



Análisis de líquido cefalorraquídeo por métodos inmunológicos y de biología molecular en el diagnóstico de meningitis aséptica por Enterovirus

12 min.



En el siguiente trabajo investigadores del Laboratorio MANLAB explican como analizaron mediante el uso simultáneo de un método inmunológico (IFI) y de biología molecular (PCR en Tiempo Real) muestras de líquido cefalorraquídeo pertenecientes a pacientes con diagnóstico presuntivo de meningitis aséptica. Este análisis les permitió detectar el genoma viral y los anticuerpos específicos para el Enterovirus (Coxsackie y Echovirus), así como clasificar a los pacientes en diferentes categorías, lo que haría posible un mejor diagnóstico de la infección.



Guillermo Gabriel Nuñez (1), Ariela Soledad Galarza (*), María Gabriela García (**), Daniel Alberto Pirola, María Silvia Pérez (2)

1- Bioquímico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Docente Autorizado e Investigador de la Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. Bioquímico de Planta MANLAB, área Inmunoserología y Autoinmunidad
2- Bioquímica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Jefa del Área Medicina Genómica-MANLAB
*Técnica de laboratorio Área Inmunoserología y Autoinmunidad-MANLAB
**Bióloga Área Medicina Genómica-MANLAB



E-mail:
maria.perez@genesis-manlab.com.ar
guillermo.nunez@genesis-manlab.com.ar



Introducción

Los virus ARN de menor tamaño conocidos hasta el momento son los picornavirus, de allí deriva su nombre pico=pequeño.

Los picornavirus son los virus ARN de menor tamaño que se conocen hasta el momento, de donde deriva su nombre pico=pequeño. El Comité Internacional de Nomenclatura Viral considera que la familia Picornaviridae está constituida por diferentes géneros: Enterovirus, Rinovirus y dos géneros que infectan animales, Aftovirus agente productor de aftosa y Cardiovirus productor de encefalomio-carditis de los roedores.

Los picornavirus poseen características estructurales comunes: tienen un diámetro de 20 a 30 nm, ARN de cadena simple no segmentado y cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura. El ARN es infeccioso y puede servir de templado para la síntesis de ARN adicional (ARN+) o puede ser encapsidado para formar progenie de viriones. Al carecer de envoltura lipídica son resistentes a los solventes y detergentes que destruyen otros virus. Sin embargo, estos virus se inactivan rápidamente por radiaciones ionizantes, cloro residual, formaldehído y fenol. Los enterovirus son estables a pH ácido, lo que les permite luego de la replicación inicial en orofaringe atravesar estómago e implantarse en el tracto intestinal inferior [1].

El ciclo replicativo de los enterovirus es lítico y su receptor celular es una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se presenta en distintos órganos diana, como el corazón (Coxsackievirus), el sistema nervioso central (SNC), el hígado o el intestino.

Se conocen más de 70 serotipos que causan infecciones, algunas clínicamente inaparentes, que en un pequeño porcentaje de casos, dan origen a enfermedades graves del SNC, como la meningitis aséptica, encefalomiелitis, ataxia cerebelar, síndrome

de Guillain-Barre, mielitis transversa y poliomiелitis, entre otras. Determinados enterovirus se asocian con frecuencia a brotes epidémicos, dando lugar a un síndrome específico, los mismos serotipos pueden, también ser responsables de infecciones esporádicas, con diferentes manifestaciones clínicas, incluso hasta asintomáticas. Por otro lado, diferentes virus pueden producir el mismo síndrome. Por estas razones, en general, las manifestaciones clínicas no son una base satisfactoria para el diagnostico (Tabla 1).



