitis Equina Venezolana, EEV ó de afectación articular: Chikungunya, Mayaro, Sindbis, todos potencialmente epidémicos. El objetivo del trabajo fue diseñar protocolos de PCR Multiplex para detección de alfavirus. Para ello, se alinearon 20 secuencias completas de cepas del complejo de EEV, incluyendo 17 epizooticas aisladas en Venezuela (1969 a 2001), Las cepas Trinidad Donkey y vacunal (TC-83), una Panameña de 1991 (enzoótica), usando SE-AL (v 2.0 para iOS). Se seleccionó una secuencia de 200 pb de la proteína E2 conteniendo mutaciones no silentes, en las cepas epizooticas y todas ausentes en las enzoóticas. Se diseñaron cebadores usando programas libres y evaluándolos con Mac Vector. PCR Multiplex: Las secuencias anteriores se alinearon con cepas de alfavirus aisladas en Venezuela (EEE, Mayaro, Chikungunya), seleccionándose una región cercana a la descrita previamente, así como el primer sentido usado por Seymour R (2015) para el diseño de cebadores anti-sentido usando SE-AL, a fin de amplificar los alfavirus mencionados por PCR Multiplex. Los cebadores se evaluaron usando cepas del banco del Laboratorio Nacional de Galveston. **Resultados y conclusiones.** El uso de cebadores obtenidos para PCR multiplex funcionaron por separado y en combinaciones para la amplificación de alfavirus, potencialmente epidémicos.

**Palabras clave:** Alfavirus, PCR, Encefalitis Equina Venezolana, Mayaro, Chikungunya, Encefalitis Equina del Este.

#### Abstract

Alphavirus genera includes viruses causing encephalomyelitis (East equine encephalitis, EEE, Venezuelan equine encephalitis, VEE), or viruses causing articular pain (Chikungunya, Mayaro, Sindbis). All of them are epidemic threats. In order to design PCR multiplex protocols for alphavirus detection, we aligned 20 VEE complex complete sequences, including 17 epizootic sequences isolated in Venezuela from 1969 to 2001, a Trinidad donkey strain, and an enzootic strain from Panama (1991) using SE-AL (iOS v. 2.0). We selected a 200 bp E2 protein sequence from epizootic strains containing non silent mutations, all absent in enzootic strain. We designed primers using free programs for primers design and then using Mac Vector for primers evaluation. PCR multiplex: VEE sequences were aligned with other sequences belonging to alphaviruses isolated in Venezuela (VEEE, Mayaro, Chiky)

and we selected a region and sense primer described by Seymour R (2015) for anti-sense primer design using SE-AL. In order to amplify alphaviruses using multiplex PCR. Primers were evaluated using strains from Galveston's National Laboratory bio-bank. Results and Concluding Remarks: PCR multiplex primers worked separately and in some combinations to amplify potentially epidemic alphaviruses.

**Keywords:** Alphavirus, PCR, Venezuelan Equine Encephalitis, Mayaro, Chikungunya, Eastern Equine Encephalitis.

## Introducción

El género *Alfavirus* (Familia *Togaviridae*), incluye cerca de 30 virus, casi todos transmitidos por artrópodos, algunos causantes de fiebre y poliartralgias como Mayaro, Sindbis y Chikungunya y otros causantes de fiebre y encefalitis como Encefalitis Equina del Este (EEE), Encefalitis Equina del Oeste (EEO) y Encefalitis Equina Venezolana (EEV); todos causantes potenciales de epidemias. El origen de cepas epizootómicas virales del complejo de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV), aun es un misterio. La hipótesis de modificaciones genéticas no se descarta, debido a que los virus RNA como el EEV son propensos a mutaciones y además a recombinaciones. Se ha establecido que gran parte de las mutaciones emergen durante el cambio de hospederos (*Greene y col. 2005*). Las mutaciones son encontradas principalmente en la glicoproteína de la envoltura E2 (*Aaron y col. 2002, Wang y col. 2003*).

