

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Detección del virus de encefalomiocarditis en roedores
de diferentes zonas del Perú**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Roger Melvin Castillo Oré

Lima - Perú

2010

La presente tesis esta dedicada a la paciencia de mi esposa Maribel y mis hijas Alexia y Sandra.

INDICE:

LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUCCIÓN	01
II. GENERALIDADES	02
2.1. Familia Picornaviridae	02
2.2. Clasificación taxonómica	04
2.3. Virus encefalomyocarditis (V-EMC)	06
2.4. Diagnóstico de Laboratorio	08
2.4.1. Enzima inmuno ensayo (ELISA)	08
2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	09
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Tipo de estudio	11
3.2 Población	11
3.3 Muestra	11
3.4 Métodos	12
3.4.1 Captura de roedores	12
3.4.2 Identificación de roedores	12
3.4.3 Determinación de anticuerpos IgG anti-VEMC por ELISA	12

3.4.4 Análisis de ARN viral por PCR en tejidos de los roedores IgG anti-VEMC positivos	14
IV. RESULTADOS	17
4.1 Identificación de la población de roedores	17
4.2 Determinación de anticuerpos IgG anti-VEMC por ELISA	21
4.3 Reacción en cadena de las polimerasas (PCR)	25
V. DISCUSIÓN	26
VI. CONCLUSIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30
VIII. ANEXOS	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la familia <i>Picornaviridae</i> .	5
Cuadro 2. Localidades donde se capturaron los roedores.	18
Cuadro 3. Población de roedores capturados por género y departamento	19
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de los roedores, según departamentos	20
Cuadro 5. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en la población de roedores por especie.	22
Cuadro 6. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en roedores de la subfamilia Murinidae por departamento.	24
Cuadro 7. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en roedores de la sub familia Sigmodontinae por departamento.	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los <i>Picornavirus</i> .	2
Figura 2. Genoma y expresión de los <i>picornaviridae</i> .	4
Figura 3. Mapa descriptivo por departamentos de los roedores capturados durante 2004 y 2005.	23

RESUMEN

Antecedentes: El virus *Encefalomiocarditis* (V-EMC) pertenece al género *Cardiovirus*; familia *Picornaviridae*. El virus EMC infecta muchas especies de animales incluyendo cerdos, roedores, ganado vacuno, elefantes, mapaches, marsupiales y primates como monos, chimpancés y humanos. Ratas y ratones son hospederos naturales del virus y pasa a otras especies por transmisión fecal-oral. En roedores, V-EMC causa lesiones en el corazón, páncreas, sistema nervioso central.

Objetivos: En el presente trabajo se presento el rol potencial que juegan lo roedores como reservorios en la transmisión del virus EMC en el Perú.

Materiales y Métodos: Muestras sanguíneas de 497 roedores pertenecientes a 23 especies (298 Murinae y 199 Sigmodontinae) capturados en 10 diferentes departamentos del Perú. Cada muestra sanguínea fue procesada para buscar anticuerpos de tipo IgG contra V-EMC mediante el Ensayo Inmuno Enzimático (EIA) usando antígenos preparados del virus recuperado de uno de los casos humanos en el Perú (IQD 7626). Los positivos fueron evaluados por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Resultados: de los 497 roedores, un total de 30 muestras de 5 especies fueron positivas: 4 (29%) de 14 *Rattus norvegicus*, seguido por 19 (13%) de 151 *R. rattus*, 5(4%) de 133 *Mus musculus*, 1 (3.8%) de 26 *Phyllotis limatus* y 1 (4%) de 25 *Akodon molli*. Los roedores positivos hallados fueron en los departamentos: Cajamarca, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Tacna, Tumbes y Piura. Solo 2 de 199 roedores del Nuevo mundo evaluados mostraron evidencia de infección con V-EMC.

ABSTRACT

Antecedents: *Encephalomyocarditis* virus (EMCV) belongs to the genus *Cardiovirus*; family *Picornaviridae*. The EMC virus infects many animal species including pigs, rodents, cattle, elephants, raccoons, marsupials, and primates such as baboons, monkeys, chimpanzees and humans. Rats and mice are the natural hosts of the virus, passing the virus to other species through fecal-oral transmission. In rodents, EMCV causes lesions in the heart, pancreas and central nervous system.

Objectives: Herein is presented findings from our investigation of the potential role played by rodents as a reservoir for the transmission of the EMC virus in Peru.

Materials and methods: We tested serum from 497 rodents representing 23 species (298 Murinae and 199 Sigmodontinae) captured from 10 different departments of Peru. Each serum specimen was tested for IgG class antibodies to ECMV by enzyme immunoassay (EIA) using antigen prepared from virus recovered from a human case (IQD 6726). All positives were evaluated by PCR test.

Results: From 497 rodents a total of 30 sera from 5 species were positive: 4 (29%) of 14 *Rattus norvegicus*, followed by 19 (13%) of 151 *R. rattus*, 5(4%) of 133 *Mus musculus*, 1 (3.8%) of 26 *Phyllotis limatus* and 1 (4%) of 25 *Akodon molli*. Positive rodents were collected from 7 departments: Cajamarca, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Tacna, Tumbes and Piura. Only 2 of the 199 New-world rodents tested showed evidence of EMCV infection.

I. INTRODUCCION

El Virus de *Encefalomiocarditis* (V-EMC) presenta distribución mundial, con reportes de aislamientos en Norte América, Sud América, Europa, África y Australia; en su mayoría provenientes de animales como chimpancés, orangutanes, caballos, cerdos, leones y muchos otros animales silvestres. El virus puede causar pérdidas económicas muy graves en brotes de animales de granja (8). En humanos estudios previos de seroprevalencia indican que las infecciones con V-EMC son relativamente comunes en ciertas áreas del mundo, tales como en Perú, México, Panamá, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Grecia, Etiopia, Taiwán y Bangladesh; considerándose muchos de los casos como asintomáticos o indiferenciados y solo casos muy esporádicos son clínicamente manifestados (11,12).

El presente estudio tiene por objetivos identificar la presencia del V-EMC en roedores capturados en diferentes departamentos del Perú y determinar su importancia como reservorios y transmisores del V-EMC a humanos y otros animales; para ello buscamos anticuerpos de tipo IgG contra el virus de *Encefalomiocarditis* en roedores y confirmamos la presencia/ausencia del agente viral en aquellos positivos a anticuerpos, utilizando la técnica de la reacción en cadena de las polimerasas (PCR).

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de virología del centro de investigaciones en enfermedades tropicales de Marina de los Estados Unidos (NMRCD) con sede en Lima, Perú.

