

# Determinación de enterovirus en casos con diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré mediante la utilización de la técnica de concentración ácida

Oliva Clemente M.,\* Mauricio Vázquez P.,\* Elda E. Pérez S.,\* Anastasia Magaña H.,\* Marco A. Santillán T.,\* Baltazar Briseño G.\*

Recepción versión modificada: 25 de agosto de 1999

aceptación: 22 de septiembre de 1999

## Resumen

*El propósito de este trabajo fue determinar la presencia de enterovirus en materia fecal mediante la utilización de la técnica de concentración ácida (TCA). Para esto se analizaron muestras de 58 niños menores de cinco años con diagnóstico de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), tanto por la técnica de rutina como por la técnica propuesta. Se utilizaron como testigos nueve muestras que salieron positivas con la técnica de rutina. En estas nueve muestras y en 22 más (31 casos) se aislaron e identificaron enterovirus tipo no polio mediante la TCA (53%), por lo tanto, se obtuvo 38% más de aislamientos utilizando la TCA. El aislamiento celular fue más exitoso en la línea celular RD (59%) que en la Hep-2c (41%), aunque los títulos virales que se obtuvieron fueron bajos en su mayoría (71%). La TCA mejora la detección de enterovirus, sin embargo, por ser más costosa y más laboriosa, únicamente se recomienda su uso en casos de importancia epidemiológica como: los compatibles a polio y cuyo resultado sea negativo al utilizar la técnica de rutina o en casos cuya muestra proviene de un caso de fallecimiento; siempre y cuando las muestras sean tomadas en los primeros 15 días después del inicio de la sintomatología.*

**Palabras clave:** Técnica de concentración ácida (TCA). Síndrome de Guillain-Barré, (SGB)

## Summary

*The purpose of this work was to detect enteroviruses in feces by an acid concentration technique (ACT). Fifty-eight samples from children less than 5 years age with diagnosis of Guillain-Barré syndrome (GBS) were analyzed using the routine technique and ACT. Nine positive samples with the routine technique were used as controls. Nine control samples and 22 additional (31 cases) non-polio enteroviruses were isolated and identified with the ACT (53%). Thus, 38% more isolates were obtained by ACT. Isolation was more successful in the RD cellular line (59%) than in Hep-2c (41%). In most cases most titers (71%) obtained were low. ACT improved the detection of enteroviruses but because it is very expensive and laborious, it should be used in the case of laboratories that analyze multiple samples, for special cases such as with autopsy cases and when results are compatible to poliovirus using the routine technique and only in samples obtained during the first 15 days of symptomatology.*

**Key words:** Acid concentration technique. Guillain-Barré syndrome (GBS)

\*Departamento de Virología Diagnóstica, Laboratorio de Poliovirus. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Oliva Clemente M. Carpio 470, 11340 México D.F.

## Introducción

La familia *Picornaviridae* se encuentra constituida en dos géneros: Poliovirus y Enterovirus. Los virus de ésta son agentes etiológicos de diversas enfermedades como: polineuropatías, encefalitis, infecciones del aparato respiratorio y neumonitis, entre otras, siendo las de mayor importancia las que afectan al Sistema Nervioso Central.<sup>1</sup> Los enterovirus son responsables de los padecimientos paráliticos, entre ellos las polineuropatías, que producen serios problemas patogénicos y morfológicos a los nervios periféricos, todos ellos de gran importancia para la medicina.<sup>2</sup>

El Síndrome de Guillain-Barré (SGB) es una polirradiculoneuropatía de origen desconocido aunque se cree que puede presentarse por distintas causas como: trastornos metabólicos, presencia de toxinas en los alimentos, interacción con metales pesados, problemas hereditarios, de autoinmunidad y por infección viral. Las alternativas terapéuticas que existen según el agente etiológico, hacen que el diagnóstico de enterovirus en padecimientos de origen desconocido, tenga un papel importante en la búsqueda de una solución a este problema.<sup>3-6</sup>

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de enterovirus por la técnica de concentración ácida en pacientes con polirradiculoneuritis motora inferior, de los cuales no se pudo aislar utilizando la técnica de rutina.