## Objetivos

1. Estudiar secuencias genómicas completas de alfavirus utilizando programas informáticos para la alineación, identificación de regiones codificantes, regiones no traducidas y análisis filogenéticos.
2. Seleccionar regiones semiconservadas del genoma de diferentes cepas virales del complejo de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) e identificar mutaciones en esas regiones. Seleccionar mutaciones existentes en cepas epizooticas y/o epidémicas y ausentes en cepas enzoóticas, a fin de determinar la estrategia a seguir para el diseño de los cebadores.
3. Diseñar cebadores para la amplificación de las regiones específicas de cepas epizooticas en dos rondas de PCR (protocolo similar a PCR anidada), con la finalidad de detectar de forma rápida cepas que constituyen amenazas.
4. Seleccionar regiones codificantes de cepas de diferentes alfavirus que circulan o constituyen amenazas para Venezuela como Mayaro, Chikungunya y Encefalitis Equina del Este (EEE, variante suramericana), para el diseño de cebadores y sondas de PCR multiplex.

## Metodología

### *Selección, alineación y análisis de secuencias genómicas virales*

A partir de un listado de cepas virales del complejo EEV circulantes en las Américas, entregados por el Dpto. de Patología del Laboratorio Nacional de Galveston, se hizo la selección de 8 cepas epizooticas de virus pertenecientes al complejo EEV, aisladas en Venezuela entre 1962 y 2000. Se seleccionó una cepa de EEV ID aislada en Panamá en 2003, como virus enzoótico de referencia; una cepa vacunal (virus vacunal TC-83) y la cepa Trinidad Donkey de 1937; estas dos últimas como referencias epizooticas.

Todas las cepas seleccionadas fueron alineadas y analizadas utilizando los programas SE-AL (Versión 10.6) para Mac PC, McVector (Versión 12.7.5 para PC). Se hizo la separación de las regiones codificantes del genoma de todas las cepas alineadas para un análisis por separado.

Luego del análisis de variabilidad para las diferentes proteínas de los genomas de las cepas seleccionadas, se escogió la proteína E2, por ser una región Variable, pero en menor grado que otras regiones estudiadas, como es el caso de nsP3. Por otro lado, la región seleccionada contiene mutaciones presentes en cepas epizoóticas y ausentes en la cepa enzoótica de referencia.

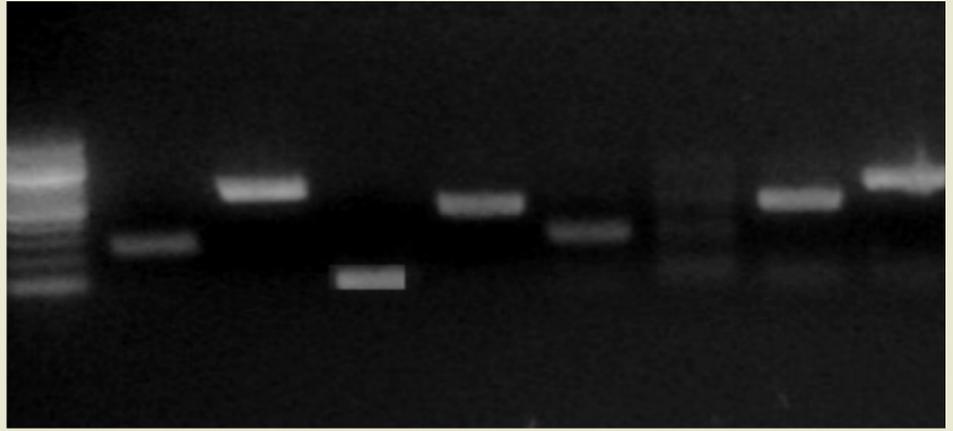
Diseño de cebadores: Se usó Programas libres (SGD web primer, Mac Vector), con base en la secuencia de la cepa Panamá 2003 publicada en GeneBank y agregando las mutaciones descritas en la Tabla 1, para el diseño de los cebadores.

**Tabla 1.** Cepas virales del complejo VEE IC seleccionadas para el estudio. Se muestran 8 cepas epizoóticas aisladas en Venezuela entre 1962 y 2000, una cepa Enzoótica ID (Panamá 213391) y la cepa Trinidad Donkey (1937), como Referencia Epizoótica. Todas las mutaciones ocurrieron en el 1er o segundo nucleótido e involucraron la aparición de aminoácidos (aa) con carga positiva, en sustitución de aa neutros o con carga negativa de la secuencia consenso.

