

DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES VÍRICAS GASTROINTESTINALES

Javier Buesa Gómez, Pilar López-Andújar y Jesús Rodríguez Díaz

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario,
Universidad de Valencia

Las gastroenteritis agudas se encuentran entre las enfermedades más frecuentes del ser humano, solamente superadas por las infecciones víricas respiratorias agudas (Dolin et al., 1987). La microscopía electrónica demostró al principio de la década de los 70 la existencia de partículas víricas en muestras de heces de pacientes aquejados de gastroenteritis aguda, principalmente en niños. Desde entonces se ha avanzado mucho en el conocimiento de estas infecciones intestinales, superando dificultades determinadas por las propias características biológicas de los virus implicados, principalmente su difícil, y a veces imposible, adaptación al cultivo en líneas celulares. Los principales virus productores de gastroenteritis en el ser humano son los rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus. Otros virus, tales como los coronavirus, torovirus, picobirnavirus y picornavirus (virus Aichi) son también causa de diarrea, pero con menor trascendencia epidemiológica (Tabla 1).

Tabla 1. Virus productores de gastroenteritis en la especie humana.

- Rotavirus (grupos A, B, C)
- Calicivirus: virus tipo Norwalk (NLV) y tipo Sapporo (SLV)
- Astrovirus
- Adenovirus entéricos (serotipos 40 y 41)
- Coronavirus-like
- Torovirus
- virus Aichi (*Picornaviridae*)
- Picobirnavirus

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Todos estos agentes víricos son fácilmente detectados por microscopía electrónica (ME) cuando se encuentran en elevadas concentraciones en las heces, lo que con frecuencia ocurre en las personas infectadas que presentan sintomatología, aunque se estima que se requiere del orden de 10^6 partículas víricas por gramo de muestra para poder ser observadas. La inmunomicroscopía electrónica, utilizando antisueros o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la ME, y además sirve para demostrar la agregación de partículas víricas por los anticuerpos específicos, una de las observaciones consideradas como demostrativas del papel patógeno de los distintos virus.

Estas técnicas continúan siendo de gran utilidad en el diagnóstico de las gastroenteritis víricas, siempre, por supuesto, que se pueda disponer de un microscopio electrónico y de personal entrenado. El procesamiento de las muestras no es complejo ni laborioso, y en pocos minutos se puede realizar una tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La gran ventaja de la microscopía electrónica respecto a otras técnicas diagnósticas es que permite encontrar cualquier virus, sin que el procedimiento limite la identidad del agente detectado, como sucede con las técnicas inmunológicas o moleculares. La mayoría de los virus son fácilmente reconocibles por su morfología, y algunos virus se diagnostican principalmente por este procedimiento (torovirus, coronavirus). Por microscopía

electrónica se detectan, además, virus que en muchos laboratorios no se investigan por otras técnicas (rotavirus de grupos B y C, calicivirus, etc.).

ROTAVIRUS

Los rotavirus del grupo A constituyen la principal causa de gastroenteritis grave en niños de todo el mundo. Producen unos 125 millones de infecciones cada año en los países en desarrollo y son causa de 873.000 fallecimientos anuales (Glass et al., 1994).

Tres proteínas estructurales de rotavirus tienen gran importancia para clasificar a estos virus según su antigenicidad. La proteína VP6, que constituye la cápsida interna del virión, es responsable de la existencia de siete serogrupos (A-G). Las infecciones humanas son producidas principalmente por rotavirus del grupo A y, en menor medida, o con otras características epidemiológicas, por los grupos B y C. El resto de grupos de rotavirus producen infecciones en los animales, aun cuando los del A infectan también algunas especies animales, además del hombre. Los rotavirus humanos del grupo A se subdividen en dos subgrupos (I y II) en función de la especificidad de la VP6.