La posibilidad para detectar enterovirus con esta técnica aumenta, debido a la eliminación de materia orgánica, proteínas, restos celulares y sustancias tóxicas que pueden interferir en la infección del virus a las células huésped. La técnica de rutina no tiene estas ventajas.<sup>7</sup> La técnica de concentración ácida nos permite además, disociar los complejos Ag-Ac, formados entre estos virus y anticuerpos heterólogos producidos por la infección con otros Picornavirus, porque estos complejos disminuyen la infección del virus a las células evitando así el aislamiento por la técnica de rutina.<sup>7,9</sup>

## Material y método

Se analizaron muestras de heces de 58 niños menores de cinco años con diagnóstico de SGB

tanto por la técnica de rutina como por la técnica de concentración ácida. Todas las muestras provenían de niños de diferentes estados de la República mexicana, de uno y otro sexo; las muestras fueron tomadas durante los primeros 15 días después de iniciada la sintomatología, entre los meses de enero y agosto de 1997. Los 58 casos presentaron parálisis neuromuscular aguda ascendente.

## Aislamiento del virus a partir de muestras de heces

*Técnica de rutina.* Todas las muestras fecales se trabajaron bajo las mismas condiciones. Se preparó una suspensión homogénea 20% m/v (2 grs de materia fecal/10 mL de solución salina balanceada de Hanks pH 7.2), se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 5°C; el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10,000 g durante 30 minutos a 5°C. Al sobrenadante resultante se le adicionaron 0.8 mL de una mezcla de antibióticos (penicilina G 100 UI/mL) y estreptomycin 50 µg/mL y se conservó a -20°C.<sup>10,11</sup>

*Técnica de concentración ácida.* Esta técnica es una continuación de la técnica de rutina, porque después de adicionar la mezcla de antibióticos se ultracentrifugó a 100,000 g durante dos horas a 5°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 4 mL de medio esencial mínimo (MEM).<sup>7</sup>

Una fracción de 2 mL se conservó a -70°C y a los restantes 2 mL se les adicionaron 2.2 mL de solución amortiguadora de glicina-HCl pH 2.4, se ajustó el pH con HCl 0.5N a 2.4 y se incubó a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se adicionaron 8.8 mL de sacarosa a 30% (m/v) y el pH se ajustó nuevamente a 2.4. La mezcla acidificada se ultracentrifugó a 100,000 g durante dos horas a 5°C, el precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de MEM y el pH se ajustó a 7.0 con NaOH 0.5 N.<sup>7-9</sup>

## Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se inocularon 0.4 mL del clarificado fecal obtenido por la técnica de rutina y 0.4 mL de la mezcla concentrada y acidificada obtenida por la TCA en las líneas celulares RD y Hep-2c, respectivamente. Los tubos de cultivo se

ajustaron a  $200 \times 10^3$  células/mL para RD y  $180 \times 10^3$  células/mL para Hep-2c\*. Se inocularon por duplicado y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  a 5% durante siete días. Los cultivos se examinaron diariamente para observar efecto citopático (ECP), el cual se identificó con base en las características específicas que presentan las células al ser infectadas por un enterovirus: redondas, refringentes a punto de lisis y finalmente lisis celular. El ECP se calificó en cuatro niveles según el grado del daño celular ocasionado: 1 = 25% de células dañadas, 2 = 50%, 3 = 75%, 4 = 100% de células dañadas. Para favorecer el crecimiento viral se realizó un segundo pase a los siete días del primero en las mismas condiciones.<sup>7,9</sup>

### Identificación y titulación viral

La identificación viral se realizó por seroneutralización en microplacas de 96 pozos. Se utilizaron cinco muestras, un testigo positivo y un negativo por microplaca. Se prepararon las siguientes mezclas de antisueros de tipificación para poliovirus enterovirus (donados por el "Center for Disease Control and Prevention", CDC Atlanta, GA); previamente inactivados a  $56^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Las mezclas fueron preparadas de la siguiente manera: para la mezcla de polio 1+2 se mezclaron 0.5 mL de polio 1 más 0.5 mL de polio 2 y se llevaron a 5 mL con medio Leibovitz L-15. De la misma manera se realizaron las mezclas para polio 1+3 y 2+3. Para las mezclas de polio 1+2+3 se tomaron 0.5 mL de cada antisuero y se llevaron a 5 mL con medio L-15. Se distribuyeron 0.05 mL de las mezclas de antisueros en los pozos de una placa usando cuatro pozos por cada muestra a identificar; cada antisuero contenía una concentración final de 20 unidades de anticuerpos neutralizantes por cada 0.05 mL.<sup>7,9,12</sup>

Se prepararon 2 diluciones seriadas del aislado viral (de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-2}$ ) con 1.8 mL de medio de mantenimiento celular (medio Leibovitz-L15 para las células RD y MEM para las Hep-2c) y 0.2 mL de la muestra por identificar.