Tabla 1: Manifestaciones clínicas asociadas a Enterovirus

Grupos	Manifestaciones clínicas
Poliovirus	Poliomielitis paralítica-Meningitis aséptica-Síndrome febril
Virus Coxsackie A	Meningitis aséptica-Herpangina-Síndrome febril-Conjuntivitis Síndrome pie-mano-boca
Virus Coxsackie B	Meningitis aséptica-Síndrome neonatal grave-Miopericarditis Encefalitis-Pleurodinia-Síndrome febril
Echovirus	Meningitis aséptica-Conjuntivitis-Exantema cutáneo Síndrome neonatal grave-Síndrome febril
Enterovirus 68-71	Meningitis aséptica -Síndrome de pseudo-polio- Síndrome pie-mano-boca-Conjuntivitis epidémica

El virus penetra en el organismo por vía oral o nasofaríngea, con un periodo de incubación que oscila entre 3 y 30-40 días. Se multiplica localmente en el tejido linfóide de la faringe y las placas de Peyer y después se disemina por vía sanguínea (viremia primaria) a otros tejidos diana, como la piel, miocardio, meninges, páncreas, etc., donde se replica. Los síntomas pueden ser el resultado directo de la destrucción de las células diana en los tejidos (como ocurre en



Mindray BC-5800 Analizador Hematológico 5 diferencial láser con autosampler 90 test hora

- Totalmente automático, compacto y flexible.
- Diferencial de 5 Poblaciones, 29 parámetros, 2 gráficos de Scatter y 2 Histogramas.
- Tecnología Láser combinada con Método de tinsión Química. Citometría de Flujo de última tecnología.
- Velocidad: 90 muestras por hora.
- Almacena 40.000 resultados.
- 2 tipos de muestras: Sangre entera y pre-diluida.
- Canal Independiente para la medición de Basófilos.
- Auto Loader que facilita la tarea del Operador y Disminuye el Tiempo de Trabajo.
- Lector de Codigos de Barras Incorporado.
- Conectividad con Sistemas de Laboratorio a través de Interfaces de Última Generación.
- Emisión de Alarmas ante posibles Muestras Anormales o Patológicas.



Mindray BS-380 Auto-analizador de Química Clínica 300 test hora con lavador de cubetas

- NO REACTIVO DEPENDIENTE
- 450 Test por hora (con ISE).
- 58 posiciones para reactivos en compartimiento refrigerado. (4° a 10° C)
- 75 posiciones para muestras.
- Limpieza de aguja automática, detección de nivel de líquido, protección anticolidión y Lavado Automático de Cuvetas en 8 Pasos que asegura de Calidad del Resultado.
- 12 Longitudes de Onda: 340nm. a 800 nm.
- Interface bi-direccional a software de laboratorio.
- Lector interno de código de barras para muestras.



Mindray BC-5300 Analizador Hematológico 5 diferencial láser 60 test hora

- Totalmente automático, compacto y flexible.
- Diferencial de 5 Poblaciones, 27 parámetros, 1 gráficos de Scatter y 3 Histogramas.
- Tecnología Láser combinada con Método de tinsión Química. Citometría de Flujo de última tecnología.
- Velocidad: 60 muestras por hora.
- Almacena 40.000 resultados.
- 2 tipos de muestras: Sangre entera y pre-diluida.
- El volumen de muestra necesario es de tan solo 20uL.
- Emisión de Alarmas ante posibles Muestras Anormales o Patológicas.

HEPATOLOGÍA



QUÍMICA CLÍNICA



INMUNOLOGÍA



MEDIO INTERNO



Representante en Argentina

Representante en Argentina

RADIOMETER 

GEMATEC 
equipamiento para medicina

mindray

Int. Avalos 3651 - (1605), Munro - Buenos Aires - Argentina
Tel/Fax: (54 11) 4794-7575 / 7676 / 3184 - e-mail: info@gematec.com.ar - Web: www.gematec.com.ar

la poliomiелitis), o puede deberse a la respuesta inmune frente al virus (como ocurre en el modelo murino de miocarditis por virus Coxsackie B).

La mayoría de las infecciones son abortivas, debido a la existencia de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos IgG, IgM e IgA aparecen con bastante rapidez en el curso de la infección. La inmunidad es, predominantemente, humoral, específica de serotipo y duradera (los anticuerpos persisten durante toda la vida) [2].