La proteína VP4, que constituye las espículas del virión, y la glucoproteína VP7 de la cápsida externa determinan la existencia de serotipos P y G, respectivamente. Los serotipos P que infectan a humanos son P1A, P1B, P2A, P3, P4, P5 y P8 (Steele et al., 1993). La escasez de sueros específicos frente a estos serotipos ha hecho que, actualmente, se determine más a menudo el genotipo P por la técnica de RT-PCR que el serotipo, siendo los genotipos más frecuentes P[4], P[6], P[8] y P[9]. Se han descrito 14 serotipos G, aunque los más frecuentes infectando al ser humano son G1-G4.

El diagnóstico de las infecciones por rotavirus se hace habitualmente detectando la existencia de antígeno vírico en muestras de heces, con frecuencia la proteína VP6. El aislamiento en cultivo es difícil y carece de interés diagnóstico. Los métodos inmunológicos detectan solamente rotavirus del grupo A, ya que por el momento no existen métodos comercializados para detectar rotavirus de grupos B y C. Los formatos técnicos utilizados son el EIA convencional (en placa o en tubo), el EIA de membrana, la aglutinación con látex y la inmunocromatografía.

Los métodos moleculares detectan la presencia de RNA vírico, bien poniendo de manifiesto segmentos de RNA bicatenario mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), o bien amplificando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el DNAC previamente sintetizado por reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Estos métodos requieren la extracción previa del ácido nucleico vírico y la eliminación de inhibidores que pueden interferir en la reacción de RT-PCR (Buesa *et al.*, 1996). Por otro lado, tienen la ventaja de que permiten caracterizar los diferentes aislados, bien por el patrón electroforético del RNA vírico (*electroforetipo*) o bien determinando el genotipo G (Gouvea *et al.*, 1990) y P (Gentsch *et al.*, 1992) por PCR semi-anidada, disponiendo de los cebadores adecuados. La detección de rotavirus de grupos B y C se puede realizar también utilizando cebadores específicos (Gouvea *et al.*, 1991). Estas técnicas han abierto la posibilidad de estudiar la evolución y la variabilidad de los rotavirus en diferentes regiones geográficas y a lo largo del tiempo (Buesa *et al.*, 2000).

ADENOVIRUS ENTÉRICOS (SEROTIPOS 40 y 41)

Estos adenovirus, también denominados “fastidiosos” por ser difíciles de cultivar en las líneas celulares habituales, aunque sí se propagan en las líneas Graham 293 y Chang, se caracterizan por su marcado tropismo intestinal. Estos serotipos constituyen el 59 % de los adenovirus encontrados en las heces y causan un 7% de casos de diarrea en niños (Jong *et al.*, 1983). El diagnóstico de las infecciones por adenovirus entéricos se establece

habitualmente por método de EIA, aglutinación de látex o inmunocromatografía. Otros métodos de caracterización de adenovirus entéricos son el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLPs), PCR y la hibridación en *dot-blot*.

ASTROVIRUS

Los astrovirus (familia *Astroviridae*) producen un 2-8% de las gastroenteritis infantiles en forma de casos esporádicos y brotes de diarrea en comunidades, hospitales y guarderías. Es posible su aislamiento en cultivo de líneas celulares LLC-MK2 o Caco-2, en presencia de tripsina. Se han descrito ocho serotipos, de los que el serotipo 1 es el más común. El diagnóstico puede establecerse, además de por ME, por cultivo y por EIA comercial, y por RT-PCR (Mitchell *et al.* 1999). Es también factible realizar el tipado por análisis con enzimas de restricción de los productos de PCR (RFLP) y por secuenciación.