Se agregó 0.05 mL del aislado viral diluido a  $1 \times 10^{-1}$  a cuatro pozos de la placa y 0.05 mL del aislado viral diluido a  $1 \times 10^{-2}$ . El testigo positivo contenía 0.1 mL de la dilución  $1 \times 10^{-1}$  de una muestra conocida en poliovirus, para el testigo negativo únicamente tenía 0.1 mL de medio de mantenimiento; se incubaron durante dos horas a  $36^\circ\text{C}$ . Posteriormente se agregaron 0.1 mL de la suspensión celular apropiada a cada pozo con la misma concentración de células usada para el aislamiento; se incubaron a  $36^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  a 5% durante siete días y se observaron en microscopio invertido al quinto y séptimo día. La ausencia de efecto citopático indica que la mezcla de antisuero ha neutralizado al virus.<sup>7,9</sup>

El antisuero común a las mezclas que causan neutralización indica el tipo de poliovirus. En los casos de presencia de efecto citopático en cada una de las mezclas de antisueros indica la presencia de un enterovirus tipo no polio.<sup>9</sup>

La retrotitulación viral se realizó en microplacas de 96 pozos. Se hicieron cuatro diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-4}$ ). Se agregaron 0.1 mL de cada una de las diluciones del aislado viral, ocupando cuatro pozos por muestra, se incubaron dos horas a  $36^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$ , 5%. Posteriormente se agregaron 0.1 mL de la suspensión celular correspondiente que contenía la misma concentración usada para el aislamiento; se incubaron a  $36^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{CO}_2$  5% durante siete días y se realizaron observaciones en microscopio invertido al quinto y séptimo día. La retrotitulación del virus debe confirmar que en la prueba se empleó aproximadamente una cantidad de 100 dosis infectivas para cultivo de tejidos "DICT<sub>50</sub>", (de 32 a 320 DICT<sub>50</sub> se considera una escala aceptable de la cantidad de virus) es decir, el título viral se consideró como el recíproco de la última dilución que presenta ECP.<sup>9,12</sup>

### Resultados

Con la técnica de rutina obtuvimos nueve aislamientos virales de las 58 muestras de materia fecal estudiadas (15%), mientras que con la técnica de

\**(La diferencia de concentración celular se debe a que las células RD crecen más rápido que las células Hep-2c).*

\**El título de los virus aislados fue calculado según la fórmula de Kaber ( $\log \text{TCD}_{50} = L - d(S - 0.5)$ ).*

concentración ácida se obtuvieron 31 aislamientos, lo que corresponde a 38% más de aislamientos (Cuadro I). El número de aislamientos obtenidos en primer pase por la técnica de rutina fueron 8 (88.88%) y en segundo pase solamente se aisló uno (11.22%); mientras que al utilizar la técnica de concentración ácida se obtuvieron 20 aislamientos en el primer pase (64.5%), nueve muestras se aislaron en el segundo pase (29.3%) y dos muestras más en el quinto pase (6.2%) (Cuadro II). Utilizando la técnica de rutina se obtuvieron seis aislamientos (66.66%) en la línea celular RD y tres (33.33%) en Hep-2c. Utilizando la TCA se obtuvieron en las células RD y en Hep-2c un aumento de tres y cuatro veces mas aislamientos respectivamente (Cuadro III). El aislado viral obtenido mediante la técnica de rutina presentó títulos altos en ocho muestras (32-320 DICT<sub>50</sub>) y títulos bajos en una sola (menores de 32 DICT<sub>50</sub>). Utilizando la TCA, 12 muestras presentaron ECP en las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> (38.7%) cayendo dentro del rango de títulos bajos y las restantes 19 (61.3%) presentaron ECP en la dilución 10<sup>-1</sup>, lo que significa que presentaron títulos iguales o mayores a 32-320 DICT<sub>50</sub>. La sensibilidad de la técnica es de 99.99%.