La mayoría de los enterovirus que son citopatogénicos, pueden ser recuperados por inoculación de las muestras en cultivos primarios o de línea de riñón de mono, o de células diploides humanas. Para el aislamiento de los serotipos de Coxsackie A que no producen efecto citopático en cultivos celulares, deben utilizarse ratones lactantes. Un diagnóstico presuntivo de infección enteroviral puede realizarse, teniendo en cuenta las características clínicas de la enfermedad, la época del año, el sistema celular en el cual el virus se aisló, las características del efecto citopático, etc. A pesar de que no existe terapéutica antiviral específica, el reconocer tempranamente una infección enteroviral puede brindar información para el manejo del paciente y para reconocer en la comunidad un brote de enfermedad similar [1, 3].

El método más utilizado para la tipificación de un enterovirus es la seroneutralización con antisueros específicos. Mientras el aislamiento de un enterovirus se realiza con rapidez, su identificación generalmente es lenta y laboriosa. La identificación del serotipo no tiene una utilidad clínica inmediata; la mayoría de las veces, lo importante es determinar con rapidez si se trata de un enterovirus o no, aunque si tiene un importante interés epidemiológico. Para la mayoría de los enterovirus, la identificación específica se realiza mediante la neutralización (ya mencionada), aunque también se utilizan otros tipos de técnicas como la hemoaglutinación indirecta (HAI), fijación del complemento (FC) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es actualmente la forma más sencilla y rápida de tipificación de los enterovirus. Es conocido que el índice de recuperación de enterovirus por cultivo a partir de LCR es bajo, debido a la escasa concentración de viriones en la muestra y a la dificultad de crecimiento de algunos serotipos en los cultivos celulares. La

detección de genoma mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aporta rapidez, aumento de sensibilidad y posibilidad de detección de todos los enterovirus [1, 2, 3, 4].

Teniendo en cuenta los métodos diagnósticos actualmente empleados para la detección de la infección por enterovirus, el objetivo del presente trabajo fue detectar, y comparar los resultados obtenidos de la detección de anticuerpos mediante un método inmunológico (IFI) y un método de biología molecular (PCR en Tiempo Real) que detecta ARN viral, en muestras de líquido cefalorraquídeo pertenecientes a pacientes con diagnóstico presuntivo de meningitis aséptica.

Materiales y Métodos

Muestras: Se analizaron 36 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) provenientes de pacientes con sospecha de meningitis. Las muestras fueron remitidas a la Sección de Biología Molecular del laboratorio MANLAB y luego de su análisis, remitidas a la Sección de Inmunología del mismo laboratorio. Todas las muestras seleccionadas no provinieron de extracciones traumáticas, por lo que se descartó la contaminación con sangre de las mismas. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta el momento de su análisis.

Detección de RNA viral: El RNA viral fue extraído de muestras de LCR empleando el reactivo comercial Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit (Roche) utilizando el equipo Magna Pure compact system (Roche). Se usó como control interno de purificación y amplificación CPE-RNA (Nanogen Advanced Diagnostics). El ARN obtenido fue sometido a transcripción reversa (RT-PCR) empleando random primers mediante el kit comercial High-Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El cDNA obtenido fue sometido a amplificación empleando primers específicos del género Enterovirus. La amplificación fue realizada mediante Real Time PCR empleando el kit Enterovirus Q-PCR Alert AmpliPROBE (Nanogen Advanced Diagnostics) siguiendo las especificaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en el Step One Real Time PCR System. (Applied Biosystems).

