

IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO DE LOS ECHOVIRUS DESDE EL PUNTO DE VISTA EPIDEMIOLÓGICO. CIRCULACIÓN DE ECHOVIRUS 11 EN LOS ÚLTIMOS AÑOS EN ESPAÑA

Gloria Trallero y Ana Avellón

Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda (Madrid)

Los echovirus (serotipos: 1-7, 9, 11-27 y 29-33) junto a los poliovirus (serotipos: 1-3), los coxsackievirus grupo A (serotipos: 1-22, 24), los coxsackievirus grupo B (serotipos: 1-6) y los nuevos enterovirus (serotipos: 68-71) constituyen el género de los Enterovirus humanos. El hombre es el único reservorio conocido y la transmisión es, fundamentalmente por vía fecal-oral. Se dan casos de transmisión por fómites, aunque la más frecuente es la vía directa, de persona a persona, existiendo gran número de portadores sanos. Los virus se eliminan por las heces y se pueden detectar en aguas residuales. La circulación de enterovirus puede presentarse de forma endémica o en brotes epidémicos, siendo más frecuente en verano y otoño, en niveles socioeconómicos bajos y en niños. Las infecciones producidas por enterovirus pueden producir cuadros asintomáticos o dar lugar a cuadros febriles, exantemas, enfermedad respiratoria del tracto superior, miocarditis, enfermedad de Bornholm, poliomielitis, encefalomielitis, ataxia, mielitis transversa e incluso se les ha relacionado con el desarrollo de diabetes mellitus.

Sin embargo el cuadro al que más frecuentemente se asocian es a la meningitis aséptica. La gravedad del cuadro clínico depende de varios factores, como son la edad (pudiendo originar enfermedad generalizada en neonatos), estado inmunitario del huésped y la virulencia del virus circulante. Aunque determinados serotipos se asocian con frecuencia a brotes epidémicos, dando lugar a un síndrome específico, los mismos serotipos pueden ser responsables de infecciones esporádicas. De todas las meningitis asépticas en las cuales se puede determinar el agente etiológico sobre todo en niños y jóvenes, los enterovirus están asociados al menos en el 85%, siendo los echovirus los más frecuentemente encontrados en esta patología.

Los echovirus del serotipo 11 (E11), como la muestra remitida en este control, se han asociado con cuadros febriles inespecíficos, enfermedades respiratorias, gastrointestinales, manifestaciones exantemáticas e infecciones neurológicas, sobre todo meningitis aséptica y encefalitis, y en los neonatos, con la muerte súbita y sepsis.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROVIRUS

La técnica de referencia para el diagnóstico específico de las infecciones por enterovirus es el cultivo en líneas celulares susceptibles. Ante una sospecha de infección enteroviral, siempre que se pueda, se deben tomar muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), exudado faríngeo y heces de cada paciente, ya que ello aumenta el porcentaje de aislamientos. Las muestras se deben transportar hasta el laboratorio refrigeradas (4°C) y es recomendable que sean almacenadas a temperaturas inferiores a -20 °C si no se procede a la inoculación inmediata de los cultivos.

Para poder recuperar el máximo de tipos posibles de enterovirus, se deben inocular las muestras clínicas en distintas líneas celulares, y así aumentar la rentabilidad del cultivo. Sin embargo algunos serotipos (especialmente algunos virus coxsackie grupo A) no pueden ser recuperados en líneas celulares, con lo que sería necesaria, en caso de sospecha, la inoculación de las muestras en ratones recién nacidos. Los cultivos celulares más sensibles

son la línea RD (rabdiosarcoma humano) y los fibroblastos humanos, como las líneas WI-38 (pulmón embrionario humano) y HEK (riñón embrionario humano). Siempre que se pueda, se deben incorporar las líneas de BGM o Vero (riñón de mono) y la línea A-549 (carcinoma de pulmón humano); esta última está indicada para aislar los coxsackievirus grupo B.

Tras la incubación a 37 °C, la presencia del virus se manifiesta por la aparición de un efecto citopático típico y rápido (24-48 h), caracterizado por la picnosis nuclear, redondeamiento citoplasmático, aparición de células refractarias, degeneración celular y desprendimiento de la monocapa celular. No deben considerarse únicamente estas características citopáticas como la base para la identificación, ya que puede confundirse con efectos tóxicos sobre el cultivo. Algunas veces, el efecto citopático no es claramente visible en ciertos tipos, pero la realización de una tinción inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales específicos (IF) permite su identificación, de ahí que sea recomendable hacerlo antes de descartar un cultivo como negativo.

