

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de un brote de meningoencefalitis viral. Comparación de 2 sistemas biológicos empleados para el aislamiento

Lic. Ivette Maiela Abreu Nicot,¹ Lic. Marité Bello Corredor,² Dr. Pedro Más Lago,³ Dr. Ernesto Arteaga Hernández,⁴ Dra. Ivonne Ávalos Redón,⁵ Lic. Luis Raymond Sarmiento Pérez,¹ Téc. Rosa Palomera Puente⁶ y Lic. Lissette Pérez Santos¹

RESUMEN

Entre los meses de octubre y diciembre de 1995 se reportó un incremento en los casos de meningoencefalitis viral en nuestro país. Se recibieron 23 muestras de heces fecales, que procedían de 2 provincias, con la finalidad de obtener el aislamiento viral mediante la inoculación de éstas en cultivo de células y ratones recién nacidos simultáneamente, para comparar la sensibilidad de ambos sistemas en el aislamiento. Se obtuvo un mayor número de aislamientos en cultivo de células que en ratones, el cultivo de células de riñón de mono verde africano adulto normal (Vero) resultó el más sensible. Se lograron 18 aislamientos, que fueron identificados como Cocksackievirus B5. Se realizó un estudio anatómo-patológico en ratones inoculados y se observaron lesiones compatibles con la infección enteroviral.

Descriptores DeCS: MENINGOENCEFALITIS/epidemiología; MENINGOENCEFALITIS/virología; BROTES DE ENFERMEDADES; ENTEROVIRUS/aislamiento & purificación; CULTIVO DE CELULA; CELULAS VERO; CUBA.

Las infecciones virales agudas del sistema nervioso central (SNC) han sido divididas de forma tradicional en 2 síndromes: meningitis y encefalitis, según se desarrolle el proceso infeccioso en las leptomeninges o en el parénquima cerebral, respectivamente. Es usual que la encefalitis viral se acompañe de una reacción meníngea, por lo que es común el empleo del término meningoencefalitis. La meningoencefalitis viral (MEV) a predominio meníngeo es un síndrome pluricausal, y los Enterovirus, sobre todo los virus Cocksackie y echo, son los res-

ponsables de la mayor cantidad de casos reportados. A pesar de que casi todos los casos cursan de una forma benigna, la MEV constituye un problema de salud importante por su alta morbilidad y por la magnitud que alcanza en períodos epidémicos; se presenta en Cuba y en otras partes del mundo de manera cíclica cada cierto número de años.¹ El diagnóstico virológico de la MEV incluye: a) el aislamiento viral, b) el serodiagnóstico y c) los datos epidemiológicos que permitan establecer una relación de causa-efecto entre la infección vírica encon-

¹ Licenciado en Microbiología.

² Master en Virología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

³ Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular.

⁴ Especialista de I Grado en Anatomía Patológica.

⁵ Especialista de I Grado en Microbiología.

⁶ Técnica Sanitaria A.

trada y el síndrome infeccioso observado. Para el aislamiento del agente se utilizan sistemas biológicos como el cultivo celular (método de elección) y los animales de laboratorio (en su mayoría ratones, conejos y monos), estos últimos son más usados con fines investigativos, cuando el aislamiento en cultivo es difícil, o para diferenciar patogenicidad entre grupos virales, como entre los Coxsackievirus A y B.² En octubre de 1995 comenzó en Cuba un incremento vertical y acelerado en la notificación de casos de MEV con respecto a similar período de 1994.³ En este trabajo nos propusimos esclarecer la causa del brote, mediante el aislamiento e identificación en 2 sistemas biológicos y realizar un estudio anatómo-patológico a partir de los ratones inoculados.

MÉTODOS

Muestras. Se trabajaron 23 muestras de heces fecales (Hf) de niños con diagnóstico de MEV, procedentes de los hospitales pediátricos de Ciudad de La Habana y Santiago de Cuba, recibidas en el Laboratorio de Enterovirus del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) en los meses de octubre a diciembre de 1995.

