

LA ETIOLOGIA VIRAL DE LAS DIARREAS Y LA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Francisco Hernández^{1, 2} y Leonardo Mata^{1, 2, 3},

Panorama etiológico de las diarreas hasta 1973

Los conocimientos sobre la etiología viral de las diarreas son relativamente nuevos. Desde 1930 se sospechaba la participación de algunos agentes virales en la causalidad de las diarreas inespecíficas (29), pero fueron Light & Hodes en 1941 (21) quienes describieron por primera vez un virus de la diarrea (el "agente de Baltimore") en un brote epidémico en neonatos. Transcurrieron más de 35 años para que se demostrara que probablemente se trataba de los recientemente descubiertos rotavirus (15).

En 1947 Gordon et al (12) informaron sobre un virus causal de la diarrea, logrando reproducir el cuadro clínico por inoculación de voluntarios con filtrados fecales libres de células.

En esa misma época, Enders et al. (7) aplicaron los cultivos de células in vitro en forma fácil y confiable al cultivo de los poliovirus (31), lo que inició el auge de la virología moderna al permitir el aislamiento de muchos agentes virales de enfermedades conocidas o nuevas. Así, se demostró que los echovirus (20), coxsackievirus (8) y adenovirus (19) podían estar asociados al desarrollo de diarrea. Sin embargo, aún en 1973 los estudios etiológicos más completos no podían explicar más del 40 % de los casos de diarrea (13,24). Hechos fortuitos resultaron en la aplicación de la microscopía electrónica al estudio de biopsias de mucosa intestinal y de heces de pacientes con gastroenteritis aguda inespecífica, descubriéndose diversas partículas virales relacionadas con el síndrome diarreico.

Panorama etiológico de la diarrea a partir de 1973

En 1973 dos grupos de investigadores independientes, uno en Australia encabezado por Ruth Bishop (3) y otro en Inglaterra dirigido por John Flewett (9) informaron sobre la existencia de partículas ultramicroscópicas, que correspondían a un nuevo agente viral, en pacientes que sufrían de gastroenteritis aguda

1. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica

2. Ministerio de Salud, Costa Rica.

3. Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social.