II. GENERALIDADES

2.1. Familia *Picornaviridae*

La familia *Picornaviridae* agrupa virus que infectan tanto a humanos como animales. La denominación de *picornavirus* proviene del griego “pico”, que hace referencia a virus pequeños. El genoma es de ARN cadena simple, sentido positivo, de 7000 a 8500 nucleótidos de longitud, el cual está rodeada por una cápside desnuda (sin envoltura) icosaédrica de aproximadamente 30 nm de diámetro. La cápside tienen 12 vértices pentaméricos, cada uno de los cuales está compuesto de cinco unidades protoméricas de proteínas (60 protómeros), cada uno consiste de 4 polipéptidos VP1, VP2, VP3 y VP4. VP4 está localizado en la cara interna de la cápside (1, 2,3).

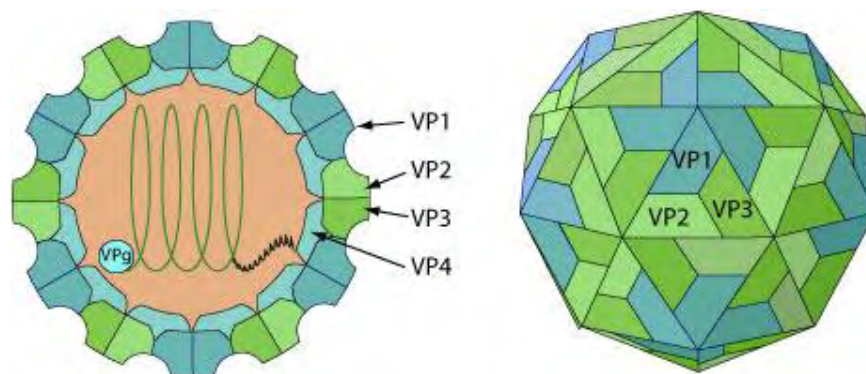


Figura 1. Estructura de los *Picornavirus* (25)

En general los picornavirus no son sensibles a tratamientos con cloroformo, éter y detergentes no iónicos (2).

La replicación de los *picornavirus* ocurre enteramente en el citoplasma. Se inicia con la adhesión del virus a los receptores celulares (1).

Los receptores han sido identificados para varios *picornavirus* usando técnicas como: unión de competición entre diferentes virus, uso de anticuerpos monoclonales para bloquear unión de virus y marcado con fluoresceína de virus. Como ejemplo podemos citar el receptor ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1, CD54), identificado como receptor de rino virus humano serotipo 91 y para el virus de la *Encefalomiocarditis* humana (V-EMC) el receptor identificado es VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule, CD106) (1,2).

Lograda la adherencia de los virus a los receptores, se forma una vesícula recubierta, luego se libera el ARN genómico dentro del citoplasma celular a través de un canal de membrana; el genoma se une directamente a los ribosomas, donde se sintetiza una poliproteína que contiene todas las secuencias proteicas del virus. Esta poliproteína se extiende con las proteasas virales que lleva codificada. La ARN polimerasa viral ARN dependiente crea una plantilla de ARN de cadena negativa a partir del cual se puede formar más ARNm/genoma, y otras plantillas. Algunos *picornavirus* inhiben la síntesis del ARN celular y de proteínas durante la infección bloqueando la unión de ARNm celular al ribosoma. (1,2,3).

A medida que se replica y transcribe el genoma viral, se escinden las proteínas estructurales VP0, VP1 y VP3 de la poliproteína, mediante una proteasa codificada por el virus, y se ensambla en sub unidades. Un total de 5 subunidades se agrupan en pentámeros, y cada 12 pentámeros se unen para formar una procápside. Tras la inserción del genoma, la VP0 se divide en VP2 y VP4 para completar la cápside. Finalmente liberándose; que lo común ocurre por lisis de la celular hospedera (1,2,4).

En general la cinética de replicación de los *picornavirus* es rápida, el ciclo se completa de 5 a 10 horas (1).

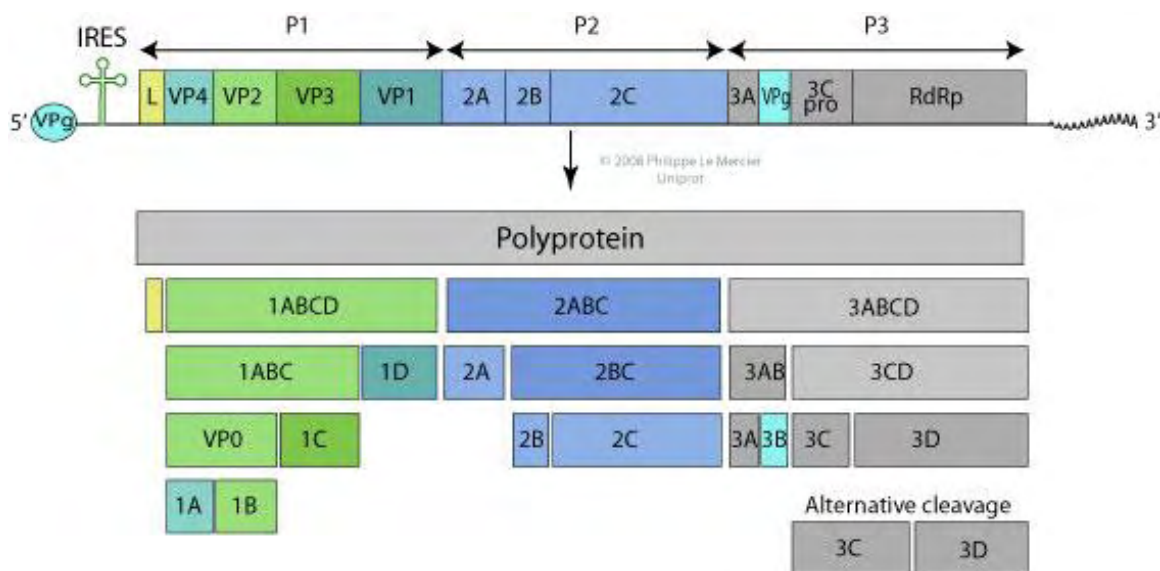


Figura 2. Genoma y expresión de los *picornaviridae* (25)

2.2. Clasificación taxonómica

El ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en su versión 2008 (5) clasifica la familia *Picornaviridae* en 8 géneros, descritos en la tabla 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la familia *Picornaviridae* (5)