Las heces son las muestras en las que se aíslan mayor número de enterovirus; sin embargo, el aislamiento únicamente a partir de heces no lo identifica necesariamente como el agente etiológico de la infección, pues estos virus pueden excretarse de forma asintomática durante bastante tiempo. Los enterovirus aislados en heces deberían, no obstante, ser identificados por la técnica de IF para descartar la excreción de un poliovirus, como parte de las actividades del Plan de Erradicación de la Poliomieltis, para vigilar la posible importación de poliovirus salvajes desde áreas endémicas.

El aislamiento a partir del LCR o del exudado faríngeo es posible durante la fase aguda de la infección, especialmente en los casos con síntomas neurológicos o respiratorios. El periodo con el índice de aislamientos más alto se establece en los cinco días previos a la aparición de los síntomas, y continúa hasta cinco días después. En este tipo de muestras es importante la identificación del serotipo aislado ya que, en estos casos, sí podemos asociarlo al cuadro clínico y, si se trata de un brote de meningitis, podremos establecer el serotipo implicado. La identificación del serotipo no tiene una utilidad clínica inmediata, sin embargo la caracterización de los enterovirus implicados en los brotes supone una información muy valiosa desde el punto de vista epidemiológico. Inicialmente, debiera diferenciarse un enterovirus del tipo polio o no-polio mediante IF. Estas técnicas, que detectan antígenos víricos, son las más utilizadas por su rapidez y sencillez. Actualmente, existen disponibles antisueros contra el antígeno común de los enterovirus (Dako®), que sirven de cribado inicial. Si es positivo, se realiza una segunda técnica de IF con antisueros para poliovirus 1, 2 y 3, y frente a echovirus, coxsackievirus A y B, y enterovirus 68-71 si el laboratorio dispone de estos antisueros. Esta técnica es muy fácil de incorporar en los laboratorios de aislamiento de virus. Posteriormente, si el aislamiento se confirma como un poliovirus, debe enviarse inmediatamente al *Laboratorio de Referencia* para su caracterización intratípica. Si se trata de un enterovirus-no polio y se ha aislado de LCR o exudado faríngeo, conviene también tipificarlo. Si el aislamiento se ha obtenido de una muestra de heces, procederá su tipado en determinadas ocasiones (dependiendo de cuadro clínico, por ejemplo).

LABORATORIO DE REFERENCIA DE ENTEROVIRUS

El *Laboratorio de Referencia de Enterovirus* (Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III) caracteriza los virus obtenidos de muestras clínicas por otros laboratorios de virología españoles. Los enterovirus recibidos proceden en su mayor parte de pacientes con meningitis aséptica. Por otro lado, es el laboratorio certificado por la Organización Mundial de la Salud como Laboratorio Nacional de Poliovirus en España, y es el coordinador de la Red de Laboratorios Españoles del Programa de Erradicación de la

Poliomielitis. La identificación de los distintos serotipos se realiza mediante técnicas de inmunofluorescencia, microneutralización y tipificación molecular.

Para la mayoría de los enterovirus, la identificación específica se realiza mediante la neutralización, que consiste en contrarrestar el efecto citopático sobre el cultivo mediante la utilización de un antisuero específico que impide la unión del virus a su receptor celular. La técnica se ha simplificado bastante con el desarrollo de mezclas estandarizadas de antisueros específicos de tipo, como la propuesta por Lim y Benyesh-Melnick (LBM), de manera que un antisuero concreto aparece en 1, 2 ó 3 mezclas. De esta forma, el enterovirus puede ser identificado por su patrón de neutralización, por la mezcla o mezclas que contienen su antisuero homotípico. Las primeras mezclas disponibles fueron A-H, que identificaron 42 enterovirus y la mezcla J-P que identificaba 19 Coxsackievirus A. En los últimos años se han incorporado otros antisueros suministrados por el Instituto Nacional de Salud Pública y Medioambiental de Holanda (RIVM). La mayoría de los problemas de neutralización con células en medio líquido se resuelven con las técnicas de microneutralización, que se realizan en placa, y que permiten detectar anticuerpos incluso en presencia de fracción no neutralizable, ya que es más sensible que la prueba de neutralización en tubos.