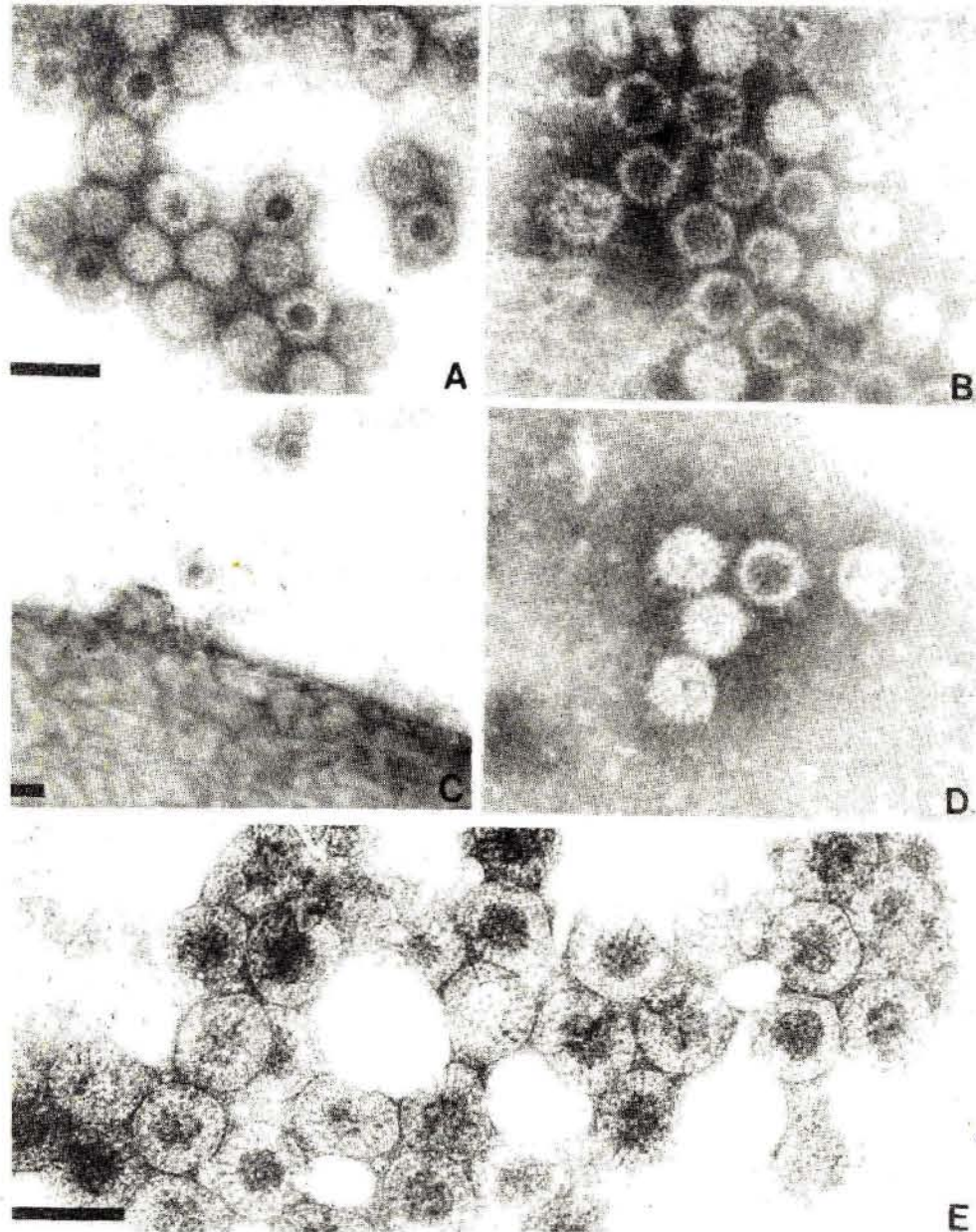


FIGURA 1:

Microscopía electrónica de transmisión: preparaciones fecales de rotavirus teñidas con ácido fosfotúngstico (AFT). Algunos viriones exhiben el centro obscuro debido a que al perder el ácido nucleico (ARN), su lugar ha sido llenado por el "colorante" (AFT). Estos virus presentan doble cápsida que les da un borde externo liso (A, C y D). Cuando los viriones pierden su cubierta externa ofrecen un aspecto rugoso (B y E). En C aparecen unos viriones cerca del cuerpo de una bacteria. A, B y D tienen la misma magnificación. Las barras indican 100 nanómetros.

inespecífica (*). El grupo de Bishop visualizó el virus en biopsias de mucosa intestinal y le denominaron duovirus, Flewett y su grupo lo observaron en preparaciones fecales y le denominaron rotavirus. La fácil observación de las partículas al microscopio electrónico le dió gran impulso a su estudio, ya que la técnica de diagnóstico microscópico es sencilla, para la que se requieren extractos fecales clarificados y a veces concentrados por ultracentrifugación. Los extractos son manipulados, teñidos con ácido fosfotúngstico y observados al microscopio electrónico de transmisión (MET). La técnica ha permitido comprobar la existencia de rotavirus (Figura 1) en muchas partes del mundo e incriminarlas como el agente causal en más del 50 % de las diarreas infantiles en ciertas épocas del año (4,6,14,17,26).

En Costa Rica se han investigado los rotavirus empleando una modificación de la técnica de Flewett (10). Las heces se clarifican por centrifugación a 4000 rpm (2000 x G) durante 30 minutos a 4°C; el sobrenadante sirve para impregnar rejillas de 200 "mesh" recubiertas por una membrana soporte de "formvar", la que se seca a temperatura ambiente; la preparación se tiñe luego con ácido fosfotúngstico y se examina al MET (25), Figura 2.