Familia:	<i>Picornaviridae</i>	(8 Géneros)
Género:	<i>Aphthovirus</i>	(2 Especies)
Especie:		<i>Equine rhinitis A virus</i>
Especie:		<i>Foot-and-mouth disease virus</i>
Género:	<i>Cardiovirus</i>	(2 Especies)
Especie:		<i>Encephalomyocarditis virus</i>
Especie:		<i>Theilovirus</i>
Género:	<i>Enterovirus</i>	(10 Especies)
Especie:		<i>Bovine enterovirus</i>
Especie:		<i>Human enterovirus A</i>
Especie:		<i>Human enterovirus B</i>
Especie:		<i>Human enterovirus C</i>
Especie:		<i>Human enterovirus D</i>
Especie:		<i>Human rhinovirus A</i>
Especie:		<i>Human rhinovirus B</i>
Especie:		<i>Porcine enterovirus A</i>
Especie:		<i>Porcine enterovirus B</i>
Especie:		<i>Simian enterovirus A</i>
Género:	<i>Erbovirus</i>	(1 Especie)
Especie:		<i>Equine rhinitis B virus</i>
Género:	<i>Hepatovirus</i>	(1 Especie)
Especie:		<i>Hepatitis A virus</i>
Género:	<i>Kobuvirus</i>	(2 Especies)
Especie:		<i>Aichi virus</i>
Especie:		<i>Bovine kobuvirus</i>
Género:	<i>Parechovirus</i>	(2 Especies)
Especie:		<i>Human parechovirus</i>
Especie:		<i>Ljungan virus</i>
Género:	<i>Teschovirus</i>	(1 Especie)
Especie:		<i>Porcine teschovirus</i>

2.3. Virus *Encefalomyocarditis* (V-EMC)

El V-EMC al igual que el resto de los *picornaviridae*, es un virus desnudo (sin envoltura), contiene una cadena simple de ARN de sentido positivo, peso molecular 2.6×10^6 Daltons. La partícula viral es icosaédrica, resistente a éter, pH ácidos (hasta pH 3.0) y se mantienen bien a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6, 7, 8).

En 1940 Jungerblut y Sanders reportaron el primer aislamiento de V-EMC en ratones de algodón, inoculados inicialmente con el virus de la poliomielitis (Cepa SK) proveniente de monos (9). A partir de esa fecha, a nivel mundial se han reportado la presencia de V-EMC en varias especies de animales, tales como: monos, cerdos, aves, elefantes, roedores y algunos artrópodos (11).

La ruta primaria de la infección del virus en animales es aún incierta, pero se sospecha que un animal adquiere la enfermedad por la ingesta de alimentos y/o agua contaminada con heces de ratas u otros roedores que contengan el V-EMC (8).

Signos clínicos en animales de zoológicos incluyen anorexia, letargo decaimiento, incoordinación, salivación y espuma por nariz 12 a 24 horas antes de la muerte (12). Animales infectados experimentalmente muestran diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad; Conejos inoculados con el V-EMC usualmente cursan una infecciones inaparentes, Monos rhesus no manifiestan ningún signo clínico de la infección, a pesar de encontrarse elevadas concentraciones del virus; el mono nocturno (*Autus trivirgatus*) es altamente susceptible a la infección, produciendo en estos una enfermedad fulminante (7,8) En ratones produce encefalitis fatal; la enfermedad se inicia con letargo, parálisis flácida, seguido por postración y muerte dentro de la 24 – 96 horas dependiendo de la dosis infectante (10).

El V-EMC puede ser aislado y cultivado en laboratorio usando huevos embrionados y/o línea celulares como VERO y HeLA (7).

V-EMC es raramente reconocido como causante de enfermedad en humanos, y solamente existen algunos reportes de casos aislados, aunque estudios de prevalencia serológica indican la presencia del virus en varias poblaciones del mundo (11,12).

En 1948 se reporta en una infección accidental en un trabajador de laboratorio en Entebbe, Uganda que demostró la patogenesidad de este agente en el hombre, quien desarrollo una encefalitis, y el virus fue aislado del suero (13). Desde 1949 han aparecido reportes de nuevos aislamientos de V-EMC en Alemania de jóvenes pacientes quienes sufrieron meningitis aséptica, enfermedades parecidas a la poliomiélitis y síndrome "Guillain-Barre"; Uno de los aislamientos se efectuó a partir de una muestra de fluido cerebro espinal de un niño de 6 años de edad quien sufría una poliradiculitis del tipo "Guillain-Barre"; también se aislaron de tres casos clínicos de muestras de sangre, fluido cerebro espinal y heces (14). En los países bajos (Holanda) también aislaron de muestras de heces de tres niños entre 1 a 2 años de edad; quienes sufrían meningitis aséptica, poliomiélitis paralítica y encéfalomielitis (14).

En el Perú, el Virus de EMC fue aislado por primera vez el año 2004 en dos personas. Uno en el departamento de Loreto, ciudad de Iquitos, en muestra de suero de una mujer, ama de casa, de 56 años de edad que cursaba un cuadro febril acompañando con hiporexia, malestar, nauseas y dolor de cabeza. El segundo en el departamento de Cuzco, localidad de Quebrada, distrito de Yanatile, provincia de Calca, también en muestra de suero de un varón, agricultor, de 39 años de edad quien presentaba síntomas de fiebre, dolor de cabeza, malestar, dolor retro ocular, perdida de peso, artralgia, fotofobia, hiporexia, mialgia, escalofríos, náuseas, vómitos y dolor abdominal (15).

2.4. Diagnóstico de laboratorio

Los ensayos de laboratorio están orientados al tipo de estudio planteado. Si sospechamos la infección con el virus en un hospedero enfermo, se debe recuperar e identificar el agente involucrado. Para la recuperación o aislamiento del virus se pueden usar animales susceptibles o cultivos celulares, y para su identificación usamos técnicas como Inmuno fluorescencia o PCR (8).

Para búsqueda de anticuerpos se pueden implementar técnicas serológicas como ELISA y pruebas de neutralización (16).

2.4.1. Enzima Inmuno Ensayo (ELISA)

Reacciones inmunológicas son usadas como ensayos de detección, por que estos dan altos niveles de especificidad y sensibilidad. Anticuerpos o antígenos marcados son la clave para estos ensayos. El ELISA de sus siglas en el Ingles “Enzime Linked Immunosorbet Assay”; es una técnica inmuno enzimática ampliamente usada que se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (16, 17,18).

Existen varios tipos o variantes de ELISA, entre ellos tenemos:

ELISA Directo.
ELISA Indirecto.
ELISA sándwich.
ELISA competitivo.

2.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR por sus siglas en inglés (**P**olymerase **C**hain **R**eaction), es una técnica descrita por primera vez en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo fragmento original, o molde. En si el PCR es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA. La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5´-> 3´ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3´ del fragmento de DNA que se desea amplificar (17).

En resumen la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas (17):

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena.

2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3´ específica de cada una de las hebras.