En ocasiones, es necesaria una tipificación molecular de la cepa. Para ello, en nuestro laboratorio, se emplea un fragmento de, aproximadamente, 400 nucleótidos del gen que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside (VP1). El fragmento se amplifica en cada cepa mediante retrotranscripción, seguida de una amplificación anidada (Casas *et al* 2001) y posteriormente se secuencian. El serotipo se obtiene tras la comparación de esta secuencia con las de cada una de las cepas prototipo de los enterovirus. El sistema fue incorporado de forma habitual en el laboratorio en enero del 2002 y, desde entonces, ha contribuido a la identificación de numerosos enterovirus que, por diferentes circunstancias, no podían neutralizarse correctamente. Además permite la identificación de cepas no cultivables, puesto que puede ser aplicada también directamente sobre la muestra clínica.

Para el estudio de brotes el laboratorio dispone de herramientas para el análisis filogenético, empleando el análisis del gen VP1. Se han realizado estudios moleculares de brotes de E30 (Palacios *et al* 2002), E9 y E13 (Avellón *et al* 2003). Este último virus fue estudiado debido a su excepcional comportamiento epidemiológico, pues dio lugar repentinamente a numerosos brotes de meningitis aséptica en todo el mundo. Se secuenció el gen VP1 completo de más de 60 cepas obtenidas en España. Del análisis molecular del brote se dedujo que el virus mostraba un salto genético y antigénico respecto a la cepa de referencia de E13, que podría haber condicionado la producción de los numerosos brotes de meningitis. Las cepas españolas se dividían en dos grupos filogenéticos, de acuerdo con su localización geográfica: las procedentes de las islas Canarias y las de la península Ibérica. Por otra parte, fue posible relacionar, desde el punto de vista molecular, las cepas de las Canarias con los que produjeron brotes en otros países europeos, como Alemania.

Actualmente, el laboratorio está analizando las cepas de E11 obtenidas en el 2003 que ascienden a un total de 65. Los resultados preliminares de dicho estudio se muestran en otro apartado, más adelante. Si el lector desea enviar al Laboratorio de Referencia de Enterovirus alguna cepa para su tipificación puede contactar con la Dra. Gloria Trallero y solicitar la ficha para la referencia de cepas de enterovirus. [Teléfono: 915097901, extensiones 3619 y 3663; dirección electrónica: gtralle@isciii.es].

CIRCULACIÓN DE ENTEROVIRUS EN ESPAÑA (1988-2003)

Los datos de las cepas tipificadas en el Centro Nacional de Microbiología (figura 1) no se corresponden necesariamente con los datos reales de circulación de enterovirus en España. Sin embargo, podemos concluir algunos aspectos de dicho comportamiento, teniendo en cuenta que habitualmente se identifican las que producen patología más grave.

Los más frecuentemente caracterizados en el Laboratorio de Referencia de Enterovirus (años 1988-2003) fueron los echovirus E30, E6, E9, E13, E11, E7, E4 y el coxackie B5. El patrón de éstos sugiere una periodicidad trianual en los brotes, con aislamientos esporádicos en los años intermedios para la mayoría de ellos. Además, parece existir un desplazamiento cada año de unos serotipos por otros. Por ejemplo, tras un pico de E30 en 1996 sobrevino al año siguiente una disminución de aislamientos de E30 y un predominio en 1997 de E6. Un comportamiento similar se observó posteriormente en los años 2000 y 2001.

Por el contrario otros enterovirus tienen un comportamiento más explosivo, produciendo grandes brotes repentinos. Éste es el caso del E4, que produjo brotes de meningitis aséptica en España en 1991. Desde entonces, hasta el 2002, no se identificó ningún otro E4 en el laboratorio. Aún más curioso es el comportamiento del E13. Tras una vigilancia de 12 años sin identificar un solo virus de este serotipo, en el 2000 se convierte en el más frecuentemente caracterizado en España. En los años posteriores, el E13 deja completamente de ser detectado, volviendo al comportamiento previo al año 2000. Paralelamente, otros países comunican brotes de meningitis por E13 en los años 2000 y 2001.