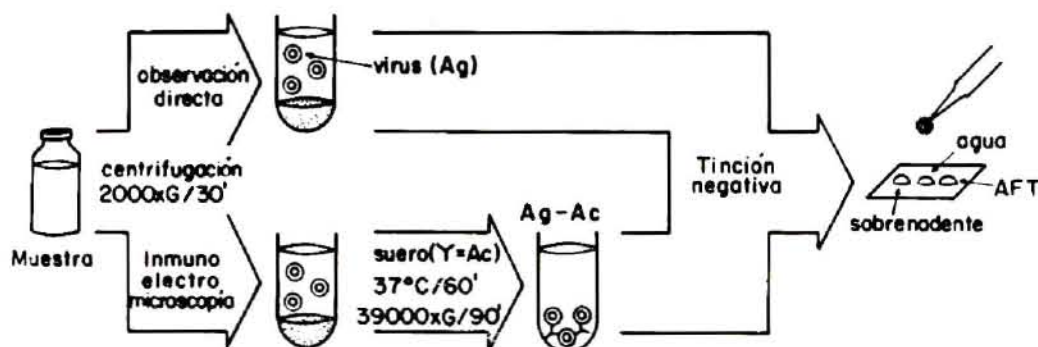


FIGURA 2:

Esquema de preparación de muestras fecales para observación directa al microscopio electrónico y según la técnica de inmunoelectromicroscopía (ver detalles en el texto).

Otra técnica empleada en el estudio de los virus de las diarreas es la inmunoelectromicroscopía (IEM) que consiste en inducir la formación de agregados de partículas virales por aglutinación con anticuerpos, lo que aumenta las posibilidades de descubrir partículas en una muestra dada (1). En el procedimiento se mezcla material fecal y suero convaleciente y se incuba a 37°C durante una hora, Figura 2. La mezcla se centrifuga a 39.000 x G durante 90 minutos y el sedimento se resuspende en 0,1ml de solución amortiguadora de fosfatos. La preparación se coloca sobre rejillas de cobre (200 mesh) recubiertas por "formvar" y se tiñen con ácido

(*) Una brevísima descripción del principio de la microscopía electrónica, que ha permitido este desarrollo en virología se encuentra en el Apéndice.

fosfotúngstico para ser examinadas al MET (16). esta técnica permite también investigar anticuerpos en suero y otros líquidos biológicos, haciendo reaccionar diluciones del suero con el antígeno apropiado, luego examinando las diversas mezclas del mismo modo descrito anteriormente.

La microscopía electrónica ha permitido el descubrimiento de toda una gama de virus, a saber, coronavirus (5), calicivirus (11,23), astrovirus (22), minireovirus (28), agentes de 50 nanómetros (3) y partículas de 27 nanómetros (agentes de Norwalk, Hawaii y Montgomery County) (16, 18).

A pesar de que el problema etiológico de las diarreas ha sido abordado en forma multidisciplinaria utilizando un amplio espectro de técnicas, aún no se han podido identificar los agentes responsables de cierta proporción importante de casos. Esto señala la imperativa necesidad de continuar las investigaciones en este campo, para aclarar más el panorama etiológico de la diarrea y desarrollar nuevos métodos de diagnóstico, control y prevención.

APENDICE

LA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Generalidades

Existen dos tipos de microscopio electrónico de uso común; el de transmisión (Figura 3) y el de rastreo (Scanning)(Figura 4). Ambos tienen una columna con un filamento de tungsteno que genera un haz de electrones que migra por la columna gracias al poder de magnetos que actúan como si fuesen condensadores de luz. Así, el haz es enfocado y concentrado sobre la muestra por un juego de bobinas capaces de crear campos magnéticos de intensidad controlable, equivalentes a "lentes electromagnéticas" (2,27).

Al requerirse un vacío casi perfecto para operar el haz de electrones, las preparaciones a observar deben permanecer en el vacío, lo que limita la microscopía electrónica convencional al estudio de agentes y estructuras muertas o inactivas. Generalmente los materiales biológicos a examinar deben ser fijados y deshidratados en gradientes de alcohol (27). Esto no es preciso en el caso de las partículas virales que se encuentran en el intestino del hombre y de los animales.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION MET (FIGURA 3)

Las muestras para examen al MET deben tener un espesor menor de 800 Amstrong, ya que un grosor mayor dificulta el paso de los electrones y disminuye la nitidez de la imagen.