3ª Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93 - 97 °C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50 – 65 °C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

Observacional, descriptivo.

3.2 Población

497 roedores capturados en los departamentos de Arequipa, Ancash, Cajamarca, La libertad, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Piura, Tacna y Tumbes.

3.3 Muestra

3.3.1 sangre.

3.3.2 Tejidos.

Las muestras de sangre y tejidos (pulmones y bazo) fueron obtenidos de roedores capturados, luego transportadas al laboratorio usando contenedores con nitrógeno líquido. En el laboratorio fueron conservadas a -70 °C hasta su procesamiento.

3.4 Métodos

3.4.1 Captura de roedores

El procedimiento de captura, obtención de tejidos y sangre se efectuó de acuerdo al manual de métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. (19)

Brevemente. Los roedores fueron capturados usando trampas Sherman y Tomahawk, ubicadas en los distintos lugares de interés. Los roedores capturados fueron procesados en un lugar apartado y al aire libre; el procesamiento involucró: **Anestesiado**, para ello se uso algodón empapado con Metofano, dentro de una bolsa plástica. **Pesaje y medición**, peso corporal, longitud total, longitud de cola, largo de oreja y largo de pata derecha trasera. **Sangrado**, se uso tubos capilares para sangrado retroorbital. **Autopsia**, se realizó después de la eutanasia del animal (por dislocación cervical), la autopsia permitió obtener los tejidos de interés. **Almacenamiento** de las muestras en contenedores de transporte conteniendo nitrógeno líquido.

3.4.2 Identificación de roedores

La identificación taxonómica para cada roedor capturado fue realizada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.4.3 Determinación de anticuerpos IgG anti-VEMC por ELISA

3.4.3.1 Preparación de antígeno viral para la prueba de ELISA. Para la preparación del antígeno se siguieron los procedimientos estándares del laboratorio de virología del NMRCD.

La suspensión de la cepa viral V-EMC IQD 6726 (virus aislado de una persona enferma de Iquitos – Perú) se replicó inoculando en 10 frascos de 170 cm² de área superficie, conteniendo monocapa de cultivos celulares Vero procedentes de riñón de mono verde africano. Para ello se descartó el medio de cultivo dejando solo la monocapa, sobre el cual se inoculó 0.01 MOI (de sus siglas en inglés Multiplicity of infection), que es la relación cantidad de virus por célula. Se dejó adsorber por una hora, luego se agregó medio de mantenimiento y se incubó por 24 horas donde se observó efecto citopático de aproximadamente 80%. El cultivo infectado se colectó para su inactivación.

La suspensión viral inactivada se centrifugó a 7,000 RCF (fuerza relativa de centrifugación o gravedades) por 20 minutos para clarificarlo de los restos celulares, el sobrenadante fue recuperado y se le agregó NaCl 2.3% y PEG 7% (Polietilenglicol PM 8,000) como concentraciones finales en la suspensión viral, se incubó por 12- 24 horas a 4 °C; posteriormente se centrifugó a 10,000 RCF por 30 minutos, cuidadosamente se retiró el sobrenadante y el sedimento fue reconstituido en 20 ml de Buffer tris (2 ml por cada frasco), rotulado, alicuotado y almacenado hasta su uso.

El mismo tratamiento se repitió con cultivos celulares sin infectar para obtener controles de antígeno.

3.4.3.2 Inactivación de los antígenos virales. La colección de cultivo viral se inactivó con “binary ethylenimine” (BEI) a una concentración final de 3 mM, por 7 días a 4 °C; periodo en el cual se procedió a neutralizar la actividad tóxica del BEI con tiosulfato de sodio (26, 27, 28). La completa inactivación fue evaluada con sub cultivos del material tratado.

3.4.3.3 Estandarización de la prueba de ELISA. La prueba de ELISA se estandarizó empleando como controles positivos, suero de ratones

inmunizados en el laboratorio y como controles negativos muestras de sueros de ratones sanos de laboratorio.

Al antígeno viral preparado se hizo diluciones seriadas en buffer fosfato salino (PBS) e impregno en placas de poliestireno Immulon II por toda la noche, al día siguiente las placas se lavaron por cinco veces empleando buffer de lavado, después de secarlas cuidadosamente se añadieron los sueros controles, luego se incubó por una hora a 37 °C, posteriormente se volvió a lavar y se agregó diluciones seriadas de conjugado anti-ratón con peroxidasa; se incubó por una hora a 37 °C. Se volvió a lavar y se añadió el sustrato sistema ABTS (H₂O₂ + cromógeno); se incubó por 30 minutos a 37 °C y se realizó la lectura de la placa coloreada usando una lectora de placas para ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Finalmente se determinó la dilución de uso apropiado del antígeno y conjugado para su uso en la prueba.

3.2.3.4 Procesamiento por ELISA de las muestras de sangre de los roedores para la búsqueda de anticuerpos IgG para V-EMC. 497 muestras de sangre de diferentes roedores fueron ensayadas para detectar anticuerpos de tipo IgG usando el ELISA indirecto estandarizado.

3.4.4 Análisis de ARN viral por PCR en tejidos de los roedores IgG anti-VEMC positivos

Experimentos de reportes previos, (23) indican que puede aislarse el virus post infección; en tejidos de: bazo, pulmones, corazón, placas de peyer y timo. Para el presente estudio se analizaron por la prueba de RT-PCR tejidos colectados de bazo y pulmones de los roedores con reacción positiva IgG anti-VEMC por ELISA.

3.4.4.1 Extracción de ARN de Tejidos. Aproximadamente 100 mg de tejido de pulmones y bazo, de los roedores positivos por ELISA se

usaron para extraer el ARN viral, para ello se utilizó el Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QUIAGEN), catálogo: 52906 y se siguió el procedimiento descrito en el Kit de Quiagen para extracción de ARN (20). Describiendo brevemente se siguió el siguiente procedimiento.

Se trituró el tejido en tubos de 1.5 ml conteniendo 200 µl Buffer RLT (proveído por el kit) con beta-mercapto etanol (B-ME), luego se completó con 400 µl de Buffer RLT con B-ME y homogeneizó; se centrifugó a 9,000 RCF por 3 minutos, luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml, se agregó 1 volumen (600 µl) de Etanol al 70% y mezcló por pipeteo. 700 µl de la mezcla fue transferida en las mini columnas de RNeasy, y centrifugó a $\geq 8,000$ RCF (10,000 RPM) por 15 segundos, se descartó el filtrado, luego se agregó a las columnas 700 µl de Buffer RW1 y se volvió a centrifugar a $\geq 8,000$ RCF (10,000 RPM) por 15 segundos, se descartó el filtrado y el tubo de colección, las columnas fueron transferidas a otro tubo de colección (2 ml) y se agregó 500 µl de buffer RPE en la columna y se centrifugó a $\geq 8,000$ RCF (10,000 RPM) por 15 segundos, nuevamente se agregó 500 µl de buffer RPE en la columna y centrifugó por 2 minutos a $\geq 8,000$ RCF (10,000 RPM). Para la elución se transfirió la columna en un nuevo tubo de colección de 1.5 ml y se agregó 30 – 50 µl de agua libre de ARNasa directamente y se centrifugó por 1 minuto a $\geq 8,000$ RCF (10,000 RPM), finalmente se guardó el producto de RNA a -70 °C hasta ser procesado.