Tratamiento de las muestras. Las muestras de Hf se prepararon en suspensión al 10 % en solución salina tamponada con fosfatos (PBS). La mezcla se homogenizó y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se trató con cloroformo en una proporción 9:1. Luego de la centrifugación (13 000 rpm, 5 min), se le añadió antibióticos (sulfato de estreptomycin y penicilina en concentración final de 1 000 mg/mL y 1 000 U, respectivamente, y quedó listo para la inoculación.

Inoculación en cultivos. Las muestras tratadas se inocularon por duplicado en tubos de cristal con una monocapa confluyente de 72 h de sembrada de células renales de mono verde africano, *Cercopithecus aetiops* adulto normal (Vero),⁴ en el rango de pases 25 al 30 y cultivo celular diploide de fibroblastos de pulmón embrionario humano (PHuE-1),⁵ de 72 h de sembrado (subcultivo 20-30), a razón de 200 µL de muestra por tubo. Los tubos inoculados se incubaron a 37°C por 7 d y fueron congelados a -70°C. Luego de 2 pases a ciegas, en aquellos casos donde fue observado efecto citopático

(ECP) total característico de Enterovirus, se procedió a la identificación viral de los casos positivos.

Inoculación en animales de laboratorio. Simultáneo a la siembra en cultivo, las Hf tratadas se inocularon en familias de ratones OF-1 heterocigóticos lactantes de 1 d de nacidos (4 animales por muestra). Cada muestra se inoculó por vía intracerebral (25 µL) e intraperitoneal (30 µL) y los animales se observaron durante 14 d, en busca de signos de infección enteroviral. Los enfermos y fallecidos se congelaron a -70°C, a las 24 h los que habían muerto por inoculación inadecuada se desecharon. Luego se procedió a realizar un pase en el mismo sistema biológico, así como en cultivo de células (se utilizó un macerado de músculo y de cerebro) para la posterior identificación.

Identificación viral. Determinadas previamente las 100 TCD₅₀ (dosis letal para cultivo de tejidos) de los virus aislados, los casos positivos de infección enteroviral en ambos sistemas fueron identificados por la prueba de neutralización del ECP (micrométodo) a partir del cultivo celular, se usaron *pools* de sueros hiperinmunes a Enterovirus que identifican de forma directa 42 serotipos distintos, según el esquema de Lim-Benyesh-Melnick.⁶

Estudios de anatomía patológica. Se realizaron siguiendo el protocolo para estudios de histopatología de infecciones enterovirales en ratones recién nacidos.⁷

RESULTADOS

A partir de las 23 muestras analizadas de Hf de niños con diagnóstico de MEV, se obtuvieron 18 aislamientos con ECP típico de Enterovirus (alcalinización del medio, redondeamiento, aumento de la refringencia y desprendimiento celular), 17 en células Vero (73,91 %) y 1 en PHuE-1 (4,35 %).

En 13 de los 23 casos (56,52 %) la inoculación en ratones lactantes evidenció signos positivos, que fueron: parálisis espástica con espasmos del músculo esquelético de las extremidades posteriores, temblores, incoordinación motora, anormalidades posturales, dificultad al voltearse e incorporarse, retardo en el crecimiento y pérdida de peso. Al inocular el macerado de músculo y cerebro de ratón en células Vero se observó la aparición del ECP característico de Enterovirus.

Todos los aislamientos obtenidos en cultivo celular y 6 de los obtenidos en ratón (que fueron inoculados en células Vero) se identificaron por la prueba de neutralización como Coxsackievirus B5.

En la tabla 1 se comparan los 2 sistemas biológicos utilizados, se destaca que en este caso el cultivo celular fue más sensible que los ratones lactantes (66 %) para el aislamiento. Entre ambos la especificidad fue de 80 % y la coincidencia de 70 %.

TABLA 1. Comparación de los resultados obtenidos en los 2 sistemas biológicos utilizados

Sistema biológico	Cultivo celular positivo	Cultivo celular negativo	Total
Ratón lactante positivo	12	1	13
Ratón lactante negativo	6	4	10
Total	18	5	23

Fuente: Laboratorio de Enterovirus, IPK, 1996.