Nombre de la secuencia	aa (pos)	Trip.						
Pan (2003) 213391	G[193]	GGG	E[199]	GAA	E[201]	GAG	T[213]	ACU
Ven (1962) PH0127			K[199]	AAA	K[201]	AAG	K[213]	AAG
Ven (1963) P676			K[199]	AAA	K[201]	AAG	K[213]	AAG
Ven (1964) PMCH05					K[201]	AAG	K[213]	AAG
Ven (1992) 243937	R[193]	AGG					R[213]	AGG
Ven (1993) 5H3	R[193]	AGG					R[213]	AGG
Ven (1995) 3908					K[201]	AAG	K[213]	AAG
Ven (2000) 254934			K[199]	AAA	K[201]	AAG	K[213]	AAG
Ven (2000) 255010					K[201]	AAG	K[213]	AAG
Trin (1943) Trinidad donkey							K[213]	AAG
Consensus	G		E		E		T	

## Resultados

Utilizando cebadores genéricos para E2 se obtuvo amplificación de todas las cepas venezolanas del complejo de EEV (resultados no mostrados). El uso de los cebadores internos los cuales contenían las mutaciones epizoóticas previamente descritas (Aaron y col. 2002, Beitzel y col. 2002, Wang y col. 2003), no permitió la amplificación específica de cepas epizoóticas (resultados no mostrados). Utilizando el primer sentido para detección de chikv (Seymour y col. 2015) y los cebadores anti-sentido genéricos para E2, diseñados en la fase anterior se obtuvo amplificación para la cepa de EEE; este resultado permitió aplicar los conocimientos adquiridos en el diseño de un protocolo multiplex para la identificación de alfavirus con potencial epidémico, alineando el primer sentido mencionado (Seymour y col. 2015) con genomas completos de cepas de alfavirus (Chikv, Mayaro, EEE y EEV) publicadas en Genebank, a fin de diseñar cebadores anti-sentido flanqueando regiones específicas de longitudes convenientes, a fin de amplificar cepas disponibles en el Laboratorio Nacional de Galveston a través de protocolo de PCR multiplex para alfavirus, utilizando el programa SE-AL. Los resultados se muestran a continuación.



**Figura 1.** Protocolo de PCR multiplex para la detección de alfavirus con potencial epidémico. El canal 1 contiene el marcador de PM. Usando los cebadores específicos por separado, se obtuvo amplificación de las cepas correspondientes. Las longitudes de los segmentos fueron: 247 pb para Mayaro (canal2), 585 pb de EEE (Canal 3), 87 Pb de CHIKV (Canal 4) y 426 pb de TC-83 (Canal 5). 6) Mezcla de cebadores de Mayaro y EEE con muestra de Mayaro: 7) Cebadores de MAY y CHIKV con muestra de CHIKV, 8) Y 9) Mezcla de todos los cebadores con muestra de TC-83 y EEE, respectivamente.

## Discusión

Tomando la secuencia de referencia para este trabajo, del genoma de un virus de EEV subtipo ID (Cepa Panamá 213391) y haciendo modificaciones en la región E2, correspondientes a las mutaciones encontradas para esa proteína pero en cepas epizoóticas, varias de éstas reportadas como posibles responsables de incremento de la virulencia ó de la adaptabilidad al vector antropofílico, se obtuvo amplificación usando cebadores diseñados con mutaciones, especialmente cerca del extremo 3' del primer anti-sentido, obteniéndose la amplificación de cepas epizoóticas, aunque hubo amplificación de la cepa enzoóticas. Es posible que haciendo variaciones continuas en las temperaturas de hibridación así como en la concentración de Mg ó de los cebadores, pudiese obtenerse la especificidad deseada; sin embargo, los conocimientos adquiridos con el uso de programas informáticos de análisis de secuencias permitió el diseño de un protocolo de PCR multiplex con el cual se obtuvo amplificación específica de cepas disponibles en el banco de cepas del Laboratorio Nacional de Galveston, haciendo el diseño de cebadores para cepas disponibles en GeneBank.

## Conclusiones

1- Hubo amplificación de todas las cepas de estudio usando los cebadores genéricos diseñados para E2 con base en la secuencia Panamá 2003.