3.4.4.2 Prueba de RT- PCR. La prueba de RT-PCR se llevó a cabo siguiendo procedimientos descritos previamente (21, 24) y modificado para el presente estudio.

Para cada reacción de Retro Transcripción (RT), se tomó 5 µl de la extracción de ARN (ajustado a 0.05 µg/µl) y se añadió sobre 7.7 µl de RT-Primer (EMC-2B188R), se mezcló y se centrifugó por unos segundos para agrupar la mezcla y se llevó a un termociclador para calentarlo a 70 °C por 5 minutos, luego se dejó enfriar a 20 °C por 2 minutos. En este paso de

desnaturalizó la estructura secundaria del ARN y se permitió acoplar el primer en el objetivo de la secuencia del genoma viral.

Luego se agregó 8.3 μ l de una premezcla de buffer RT /enzima RT (8 μ l de buffer RT y 3 μ l de enzima RT). Se mezcló cuidadosamente y centrifugó; se llevó a un termociclador con los siguientes parámetros de corrida: 42 °C por 1 hora, 95 °C por 5 minutos y 4 °C hasta su posterior uso. Durante este paso la enzima RT copia el ARN genómico en ADN complementario (cADN).

Para la reacción de PCR se agregó 5 μ l del producto de la reacción de retro transcripción (RT), es decir el ADN complementario (cADN) en tubos conteniendo pre mezcla de 20 μ l de los primers EMC-2B188R y EMC-1C340F (ver anexo); la mezcla se llevó al termociclador para calentarlo a 80 °C por 2 minutos, en este momento se adiciona la mezcla PCR Buffer Taq 60 polimerasa (10 μ l de PCR buffer y 0.3 μ l de Taq 60 Polimerasa), luego se llevó a 94 °C por 3 minutos, para iniciar la reacción; luego se corrió los 25 ciclos del PCR con los siguientes parámetros 94 °C por 1 minuto, luego 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, concluida los 25 ciclos se siguió a 72 °C por 2 minutos mas para la extensión final, luego se enfrió a 4 °C hasta su corrida electroforética.

Para la corrida electroforética se uso geles de agarosa al 1.5% en buffer tris borato EDTA (TBE), en cámara electroforética con voltaje de 110V por una hora; volumen de cargado 8 μ l.

El revelado de bandas se hizo usando bromuro de etidio.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de roedores capturados

Se capturaron 497 roedores en diferentes localidades (tabla 2) de los departamentos de Arequipa, Ancash, Cajamarca, La libertad, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Piura, Tacna y Tumbes; cuya distribución se muestra en la tabla 3. Los generos representates de los roedores capturados pertenecen a la orden Rodentia, Sub Orden Sciurognathi, superfamilia Muroidea. Los géneros *Mus* y *Rattus* pertenecen a la familia Muridae, Sub familia Murinae (Involucran especies de ratas y ratones del viejo mundo). Los géneros *Calomys*, *Abrothrix*, *Akodon*, *Bolomys*, *Holochilus*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Phyllotis* y *Thomasomys* pertenecen a la familia Cricetidae, sub familia Sigmodontinae (Involucran especies de roedores del Nuevo mundo). La tabla 4 muestra la clasificación taxonómica de los roedores capturados.

Cuadro 2. Localidades donde se capturaron los roedores.

Departamento	Provincia	Localidad	Cantidad
Ancash	Huaylas	Yuracmarca	8
		Villa Sucre	14
Arequipa	Condesuyos	Chuquibamba	2
	Arequipa	Quiscos, Pampa de Arrieros	30
	Caylloma	Yanque, Achoma, Maca	49
Cajamarca	San Pablo	Sapotal	7
		Hualabamba	7
	San Miguel de Pallanques	El Guayo	5
		Lic Lic	2
	Cajamarca	Huanahuana	1
		Amillas	4
Santa Cruz	Munana	4	
	Picuy	3	
	El Monte	5	
Catache		9	
La Libertad	Gran Chimú	Cascas, Pampa larga	1
		Cascas, Chuchalac	1
		Cascas, Pampa San Isidro	1
Lamabayeque	Ferreñafe	Moyán	8
		Alto Moyán	4
		Uyurpampa	11
		Malpaso	4
		Puycate	23
Madre de Dios	Tambopata	La Joya	12
		Chonta	5
		Tres Islas	5
		Pastora	7
		La Cachuela	10
Moquegua	Mariscal Nieto	MoTorata	11
	General Sanchez Cerro	Torata Alta	32
		Colohuache y Omate	8
Piura	Morropón	Chalaco	6
		Paltashaco	2
		San Francisco	2
		Portachuelo	10
		Gramadal	13
		Hualcas	3
	Huancabamba	Canchaque: Agua Azul	2
		Canchaque: Chorro Blanco	2
		El Faique: Aguas Verdes	1
		El Faique: San Cristobal	1
		Tuluce	9
		Imbo	4
		Huaricancha	4
		Tacarpo	5
El Rosario	2		
Nuevo Progreso	3		
Jacocha	2		
Tacna	Tacna	Las Yaras, valle del río Sama	23
		Palca	23
	Tarata	Tarata	11
Tumbes	Tumbes	Pampa grande; Eden Bajo	19
		Pampa grande; Las Mercedes	7
		Pampa grande; Pampa grande	7
		Pampa grande; Progreso Bajo	7
	Zarumilla	Zarumilla	36

Cuadro 3. Población de roedores capturados por género y departamento.