Los resultados del estudio anatómo-patológico se muestran en la tabla 2, en la que se evidencia que las mayores alteraciones fueron encontradas al nivel muscular. En todos los ratones se observó miositis, que consistió en infiltrados linfocíticos de localización predominantemente perivascular, con engrosamiento hiperplásico de la pared de los vasos y cambios degenerativos de la fibra muscular (pérdida de miofibrillas, hialinización y degeneración acidófila) (fig.). Se encontró afectación en todos los grupos musculares estudiados (músculos faciales, intercostales, paravertebrales y pélvicos) no detectada en los ratones control. En la médula espinal se localizaron neuronas con degeneración discreta, y fue notable la presencia de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos como manifestación de inflamación local. En los ganglios del sistema nervioso autónomo (SNA) se apreciaron cuerpos de inclusión y fragmentación nuclear. Sólo 1 animal mostró cambios inflamatorios inespecíficos en la grasa parda. El tejido pulmonar de 1 ratón presentó neumonitis exudativa alveolar como resultado de los trastornos ventilatorios ocasionados por la miositis intercostal. En el intestino delgado de 1 caso se observó degeneración vacuolar de la superficie de las vellosidades intestinales (tumefacción turbia).

TABLA 2. Hallazgos histopatológicos en ratones lactantes inoculados con muestras de Hf de casos de MEV

Órgano	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Músculo	Miositis	Miositis	Miositis
SNC	-	Mielitis	-
SNA	Ganglionitis	Ganglionitis	-
Grasa parda	-	-	Paniculitis inespecífica
Intestino delgado	Degeneración vacuolar	-	-

Fuente: Laboratorio de Enterovirus, IPK, 1996.

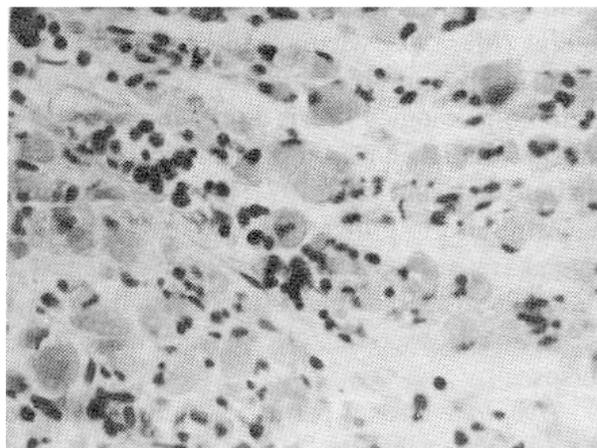


Fig. Corte histológico de músculo estriado de localización pélvica que muestra cambios degenerativos de fibras con infiltrados linfocíticos intersticiales. H&E. Microscopia óptica x 400.

DISCUSIÓN

En el período comprendido entre 1972 y 1985 se reportaron en Cuba 3 epidemias de MEV originadas por Enterovirus, de las cuales 1 fue producida por Coxsackievirus B5 en el año 1976.¹ Desde entonces, hasta 1995, no se había detectado circulación de este serotipo en el país, y se produjo una acumulación de población susceptible, que pensamos sea la posible causa del brote de MEV estudiado, lo que demuestra la circulación característica en "oleadas" de los Enterovirus.^{8,9}

Para el aislamiento de este agente las células Vero mostraron mayor susceptibilidad que los PHvE-1, aunque se han reportado también otros cultivos celulares más sensibles, sobre todo cuando el mayor porcentaje de aislamientos corresponde a virus echo,^{1,10,11} y en este caso hay que destacar que se estudió un brote epidémico con etiología única de Coxsackievirus B5.

Las células Vero fueron también más sensibles que los ratones lactantes como sistema de aislamiento para la cepa de Cocksackievirus B5 analizada, lo que puede deberse a las características de esta cepa en particular, a que el volumen real del inóculo fue mayor en el cultivo celular que en los ratones lactantes si se supone que ambos sistemas tuvieran igual sensibilidad, o a que en los animales se necesita una mayor cantidad de virus viables para lograr el aislamiento. Existen trabajos que también demuestran estos resultados para otros virus estudiados, como los realizados por Mesa en 1971 y por otros autores (Mesa CS. Meningoencefalitis viral. Estudio clínico, epidemiológico, de laboratorio y anatómo-patológico [Tesis de Grado para optar por la Especialidad en Neurología Clínica] La Habana: Instituto de Neurología, 1971:116)¹² pero en ocasiones es necesario utilizar la combinación de ambos sistemas ya que existen cepas que no crecen en cultivo o que su adaptación a éstos es difícil, por lo que necesitan pases seriados que consumen tiempo y recursos.