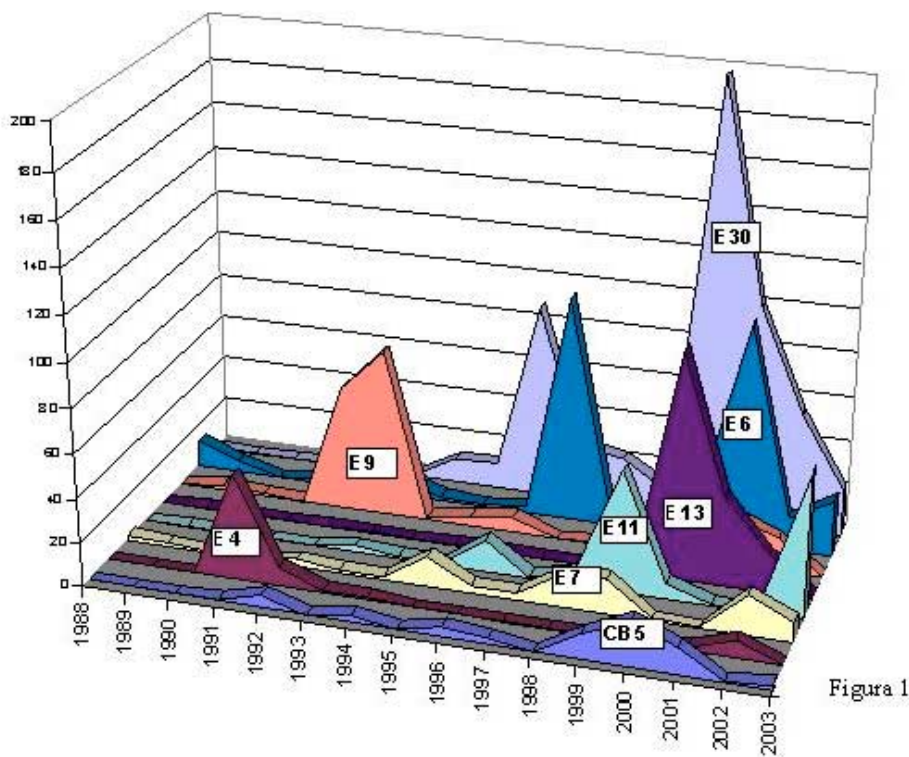


Figura 1. Circulación de enterovirus en España

CIRCULACIÓN DE ECHOVIRUS 11 EN ESPAÑA

La circulación de este serotipo en nuestro país parece ajustarse al patrón epidémico, con una circulación anual de bajo nivel y, aproximadamente cada tres años, un aumento en el número de aislamientos producidos fundamentalmente en el contexto de brotes de meningitis aséptica (figura 2). Los brotes se documentaron en 1993, 1996, 1999 y en el 2003.

En el año 2003 se identificaron 65 cepas procedentes de Barcelona (27), Bilbao (22), Gran Canaria (5), Madrid (3), Pamplona (1), Valencia (1) y Zaragoza (6), correspondientes a 60 pacientes. El 51,7% de éstos estaban afectados de meningitis aséptica, pero también se identificaron: enfermedad respiratoria (18,3%), fiebre (13,3%), sepsis (5%) u otros (11,7%). El 87% de los aislamientos se realizaron en niños menores de cinco años, predominando los

aislamientos en menores de un año (64,8%). Agrupando por edad en las categorías “menores de un año”, “de 1-5 años” y “mayores de cinco años”, observamos que en todos los grupos la sintomatología más frecuente fue la neurológica. La afectación respiratoria y la sepsis se presentaron exclusivamente en los niños menores de un año.