Género	Arequipa	Ancash	Cajamarca	La Libertad	Lambayeque	Madre de Dios	Moquegua	Piura	Tacna	Tumbes	Total
<i>Abrothrix</i>	3										3
<i>Akodon</i>	11	1			7		1	18	3		41
<i>Bolomys</i>						7					7
<i>Calomys</i>	10										10
<i>Holochilus</i>						1					1
<i>Oligoryzomys</i>	1					18		6			25
<i>Oryzomys</i>		1	1		1	3		2			8
<i>Phyllotis</i>	52			1	13		14	4	17		101
<i>Thomasomys</i>					2			1			3
<i>Mus</i>	4	1	17	1	7		25	11	35	32	133
<i>Rattus</i>		19	29	1	20	10	11	29	2	44	165
Total	81	22	47	3	50	39	51	71	57	76	497

Los roedores del viejo mundo (géneros *Mus* y *Rattus*) están mejor distribuidos en todos los lugares de estudio y representan el 60% de roedores capturados, mientras que los roedores del nuevo mundo (géneros *Calomys*, *Abrothrix*, *Akodon*, *Bolomys*, *Holochilus*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Phyllotis* y *Thomasomys*) solo representan el 40%, a pesar de contar con amplio rango de especies.

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de los roedores, según departamentos.

Familia	Sub Familia	Género	Especie	Departamento	(n)
Muridae	Murinae	<i>Mus</i>	<i>Mus musculus</i>	Arequipa, Ancash, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Moquegua, Piura, Tacna, Tumbes	133
		<i>Rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Cajamarca, Tacna, Tumbes	14
			<i>Rattus rattus</i>	Ancash, cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Piura, Tumbes	151
Cricetidae	Sigmodontinae	<i>Akodon</i>	<i>Akodon mollis</i>	Lambayeque, Piura	25
			<i>Akodon albiventer</i>	Tacna	2
			<i>Akodon boliviensis</i>	Tacna	1
			<i>Akodon juninensis</i>	Ancash	1
			<i>Akodon subfuscus</i>	Arequipa, Moquegua	12
		<i>Phyllotis</i>	<i>Phyllotis limatus</i>	Arequipa, Moquegua, Tacna	26
			<i>Phyllotis Amicus</i>	La Libertad	1
			<i>Phyllotis Antium</i>	Lambayeque, Piura	17
			<i>Phyllotis magíster</i>	Arequipa, Moquegua, Tacna	53
			<i>Phyllotis sp.</i>	Arequipa	4
		<i>Abrothrix</i>	<i>Abrothrix andinus</i>	Arequipa	3
		<i>Bolomys</i>	<i>Bolomys lasiurus</i>	Madre de Dios	7
		<i>Calomys</i>	<i>Calomys sorellus</i>	Arequipa	10
		<i>Holochilus</i>	<i>Holochilus sciureus</i>	Madre de Dios	1
		<i>Oligoryzomys</i>	<i>Oligoryzomys andinus</i>	Arequipa	1
			<i>Oligoryzomys arenalis</i>	Piura	2
			<i>Oligoryzomys microtis</i>	Madre de Dios	14
		<i>Oligoryzomy</i>	<i>Oligoryzomys sp</i>	Madre de Dios, Piura	8
		<i>Oryzomys</i>	<i>Oryzomys nitidus</i>	Madre de Dios	2
			<i>Oryzomys perenensis</i>	Madre de Dios	1
			<i>Oryzomys xantheolus</i>	Ancash, Cajamarca, Lambayeque, Piura	5
<i>Thomasomys</i>	<i>Thomasomys taczanowskii</i>	Lambayeque, Piura	3		

4.2 Determinación de anticuerpos IgG anti-VEMC por ELISA

El ensayo inmuno enzimático o ELISA estandarizado y ensayado fue un ELISA indirecto, orientado para la detección de anticuerpos de tipo IgG. De 497 muestras de sangre de roedores analizados se obtuvieron 30 positivos, detallados en la tabla 5.

De los 30 positivos encontrados, 28 corresponden a roedores del viejo mundo; de estos, 19 pertenecen a *Ratus ratus* (en Cajamarca, Lambayeque, Madre de Dios, Tumbes y Piura), 5 a *Mus musculus* (en Moquegua y Tumbes) y 4 a *Ratus norvegicus* (en Tumbes, Cajamarca y Tacna) (tablas 5 y 6). Y los 2 positivos restantes corresponden a roedores del nuevo mundo; 1 a *Phyllotis limatus* (en Tumbes) y 1 a *Akodon molli* (en Piura), ambos pertenecientes a la familia Cricetidae (tablas 5 y 7)

Cuadro 5. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en la población de roedores por especie.

Especie	Procedencia	Positivos / (n)	% positivos
<i>Mus musculus</i>	Arequipa, Ancash, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Moquegua, Piura, Tacna, Tumbes	5/133	3.8
<i>Rattus norvegicus</i>	Cajamarca, Tacna, Tumbes	4/14	28.6
<i>Rattus rattus</i>	Ancash, Cajamarca, La Libertad, Lambayeque, Madre de Dios, Moquegua, Piura, Tumbes	19/151	12.6
<i>Akodon mollis</i>	Lambayeque, Piura	1/25	4.0
<i>Akodon albiventer</i>	Tacna	0/2	0.0
<i>Akodon boliviensis</i>	Tacna	0/1	0.0
<i>Akodon juninensis</i>	Ancash	0/1	0.0
<i>Akodon subfuscus</i>	Arequipa, Moquegua	0/12	0.0
<i>Phyllotis limatus</i>	Arequipa, Moquegua, Tacna	1/26	3.8
<i>Phyllotis amicus</i>	La Libertad	0/1	0.0
<i>Phyllotis andium</i>	Lambayeque, Piura	0/17	0.0
<i>Phyllotis magister</i>	Arequipa, Moquegua, Tacna	0/53	0.0
<i>Phyllotis sp.</i>	Arequipa	0/4	0.0
<i>Abrothrix andinus</i>	Arequipa	0/3	0.0
<i>Bolomys lasiurus</i>	Madre de Dios	0/7	0.0
<i>Calomys sorellus</i>	Arequipa	0/10	0.0
<i>Holochilus sciureus</i>	Madre de Dios	0/1	0.0
<i>Oligoryzomys andinus</i>	Arequipa	0/1	0.0
<i>Oligoryzomys arenalis</i>	Piura	0/2	0.0
<i>Oligoryzomys microtis</i>	Madre de Dios	0/14	0.0
<i>Oligoryzomys sp</i>	Madre de Dios, Piura	0/8	0.0
<i>Oryzomys nitidus</i>	Madre de Dios	0/2	0.0
<i>Oryzomys perenensis</i>	Madre de Dios	0/1	0.0
<i>Oryzomys xantheolus</i>	Ancash, Cajamarca, Lambayeque, Piura	0/5	0.0
<i>Thomasomys taczanowskii</i>	Lambayeque, Piura	0/3	0.0



Figura 3. Mapa descriptivo por departamentos de los roedores capturados durante 2004 y 2005.

Roedores en azul: Identifica la localidad de captura.

Roedores en marrón: localidad con positivos a V-EMC por EIA.

Cuadro 6. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en roedores de la subfamilia Murinidae por departamento.