Hyppia y otros a partir de estudios realizados con ratones lactantes (inoculados con Cocksackievirus B1, B2, B3, B4 y B5) han planteado que los animales infectados por Cocksackievirus B5 pueden mostrar daños mínimos e incluso no detectables histopa-tológicamente.¹³

De manera general, las lesiones histopatológicas encontradas en la musculatura y en los diferentes órganos (hígado, pulmón e intestino) de los ratones infectados son compatibles con la infección por Enterovirus.⁷ Sin embargo, en el SNC no se observaron cambios (encefalitis, meningitis, pérdida de mielina y cuerpos de inclusión) ni en la grasa parda (necrosis, calcificación e hiperplasia).

Teniendo en cuenta las alteraciones detectadas podemos concluir que nuestros hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura internacional.

SUMMARY

An increase of the cases of viral meningoencephalitis was reported in our country from October to December, 1995. 23 faeces specimens

were received from 2 provinces aimed at obtaining the viral isolation by their inoculation in cell culture and in newborn mice at the same time in order to compare the sensitivity of both systems in isolation. A higher number of isolations was obtained in cell culture. The cell culture from kidney of a normal adult green African monkey (Vero) proved to be more sensitive. 18 isolations were obtained and identified as Cocksackievirus B5. An anatomical and pathological study was conducted in inoculated mice and injuries compatible with the enteroviral infection were observed.

Subject headings: MENINGOENCEPHALITIS/epidemiology; MENINGOENCEPHALITIS/virology; DISEASE OUTBREAKS; ENTEROVIRUS/isolation & purification; CELL CULTURE; VERO CELLS; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Más P, Comellas M, Marrero M, Jacobo M, Palomera R. Meningoencefalitis por Enterovirus. Estudio de 14 años. Rev Cubana Pediatr 1992;64(1):16-21.
- Phillips CA. Enterovirus y reovirus En: Lennette HE. Manual de microbiología clínica. 3 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica. 1982:986-93. (Edición Revolucionaria).
- Bello M, Ávalos I, Sarmientos L, Palomera R, Más P. Meningoencefalitis viral por Cocksackie B5. Bol Epid IPK 1995;5(49):392.
- American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. 7 ed Rockville: American Type Culture Collection, 1992:48.
- Castillo A, Morier L. Obtención de una línea celular diploide de pulmón humano (PHvE). Rev Cubana Med Trop 1992; 44(3):224-5.
- Melnick JL, Winberly IL. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM prepared from reserves of antisera stored frozen for 2 decades. Bull World Health Organ 1985;63:543-50.
- Roberts GB, Boyd JF. The histopathology of enterovirus infections of newborn mice. J Infect 1987;(15):45-56.
- Melnick JL. Enterovirus: poliovirus, coxsackievirus, echovirus and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM. Virology. 2 ed. New York: Raven, 1990:549-609.
- Grist NR, Red D. General pathogenecity and epidemiology of Cocksackievirus En: Cocksackieviruses, a general update. New York Plenum, 1988:221-39.
- Bello M, Más P, Palomera R, Castillo A, Nevis A, Acosta B, et al. Meningoencefalitis por Enterovirus en los últimos 5 años. Rev Cubana Med Trop 1996;48(2):118-22.
- Cobos PV, Gutiérrez PM, Yáñez JL, Palacios JR, Macarron VJ, Montero AM, et al. Estudio epidemiológico de un brote de meningitis por Echovirus tipo 9. Rev San Hig Pub 1994;68:607-15.
- Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts GB, Boyd JF, Dovan T, et al. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. J Infect Dis 1993;16(4):888-92.
- Hyppia T, Kallajoki M, Maaronen M, Stanway G, Kandolf R, Auvinen P. Pathogenetic differences between Cocksackie A and B virus infections in newborn mice. Virus Res 1993;27:71-8.

Recibido: 12 de marzo de 1997. Aprobado: 14 de abril de 1997.
Lic. *Ivette Mariela Abreu Nicot*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de la Habana, Cuba.