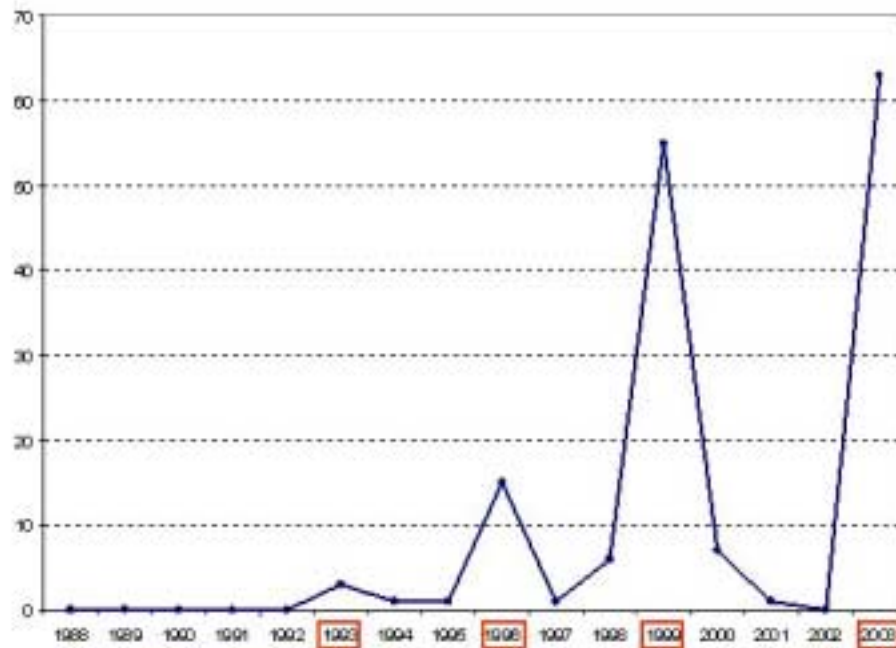


Figura 2

Figura 2. Aislamientos de echovirus 11 en nuestro país

Respecto al análisis molecular de las cepas (VP1) se empleó el procedimiento Kimura 2p como método de sustitución en el análisis de distancias y *neighbour-joining* para reconstruir al árbol filogenético. Se encontró que las cepas de E11 aisladas en España pertenecían al genogrupo descrito por Oberste *et al* 2003 como D5, junto con otras cepas aisladas a partir de 1999 en países como EEUU, Holanda, Kuwait o Túnez. Este grupo parece estar relacionado con la cepa prototipo de E11 llamada Silva, que fue descrita en EEUU en 1963. Sin embargo una de las cepas aisladas en Barcelona parece pertenecer a otro linaje distinto, más próximo a la otra cepa prototipo de E11 llamada Gregory y descrita en EEUU en 1953.

BIBLIOGRAFÍA

- AVELLÓN A, CASAS I, TRALLERO G, PÉREZ C, ANTONIO TENORIO A, PALACIOS G. Molecular analysis of Echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 934-941.
- CASAS I, POZO F, TRALLERO G, ECHEVARRÍA JM, TENORIO A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol* 1999; 57:145-151.
- CASAS I, PALACIOS GF, TRALLERO G, CISTERNA D, FREIRE MC, TENORIO A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol* 2001; 65:138-148.

- CHERRY JD. Enteroviruses: the forgotten viruses of the 80's. En: De la Maza LM, Peterson EM (eds). Medical Virology VII. New York: Elsevier Science Publishers, 1988; 1-33.
- DE LA LOMA A, TRALLERO G, DE ORY F, TENORIO A, SANZ M, ECHEVARRIA JM. Lymphocytic meningitis in Spain: a possible epidemic situation in 2000. Med Clin 2002; 118:694-695.
- MELNICK JL, WIMBERLY IL. Lyophilised combination pools of enterovirus equine antiserum. New LBM pools prepared from reserves of antiserum stored frozen for two decades. Bull WHO 1985; 63:543-550.
- MELNICK JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackievirus, echoviruses and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Raven, 1996; 655-712.
- MINOR PD, BROWN F, DOMINGO E *et al.* Picornaviridae. En: Murphy A, Fauquet CM, Bishop DHL *et al.* (eds), Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna: Springer Verlag. Arch Virol 1995; 140(supl 10):329-336.
- MUIR P. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. Clin Microbiol Rev 1998; 11:202-277.
- OBERSTE MS, NIX WA, KILPATRICK DR, FLEMISTER MR, PALLANSCH MA. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. Virus Res 2003; 91:241-248.
- OTERO JR, FOLGUEIRA L, TRALLERO G *et al.* A-549 is a suitable cell line for primary isolation of coxsackie B viruses. J Med Virol 2001; 65:534-536.
- PALACIOS G, CASAS I, CISTERNA D, TRALLERO G, TENORIO A, FREIRE C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. J Virol 2002; 76:4940-4949.
- ROTBART HA. Enteroviral Infections of the central nervous system. Clin Infect Dis 1995; 20:971-981.
- TRALLERO G, CASAS I, TENORIO A *et al.* Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over ten years (1988-1997). Epidemiol Infect 2000; 124:497-506.
- TRALLERO G, CASAS I, AVELLON A, PEREZ C, TENORIO A, DE LA LOMA A. First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. Epidemiol Infect 2003;130:251-256.
- VICENTE COBOS P, GUTIÉRREZ P, YAÑEZ JL *et al.* Estudio epidemiológico de un brote de meningitis por echovirus tipo-9. Rev Sanid Hig Publica 1994; 68: 607-615.