Departamento	Número de Capturados	Positivos IgG (%)
Arequipa	4	0 (0.0)
Ancash	20	0 (0.0)
Cajamarca	46	12 (26.1)
La Libertad	2	0 (0.0)
Lambayeque	27	5 (18.5)
Madre de Dios	10	1 (10.0)
Moquegua	36	3(8.3)
Piura	40	1 (2.5)
Tacna	37	1 (2.7)
Tumbes	76	5(6.6)
Total	298	28 (9.4)

Cuadro 7. Presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC en roedores de la sub familia Sigmodontinae por departamento.

Departamento	Número de Capturados	Positivos IgG (%)
Arequipa	77	0 (0.0)
Ancash	2	0 (0.0)
Cajamarca	1	0 (0.0)
La Libertad	1	0 (0.0)
Lambayeque	23	0 (0.0)
Madre de Dios	29	0 (0.0)
Moquegua	15	0 (0.0)
Piura	31	1 (3.2)
Tacna	20	1 (5.0)
Tumbes	0	0 (0.0)
Total	199	2 (8.2)

4.3 Reacción en cadena de las polimerasas (PCR)

30 tejidos de pulmón y bazo de los roedores identificados con presencia de anticuerpos IgG contra V-EMC fueron analizados por la prueba de PCR resultando negativas.

V. DISCUSIÓN

Existen 165 especies de roedores reportadas en el Perú las que están incluidas en 12 familias (11 nativas y 1 introducida). Para el presente estudio se evaluó la presencia/ausencia de V-EMC en roedores capturados pertenecientes a dos familias (Muridae y Cricetidae) por su representatividad numérica.

En el Perú se han registrado 109 especies de la familia Cricetidae y solamente se lograron capturar 22 especies para el estudio. Las 3 únicas especies introducidas que corresponden a la familia Muridae registrada en el Perú son *Rattus rattus* o rata negra, *Rattus norvegicus* o rata gris y el popular *Mus musculus* o ratón (22).

En total fueron capturados 497 roedores, de los cuales 298 pertenecen a la familia Muridae, sub familia Murinidae (roedores del viejo mundo) y 199 a la familia Cricetidae, sub familia Sigmodontinae (roedores del nuevo mundo). Cabe resaltar el gran número de roedores del viejo mundo capturados y que solamente pertenecen a 3 especies, a diferencia del menor número roedores del nuevo mundo capturados a pesar de su amplia diversidad en especies; esto nos indica la gran capacidad de adaptación de los roedores del viejo mundo a los diferentes habitats.

56 localidades de 19 provincias, pertenecientes a 10 departamentos fueron muestreados, logrando capturar especies del viejo mundo en todos los departamentos y especies del nuevo mundo en 9 departamentos. Entre los géneros del nuevo mundo capturados mejor distribuidos están *Phyllotis*

con 101 representantes en 6 departamentos, seguido por *Akodon* con 41 representantes en 6 departamentos y *Oryzomys* con 8 representantes en 5 departamentos, mientras que el resto de géneros del nuevo mundo son poco frecuentes en las distintas zonas de muestreo. Entre los departamentos con mayor diversidad en géneros capturados están, Piura con 7 géneros capturados, Arequipa con 6 y Lambayeque con 6; total de géneros capturados en los 10 departamentos 11.

De igual forma los anticuerpos de tipo IgG contra V-EMC detectados por método del ensayo inmuno enzimático fueron encontrados en mayor presencia en los roedores del viejo mundo, de los 30 (6.0%) positivos encontrados 28 (5.6%) corresponden a los roedores del viejo mundo, siendo *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* con mayor número de positivos (4/14 y 19/151 respectivamente) y solo 2 (0.45%) corresponden a roedores del nuevo mundo. Estudios previos (10, 29) demuestran mayor presencia de anticuerpos en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* (roedores del viejo mundo) en distintas zonas de Centroamérica y Australia. Además debemos mencionar que experimentos previos (23) con ratas de laboratorio infectadas con V-EMC no mostraron signos clínicos, ni tuvieron efectos letales, pudiéndose aislar el virus por periodos prolongados, hasta 62 días post-inoculación que duró el experimento. Estos datos pueden respaldar la posibilidad de contar con reservorio para el virus en roedores del viejo mundo.

Desde un punto de vista geográfico los positivos encontrados están distribuidos en departamentos de costa, sierra y selva; total 7 departamentos de los 10 en estudio. Entre los departamentos Cajamarca fue el que mostró mayor porcentaje de positivos (26.1% del total de positivos), las especies positivas *Rattus rattus* (11/28) y *Rattus norvegicus* (1/1), este hallazgo puede sugerirnos un futuro estudio de búsqueda de evidencia de presencia del virus en la población humana.

Para la confirmación de presencia de virus en los roedores positivos se tomaron muestras de pulmón y bazo positivas a IgG anti V-EMC

mediante ELISA resultaron negativos por RT-PCR, debido posiblemente a varias causas, que sugerentemente podríamos plantear como hipótesis para un posterior ensayo. La evaluación de la especificidad y sensibilidad de la prueba, Presencia de posibles inhibidores en los tejidos analizados que puedan estar afectando la prueba de RT-PCR, los anticuerpos presentes en estos 30 roedores puedan corresponder a algún miembro cercano del V-EMC y los anticuerpos estén ofreciendo reacción cruzada, o en su defecto en algún momento de sus vidas tuvieron contacto con el virus EMC y adquirieron los anticuerpos tipo IgG. Entonces podríamos seguir especulando que los roedores, en especial miembros del viejo mundo son reservorio para el virus EMC, a pesar de que existan reportes y evidencia de que los roedores en contacto con el virus pueden tener final letal (10).