CALICIVIRUS HUMANOS

El virus Norwalk es el prototipo de los calicivirus humanos, durante mucho tiempo también denominados “pequeños virus redondos estructurados” (*small round-structured viruses*, SRSV), y actualmente considerado un miembro del género “virus Norwalk-like” (NLV). Otro género lo constituyen los “virus Sapporo-like” (SLV) que, junto con los géneros Lagovirus y Vesivirus, se integran en la familia *Caliciviridae*. Los NLV se dividen en tres genogrupos, GGI, GGII y GGIII. Los genogrupos GGI y GGII infectan a los humanos, e incluyen 5 y 10 *clusters* genéticos, respectivamente. Los virus del GGIII se han detectado en ganado bovino y porcino. Al genogrupo GGI pertenecen, por ejemplo, los virus Norwalk, Southampton y Desert Shield, mientras que en el GGII se incluyen los virus Hawaii, México, Lordsdale y Grimsby, entre otros. Los calicivirus humanos no se han conseguido propagar en cultivos celulares, lo que ha supuesto una importante limitación para su estudio. Sin embargo, la expresión de la proteína de la cápsida vírica en células de insecto mediante el sistema de baculovirus recombinantes ha permitido producir partículas pseudovíricas (*virus-like particles* o VLP) que se han utilizado como fuente de antígeno para obtener sueros y anticuerpos monoclonales.

El diagnóstico de las infecciones gastrointestinales por calicivirus humanos se realiza actualmente mediante la detección del ácido nucleico por técnica de RT-PCR, utilizando distintos pares de oligonucleótidos. Una excelente revisión sobre el diagnóstico de las infecciones por calicivirus humanos fue publicada recientemente por Atmar y Estes (2001). La mayoría de los cebadores descritos en la literatura amplifican secuencias de la región de la RNA polimerasa viral, la más conservada del genoma. Los cebadores más ampliamente utilizados son los descritos por Ando *et al.* (1995), Green *et al.* (1995), Le Guyader *et al.* (1996) y Vinjé *et al.* (1996). A pesar de numerosos esfuerzos por desarrollar cebadores universales o degenerados que pudiesen detectar todas las cepas de calicivirus humanos circulantes, este objetivo no se ha logrado. Sin embargo, la mayoría de las cepas de NLV son detectadas con los cebadores descritos por Vinjé *et al.* (1996) y por Le Guyader *et al.* (1996). La RT-PCR está permitiendo diagnosticar no sólo los casos clínicos de infecciones por calicivirus, sino también detectar su presencia en muestras ambientales, agua y alimentos (Green *et al.*, 1998). La información proporcionada por estos estudios ha permitido reconocer a los calicivirus como la principal causa de gastroenteritis epidémica. Mediante RT-PCR es posible detectar también las infecciones por (SLV) (Vinjé *et al.*, 2000), que afectan, sobre todo, a niños pequeños, e incluso se han diseñado cebadores que detectan tanto NLV como SLV (Jiang *et al.*, 1999).

La diversidad genética de los calicivirus humanos está siendo estudiada mediante genotipado de las cepas aisladas. Además de la secuenciación de los amplificadores de PCR, otros métodos aplicados con éxito al tipado molecular de calicivirus son la hibridación en *blot* de línea inversa (*reverse line blot hybridization*) (Vinjé *et al.*, 2000) y el análisis de movilidad

de híbridos (*heteroduplex mobility assay*) (Mattick *et al*, 2000), que permiten analizar simultáneamente un elevado número de cepas, por lo que están especialmente indicados en laboratorios de referencia.

Se han diseñado en varios laboratorios métodos de enzimoimmunoensayo para detectar antígeno vírico pero, hasta el momento, no se ha comercializado ninguno. Estos ensayos utilizan sueros policlonales (Jiang *et al*, 1995) o anticuerpos monoclonales (Herrmann *et al*, 1995) obtenidos frente a partículas pseudovíricas, y su principal limitación es que tienen, en general, un espectro limitado, por lo que sólo detectan determinados serotipos.

OTROS VIRUS ENTEROPATÓGENOS

Otros virus causantes de cuadros de gastroenteritis parecen merecer un menor interés en cuanto al desarrollo de métodos diagnósticos, tanto inmunológicos como moleculares, lo que se justificaría por su menor importancia epidemiológica. Se trata de virus como los coronavirus entéricos, los torovirus o el virus Aichi. Este último fue aislado en Japón en 1991 en células BSC-1 a partir de pacientes con gastroenteritis asociada al consumo de ostras (Yamashita *et al*, 1991). La secuenciación del genoma completo de este virus demostró que se trata de un Picornavirus (Yamashita *et al*, 1998). Queda todavía por determinar la prevalencia de las infecciones por este virus en otros países además de Japón, Pakistán y otras zonas del sudeste asiático.