Detección de anticuerpos específicos: Se llevó a cabo la detección de anti-cuerpos

específicos para Echovirus y Coxsackievirus B mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Para la detección de anticuerpos anti-Coxsackievirus, se emplearon improntas conteniendo células A549 infectadas con Coxsackievirus B1 a B6 (cepas NIH, MBL Bion). Para la detección de Echovirus, se emplearon improntas conteniendo una mezcla de células A549, LLCMK2, VERO y HeLa infectadas con Echovirus serotipos 4, 6, 9, 11, 30 y 34, variante CoxA 24 (MBL Bion). Las muestras fueron empleadas sin diluir (IgG) siguiendo protocolos de IFI estandarizados en nuestro laboratorio. Las reacciones fueron reveladas mediante incubación con antisueros de cabra monoespecíficos anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) adecuadamente diluidos en PBS conteniendo Azul de Evans como contracolor. Para la detección de IgM e IgA, las muestras fueron previamente adsorbidas empleando el adsorbente RF (Biocientífica), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control de especificidad, se incluyeron muestras positivas y negativas en cada ensayo. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon) por dos operadores independientes.

Resultados y Discusión

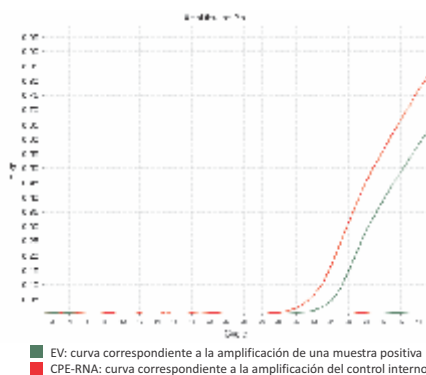
El análisis molecular de las muestras de LCR remitidas arrojó un 22,2% de positividad. Dado que la reacción de PCR en Tiempo Real detecta el material genómico viral, se puede deducir que las muestras correspondientes a estos pacientes contenían Enterovirus como probable causante de meningitis aséptica. Cabe destacar que en aquellas muestras en donde se obtuvieron resultados negativos, la ausencia de material genómico enteroviral puede ser confirmada, dado que se descarta la presencia de inhibidores por la amplificación del CPE-RNA utilizado como control interno. En la Figura 1 se muestra una típica curva obtenida en la reacción de PCR en Tiempo Real.

La detección de anticuerpos específicos para Coxsackievirus y/o Echovirus arrojó un porcentaje de positividad total del 55,5%. Mediante la técnica de IFI, se logró detectar la presencia de IgG e IgA específicas en un 55,5% y 5,5% de las muestras respectivamente.



Figura 1: Curvas correspondientes a la amplificación de una muestra conjuntamente

con el control interno mediante la reacción de PCR en Tiempo Real.



Es sabido que las reinfecciones por Enterovirus son posibles [5]. Este caso correspondería a los pacientes pertenecientes al grupo A (Tabla 2) dado que en los mismos se detectó concomitantemente la presencia del virus y de IgG específica tanto para Coxsackievirus como para Echovirus. La presencia de IgG para ambos virus puede deberse bien sea a infecciones con ambos virus en diferentes tiempos o bien a la infección con uno de ellos, detectándose el otro por fenómenos de inmunorreactividad cruzada [4]. Podemos inferir que las muestras pertenecientes al grupo A corresponden a reinfecciones, dada la presencia del virus y la ausencia de detección de IgM específica.

Los pacientes pertenecientes al grupo B presentaron resultados positivos para la PCR sin detectarse en ellos anticuerpos específicos, aún cuando las muestras fueron ensayadas sin diluir (excepto en el caso de IgM e IgA donde se realizó una dilución 1:2 para la adsorción de las IgG). Estos resultados probablemente se deban a que las muestras posean una concentración de anticuerpos que se encuentra por debajo del límite de detección de técnica. La obtención de muestras pareadas podría confirmar esta

hipótesis.



Tabla 2. Clasificación de las muestras de acuerdo a la detección del genoma viral de Enterovirus o de los anticuerpos específicos en LCR

Grupo	Presencia de Anticuerpos anti-Coxsackievirus B y Echovirus				% Positividad
	PCR	IgG	IgM	IgA	
A	+	+	-	-	13,9
B	+	-	-	-	8,3
C	-	+	-	-	50,0
D	-	+	-	+	5,5
E	-	-	-	-	22,2