VI. CONCLUSIONES

1. De las 497 muestras de sangre analizadas 30 (6%) fueron IgG anti- V-EMC positivas por ELISA
2. De los 30 roedores IgG anti-VEMC positivos, 28 (93 %) pertenecen al grupo Murinae y 2 (7%) al grupo Sigmodontinae.
3. La prueba de PCR no detectó presencia del virus en los tejidos analizados.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rueckert R. Picornaviridae and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick J, Monath TP, Roizman B. (eds). Virology. Second Edition, Vol 1. Paven Press – New York, 1990. P. 507 – 548.
2. Jawest E, Melnick J, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica. Decimo cuarta Edición, , Ed El Manual Moderno. Mexico, D.F. 1996. P. 505-521
3. Murrey PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología Médica, cuarta edición, Ed Elsevier. Barcelona España. 2002. P. 503-513
4. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Index of Virus. [Base de datos en Internet]. New York: Columbia University; [actualizada en agosto 2008; acceso agosto 2009]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_picor.htm
5. Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy 2008. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/index.asp>, fecha de acceso agosto 2009.
6. Svitkin Y, Sonenberg N. Cell free Synthesis of Encephalomyocarditis Virus. J. Virol. 2003. 77(11): 6551 – 6555.
7. Murnane TG. Encephalomyocarditis. In: Steele JH, Beran GW. (eds.) CDR Handbook Series in Zoonoses, Section B: Viral Zoonoses, Vol. II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1981. P. 137-147.
8. Murname TG. Ecphelomyocarditis Virus. In: Foster HL, Small JD, Fox JG. (eds.) The Mouse in Biomedical Research Vol II Diseases. Academic Press, INC. San Diego, California, 1982. P. 353 – 357

9. Jungeblut CW and Sanders M. Studies of a murine strain of poliomyelitis virus in cotton rats and white mice. *J. Exp. Med.* 1940. 72:406-436.
10. Tesh RB, Wallance GD. Observations on the natural history of Encephalomyocarditis Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978. 27(1): 133-143.
11. Tesh RB. The Prevalence of Encephalomyocarditis Virus Neutralizing Antibodies among Various Human Populations *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978. 27(1): 144-149
12. Jonkers AH. Serosurvey of Encephalomyocarditis Virus Neutralizing Antibodies in Southern Louisiana and Peruvian Indian Populations *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1961. 10: 593-598
13. Dick GW, Best AM, Haddow AJ, Smithburn KC. Mengo Encephalomyelitis Virus. *Lancet.* 1948. 2: 286-289
14. Carleton D. Review Article Encephalomyocarditis Virus Infection In Childhood. *Pediatrics.* 1955. 16: 902- 906
15. Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, Nix WA, Ksiazek TG, Comer JA, et al. Human Febrile Illness caused by Encephalomyocarditis Virus Infection, Peru. *Emerging Infectious Disease.* 2009. Vol. 15 (4): 640 - 646
16. Burleson F, Chambers TM, Wiedbrauk D. *Virology a Laboratory Manual.* Academic Press, Inc. San Diego, California. 1992. P. 138-143.
17. Storch GA. *Essentials of Diagnostic Virology.* Ed. Churchill Livingstone. USA. 2000. P. 2-23.
18. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications.* Dynatech Laboratories, INC. 1979.
19. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ. Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. *CDC & OPS.* 1998.
20. RNeasy Mini Handbook QUIAGEN. Third Edition. 2001. P. 50 -55

21. Denis P, Liebig HD, Nowotny N, Billinis C, Papadopoulos O, O'Hara RS, et. al. Genetic variability of encephalomyocarditis virus (V-EMC) isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006: 113. 1-12
22. Pacheco V, Cadenillas R, Salas E, Tello C, Zeballos H. Diversidad y endemismo de los mamíferos del Perú. *Rev. peru biol.*, 2009. 16(1): 5-32
23. Spyrous V, Maurice H, Billinis C, Papanastassopoulou M, Psalla D, Nielen M, et. al. Transmission and Pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats. *Vet. Res.* 2004. 35: 113-122
24. Chandler LJ, Nordof NG. Identification of genetic variation among St. Louis encephalitis virus isolates, using single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Virol. Methods*. 1999. 80: 169–178.
25. Viral Zone. Picornaviridae. Disponible en: http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/99.html. Fecha de acceso agosto 2009.
26. Bahnemann HG. Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *J. Clin. Microbiol.* 1976: 209-210.
27. Larghi OP, Nebel AE. Rabies Virus Inactivation by Binary Ethylenimine: New Method for Inactivated Vaccine Production. *J. Clin. Microb.* 1976. 3(1): 26-33
28. Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol* 1975: 47-56.
29. Pope JH and Scott W. A survey for antibodies to encephalomyocarditis virus in man and animals. *Aus. J. exp. Biol.* 1960. 38: 447-450.

VII. ANEXOS

Reactivos para ELISA:

Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4 (preparación para 1 Lt)

NaCl (137 mM) ----- 8g
KCl (2.7 mM) ----- 0.2 g
NaHPO (10 mM) ----- 1.44 g
KHHPO (2 mM) ----- 0.24 g

Agua bi-destilada en cantidad suficiente para (C.S.P.) 1 Lt

Buffer de lavado (prueba de ELISA)

PBS + 0.1% Tween 20

Buffer diluyente (prueba de ELISA)

PBS 1X + 5% leche descremada + 0.1% Tween 20

Una vez hecha la mezcla llevar a pH 7.2 – 7.4 con NaOH 1N

Binary Ethyleneimine (BEI):

NAOH 0.2 N

NaOH ----- 0.8 g

H₂O dd C.S.P, -----100 ml

BEI 0.1 M

El BEI 0.1 M es preparado por la ciclización del “bromoethylamine hidrobromide” en NaOH 0.2 N a 37 °C por 1 hora.

2-Bromoethylamine hidrobromide: ----- 2.05 g

NaOH 0.2 N C.S.P.:----- 100 ml

Tiosulfato de Sodio 1 M: (Para neutralizar la acción del BEI)

Na₂S₂O₃ :----- 15.811 g

H₂O C.S.P :----- 100 ml

Reactivos para PCR:

RT-Primer 5 pmol/ul (1ml, 2B188R)

10 µl Rt-Primer 500 pmol/µl + 990 µl TE Buffer

dNTPs 10 mM (1 ml, promega # U1240)

100 µl dATP 100 mM + 100 µl dGTP 100 mM + 100 µl dTTP 100 mM + 100 µl dCTP 100 mM + 600 µl Agua libre de nucleasa

RT-Buffer (SSII) para 200 Rx (1400 ul)

800 µl 5X Buffer (Invitrogen # Y00146 o Y02321) + 400 µl DTT 0.1 M (Invitrogen #Y00147) + 200 µl dNTP 10 mM. Alicuotado en viales de 200 µl cada uno

1X PCR Buffer 12.5 ml

1.25 ml 10X PCR Buffer-15 mM MgCl₂ (Promega # MI88J) + 250 µl dNTPs 10 mM + 11 ml Agua libre de nucleasa; alicuotado en viales de 994 µl cada uno

Primer Mix 1.5 pmol/µl (1 ml 1C340F, 2B188R)

3 µl Fw-Primer 500 pmol/µl + 3 µl Rv-Primer 500 pmol/µl + 994 µl 1X PCR Buffer

Detalle de los primers usados

Nombre del primer	Región del genoma	Secuencia del primer	Localización
1C340F	2A	5' -TTCACTGGGACGGCGATGATAA -3'	2352-2374
2B188R	2A	5' -CTTTTACATTTTCCCATGCATCCGATA -3'	4150-4176