Los coronavirus entéricos humanos se asocian a gastroenteritis en los neonatos, en donde se les ha implicado como causa de enterocolitis necrosante y, en general, en niños menores de 12 años. Los torovirus están implicados en la producción de diarrea, en ocasiones sanguinolenta, con frecuencia de adquisición nosocomial. Asimismo, los picobirnavirus, virus con genoma constituido por dos segmentos de RNA bicatenario, se han detectado principalmente los pacientes infectados por el VIH (Giordano *et al*, 1999).

El desarrollo de métodos de detección de antígenos (aglutinación de látex, ELISA, inmunocromatografía) para estos virus entéricos supondría una gran avance para permitir su diagnóstico en la práctica asistencial, lo que redundaría en un mejor conocimiento de su importancia epidemiológica y de la fisiopatología de las enfermedades que producen.

BIBLIOGRAFIA

- ANDO T, MONROE SS, GENTSCH JR, JIN Q, LEWIS DC, GLASS RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995; 33:64-71.
- ATMAR RL, ESTES MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:15-37.
- BUESA J, COLOMINA J, RAGA J, VILLANUEVA A, PRAT J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res Virol* 1996; 147:353-361.
- BUESA J, DE SOUZA CO, ASENSI M, MARTÍNEZ C, PRAT J, GIL MT VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:501-506.
- DE JONG JC, WEIGAND R, KIDD AH *et al*. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stools. *J Med Virol* 1983; 11:215-231.

- DOLIN R, TREANOR PP, MADORE HP. Novel agents of viral enteritis in humans. *J Infect Dis* 1987; 155:365-376.
- GENTSCH JR, GLASS RI, WOODS P *et al.* Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1365-1373.
- GIORDANO MO, MARTÍNEZ LC, RINALDI D *et al.* Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1999; 15:1427-1432.
- GLASS RI, GENTSCH J, SMITH JC. Rotavirus vaccines: success by reassortment? *Science* 1994; 265:1389-1391.
- GOUVEA V, GLASS RI, WOODS P *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28:276-282.
- GREEN J, GALLIMORE CI, NORCOTT JP, LEWIS D, BROWN DWG. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction in the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47:392-398.
- GREEN J, HENSHILWOOD K, GALLIMORE CI, BROWN DWG, LEES DN. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:858-863.
- HERRMANN JE, BLACKLOW NR, MATSUI SM *et al.* Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2511-2513.
- JIANG X, WAN GJ, ESTES MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 1995; 140:363-374.
- JIANG X, HUANG PW, ZHONG WM, FARKAS T, CUBITT DW, MATSON DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like viruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999; 83:145-154.
- LE GUYADER F, ESTES MK, HARDY ME *et al.* Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* 1996; 141:2225-2235.
- MATTICK KI, GREEN J, PUNIA P, BELDA FJ, GALLIMORE CI, BROWN DWG. The heteroduplex mobility assay as a pre-sequencing screen for Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2000; 87:161-169.
- MITCHELL DK, MATSON DO, JIANG X *et al.* Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis* 1999; 180:514-517.
- STEELE AD, GARCÍA D, SEARS J, GERNA G, NAKAGOMI O, FLORES J. Distribution of VP4 gene alleles in human rotaviruses by using probes to the hyperdivergent region of the VP4 gene. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1735-1740.
- VINJÉ J, KOOPMANS MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174:610-615.
- VINJÉ J, DEIJL H, VAN DER HEIDE R *et al.* Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:530-536.

- VINJÉ J, KOOPMANS MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2595-2601.
- YAMASHITA T, KOBAYASHI S, SAKAE K *et al.* Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J Infect Dis* 1991; 164:954-957.
- YAMASHITA T, SAKAE K, TSUZUKI H *et al.* Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the *Picornaviridae* associated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol* 1998; 72:8408-8412.