Los especímenes deben colocarse sobre rejillas de cobre de 3 mm de diámetro recubiertas por una membrana transparente a los electrones, cuya función es servir de soporte al espécimen. La muestra se tiñe con compuestos de metales pesados como el ácido fosfotúngstico (AFT), acetato de uranilo y citrato de plo-

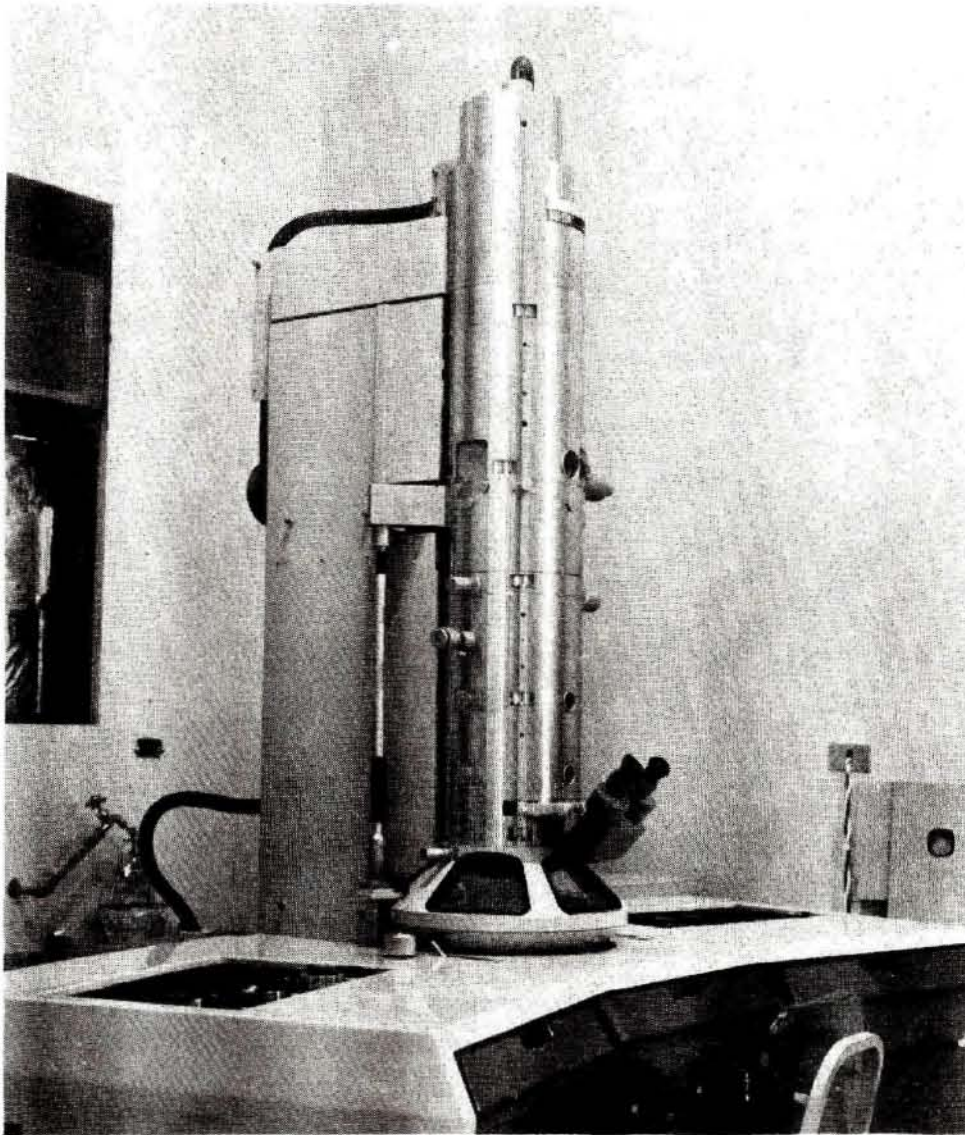


FIGURA 3:

Microscopio electrónico de transmisión Hitachi HU-12A, de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

mo; éstos producen electrodensidad en los sitios donde se depositan, generando oscuridad en la imagen. Así, en una tinción negativa de virus el AFT se deposita alrededor de las partículas o en los espacios que separan los capsómeros, delineando por contraste la forma y estructura del virus (Figura 5).