**Cuadro I**

	Técnica de concentración ácida		Técnica de rutina	
	Núm.	%	Núm.	%
Muestras analizadas	58		58	
Positivos	31	53.44	91	15.51
Negativos	27	46.56	49	84.49

**Cuadro II**

Pases	Técnica de concentración ácida		Técnica de rutina	
	Núm.	%	Núm.	%
Primer	20	64.5	8	88.88
Segundo	9	29.3	1	11.22
Quinto	2	6.2	0	0

**Cuadro III**

	Técnica de concentración ácida		Técnica de rutina	
	Núm.	%	Núm.	%
RD	18	58.6	6	66.66
Hep-2C	13	41.4	3	33.33

## Discusión

Con la utilización de la TCA se aislaron enterovirus de los nueve casos que resultaron positivos mediante la técnica de rutina, además de 22 muestras más, dando un total de 31 aislamientos de las 58 muestras estudiadas, es decir, 53% del total de los casos, que corresponde a 38% más de aislamientos por la TCA, lo cual resalta su eficacia debido a su mayor sensibilidad para la detección de enterovirus. Sin embargo la TCA es una técnica más costosa y laboriosa por lo que se recomienda para la determinación de enterovirus en casos particulares como casos de defunción o casos de importancia para la vigilancia epidemiológica como casos asociados al enterovirus 71. Las muestras siempre deben ser tomadas durante los primeros 15 días de iniciada la sintomatología.<sup>11,12</sup>

Los casos negativos resultantes por ambas técnicas, indican que el trastorno neuromotor en el paciente no es debido a infección viral, por lo que se deberán evaluar otras causas como: una auténtica enfermedad autoinmune, posible traumatismo cerebral, intoxicación, etc. Sin embargo es importante considerar que el envío y almacenamiento adecuado de muestras son aspectos críticos para lograr el aislamiento viral. Con el fin de tener un diagnóstico exitoso es imprescindible considerar: la recolección de la muestra dentro de los primeros 15 días de iniciada la parálisis, controlar al máximo la red de frío desde el lugar de toma de muestra hasta el laboratorio de referencia y mantener al mínimo el número de ciclos de congelación descongelación durante la realización de la técnica para evitar que el virus se pierda.<sup>9</sup>

La mayoría de los aislamientos se obtuvo en el segundo pase, lo que el éxito del aislamiento depende de la cantidad de virus presente en la

muestra sin dejar a un lado el cuidado de las condiciones para mantener al virus viable. Se observó una mayor susceptibilidad para el crecimiento de los enterovirus en la línea RD, debido a que se obtienen más aislamientos en ésta, por lo que resulta más recomendable su uso que la línea Hep-2c. En vista de que la mayoría de los aislamientos presentó títulos bajos, se recomienda realizar pases subsecuentes para elevar el título viral y asegurar la presencia de ECP en las diluciones más bajas al momento de la retrotitulación. La baja concentración viral se demostró porque 61% de los aislamientos presenta ECP en la primera y segunda dilución ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ).

La sensibilidad obtenida en la técnica propuesta nos indica que es una prueba confiable en la detección de enterovirus, por lo tanto se recomienda ampliamente su uso para la cual fue propuesta.<sup>7</sup>

### Agradecimientos

A la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por la aportación de los reactivos necesarios para la realización de este trabajo; a la doctora Ana Flisser por su apoyo en la elaboración del manuscrito.

### Referencias

1. **Burdon LK, Williams PR.** Microbiología, México: Publicaciones Cultural; 1991
2. **Davis DE.** Microbiology. USA: Hoeber Medical Division; 1993.
3. **Stanley LR.** Pathologic basis of diseases. USA: Neisa; 1984.
4. **Fenner F, White DO.** Virología médica. México: La Prensa Médica Mexicana; 1984.
5. **Hartung HP, Pollard JD, Harvey GK.** Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve* 1995;10:137-164.
6. **McKhann GM.** Guillain-Barré syndrome: clinical and therapeutic observations. *Ann Neurol* 1990;27(Suppl): 513-516.
7. **Mowbray FJ, Yousef EG.** Chronic enterovirus infection in patients with postviral fatigue syndrome. *Lancet* 1988;23:146-150.
8. **Bird RB, Forrester TF.** Basic laboratory techniques in cell culture. Department of Health and Human Services. USA: Centers for Disease Control; 1981.
9. Manual for the virology investigation of polio. Global programme for vaccines and immunization expanded programme on immunization. Geneva; World Health Organization: 1996.
10. **Hull HF, et al.** Paralytic poliomyelitis: seasoned strategies, disappearing disease; *Lancet* 1994;343, May 28.
11. Revised plan of action for global eradication of poliomyelitis (document WHO/EPI/polilo/1996).
12. **Brian WJ, Mahy HO Kangro.** Virology methods manual. Great Britain: Academic Press, Limited, Inc; 1996.