2- Los cebadores diseñados para amplificar selectivamente cepas epizoóticas, amplificaron la cepa enzoótica de referencia Panamá 2003, sin embargo, hubo amplificación de dos cepas epizoóticas P676 y SH3, pero no hubo amplificación para la mayoría de las cepas epizoóticas.

3- Los cebadores diseñados para detección de alfavirus con potencial epidémico, amplificaron las regiones del tamaño esperado cuando se usaron por separado y amplificaron EEE y TC-83 cuando se utilizaron todos los pares mezclados.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue una pasantía realizada en el Laboratorio Nacional de Galveston, Universidad de Texas Medical Branch (UTMB), bajo la supervisión del Dr. Scott Weaver, quien orientó todo el estudio y realizó los trámites para la permisología y acceso a las diferentes áreas de trabajo y reactivos. Los reactivos, materiales y equipos utilizados fueron aportados en su integridad por el Laboratorio Nacional de Galveston. El Dr. Jonathan Auguste, miembro del equipo de Laboratorio estuvo a cargo del entrenamiento en los programas informáticos, así como en la mayoría de las técnicas aplicadas. La Dra. Eryu Wang constituyó apoyo crucial en el desarrollo de los ensayos de PCR y en el aporte de Reactivos. El Dr. Robert Tesh y la Dra. Hilda del Banco de Cepas de la UTMB, fueron apoyo invaluable en el aporte de varias de las cepas utilizadas. A la Sra. Grace Leal un agradecimiento especial por su apoyo logístico, asistencia en las técnicas de laboratorio y gran calidad humana. Al resto del personal del laboratorio del Dr. Weaver gracias por su apoyo desinteresado.

## Bibliografía

- AARON C. BRAULT, ANN M. POWERS, EDWARD C. HOLMES, C. H. WOELK, AND SCOTT C. WEAVER (2002). *Positively Charged Amino Acid Substitutions in the E2 Envelope Glycoprotein Are Associated with the Emergence of Venezuelan Equine Encephalitis Virus*. J Virology, p. 1718–1730
- BEITZEL BF, BAKKEN RR, SMITH JM, SCHMALJOHN CS (2002) *High-Resolution Functional Mapping of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus Genome by Insertional Mutagenesis and Massively Parallel Sequencing*. PLoS Pathog. 6(10): e1001146. doi:10.1371/journal.ppat.1001146.
- GREENE IVORLYNE P., PAESSLER SLOBODAN, AUSTGEN LAURA, ANISHCHENKO MICHAEL, BRAULT AARON C., BOWEN RICHARD A. AND WEAVER, SCOTT C. (2005). *Envelope Glycoprotein Mutations Mediate Equine Amplification and Virulence of Epizootic Venezuelan Equine Encephalitis Virus* Journal of Virology; 79(14):9128-9133.
- MALET H, COUTARD B, JAMAL S, DUTARTRE H, PAPAGEORGIOU N, ET AL (2009). *The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket*. Journal of Virology. 83: 6534–6545
- PISANO M B, G ORIA, G BESKOW, J AGUILAR, B KONIGHEI, M L CACACE, L AGUIRRE, M STEIN, M S CONTIGIANI (2013) *Venezuelan Equine Encephalitis Viruses (VEEV) in Argentina: Serological Evidence of Human Infection*. PLOS Neglected Tropical Diseases. Vol.7 Issue 12:1-7
- SEYMOUR RL, ADAMS AP, LEAL G, ALCORN MDH, WEAVER SC (2015) *A Rodent Model of Chikungunya Virus Infection in RAG1 -/- Mice, with Features of Persistence, for Vaccine Safety Evaluation*. PLoS Negl Trop Dis 9(6): e0003800.doi:10.1371/journal.pntd.0003800.
- VARJAK M, ZUSINAITE E, MERITS A (2010) *Novel Functions of the Alphavirus Nonstructural Protein nsP3 C-Terminal Region*. J Virol 84:2352–2364.
- WANG ERYU, BRAULT AARON C., POWERS ANN M., KANG WENLI AND WEAVER SCOTT C. (2003) *Glycosaminoglycan Binding Properties of Natural Venezuelan Equine Encephalitis Virus Isolates* Journal of Virology;77(2):1204-1210