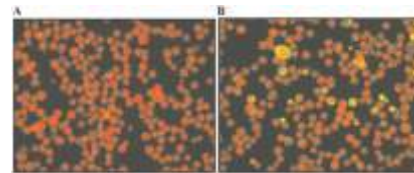
La detección de IgG e IgA específicas en ausencia de virus (pacientes pertenecientes a los grupos C y D) podría deberse a que se trate de muestras tardías, donde ya el pico de viremia en SNC ha desaparecido o bien a una infección pasada. En este último caso y a los efectos de determinar compromiso del SNC, sería de particular interés determinar si dichos anticuerpos específicos son de síntesis intratecal o si corresponden a moléculas de inmunoglobulinas que han difundido desde el compartimiento sistémico hacia el LCR a través de la barrera hematoencefálica. Para corroborar esta última hipótesis hubiera sido interesante contar con muestras de suero de dichos pacientes para llevar a cabo el cálculo del índice de IgG e IgA [6].

Finalmente, en los pacientes correspondientes al grupo E en los cuales no se detectó presencia de genoma viral ni anticuerpos específicos, la meningitis aséptica por Enterovirus podría ser descartada, siendo necesaria la investigación de otros virus causantes de meningitis tales como EBV, Herpes 6, etc.



Figura 2: Reacción de IFI para la detección

de Coxsackievirus. Panel A: reacción negativa, Panel B: reacción positiva. 200x



Conclusiones

En el presente estudio se llevó a cabo la detección de genoma viral y de anticuerpos específicos para Enterovirus (Coxsackie y Echovirus). Tanto la PCR en Tiempo Real como la IFI resultaron útiles para clasificar a los pacientes en diferentes categorías, a saber: grupo A: reinfección enteroviral, grupo B: infección activa sin inmunidad previa, grupos C y D: infección enteroviral pasada con o sin compromiso del SNC y grupo E: ausencia de infección enteroviral. La correcta clasificación de los pacientes fue posible gracias al uso simultáneo de ambas metodologías. El análisis de muestras seriadas como así también de los sueros de los pacientes, haría posible arribar a un mejor diagnóstico de la infección. La técnica de IFI utilizada en muestras de LCR resultó útil para la detección de anticuerpos específicos.

Bibliografía

- Novillo A. Familia Picornaviridae. En: Virología Médica. G. Carballal, J. R. Oubiña. El Ateneo. Buenos Aires, 1991.
- Sanchez M, Marti A. Enterovirus: características y diagnóstico. Control Calidad Seimic. Artículo electrónico. www.seimic.org/control/revisiones/viromicromol/enterovi.pdf.
- Peigue-Lafeuille H. Pathogens relevant in the central nervous system. En: Molecular diagnosis of infectious diseases. Kessler H. (Ed), Walter de Gruyter GmbH & Co.KG
- Craig ME, Robertson P, Howard NJ, Silink M, Rawlinson WD (2003). Diagnosis of enterovirus infection by genus-specific PCR enzyme-linked immunosorbent assays. J. Clin. Microbiol. 41(2): 841-844.
- Constanzo CM, Monte I, Zappalà, D, Palermo DI, Spanò S, Russo R, Olivieri S, Patamia I, Scalia G. (2011). Synergy of molecular and serological methods in minimally invasive diagnosis of enteroviral cardiac infection. New Microbiologica, 34: 255-262.
- Reiber H, Peter JB. (2001). Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J. Neurol. Sci. 184: 101-122.

Equipos precisos resuelven sus problemas.

Simplificando procesos.

BIOCIENTIFICA S.A. REPRESENTANTE EN ARGENTINA: Bior Technology - Biocom Ltd - DITABIS.

- Termocicladores PCR y PCR Real Time
- Sistemas de electroforesis horizontal y vertical
- Sistemas de documentación de geles
- Sistemas de secado de geles
- Fuentes de poder

- Transiluminadores UV
- Baños secos
- Baños de agua
- Incubadoras
- Agitadores

- Microcentrifugas
- Spin Down
- Vortex
- Lectores de Microarrays
- Y más...

Biocientífica
Calidad en Reactivos. Excelencia en Biotecnología.