La magnificación máxima que se obtiene directamente sobre la pantalla de observación es de 500.000 X. Se puede obtener un aumento mayor por ampliación de las microfotografías.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (FIGURA 4)

Se denomina así debido a que el haz de electrones se acciona sobre la muestra en forma continua ("barriendola") generando imágenes cambiantes de naturaleza tridimensional.

Con este microscopio es posible observar muestras hasta de un centímetro cúbico; los especímenes deben recubrirse previamente con un baño iónico de oro que reflejará los electrones y así formará la imagen tridimensional. Esta es captada en una pantalla de televisión que permite apreciar las características de la superficie del espécimen. La magnificación máxima obtenida directamente sobre la pantalla de observación es de 200.000 X.

La microscopía de rastreo ha permitido estudiar la superficie de la mucosa intestinal (Figura 6) y los daños inducidos en ella por agentes virales como los rotavirus.

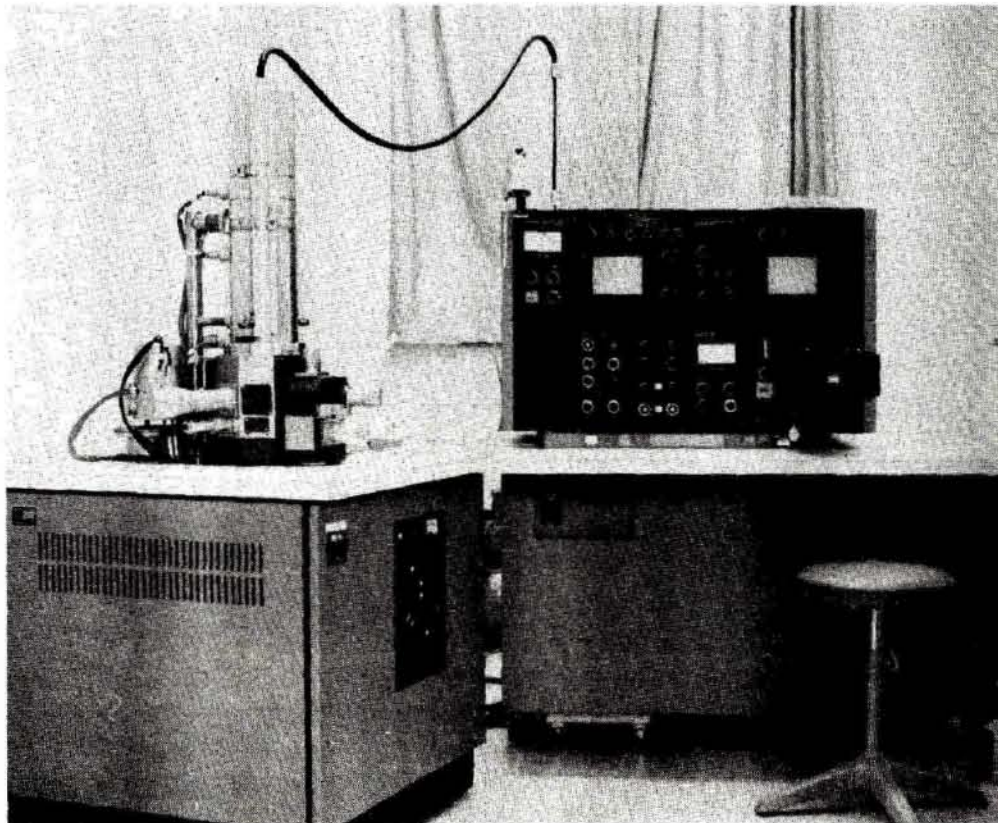


FIGURA 4:

Microscopio electrónico de barrido, Hitachi HHS-24, de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

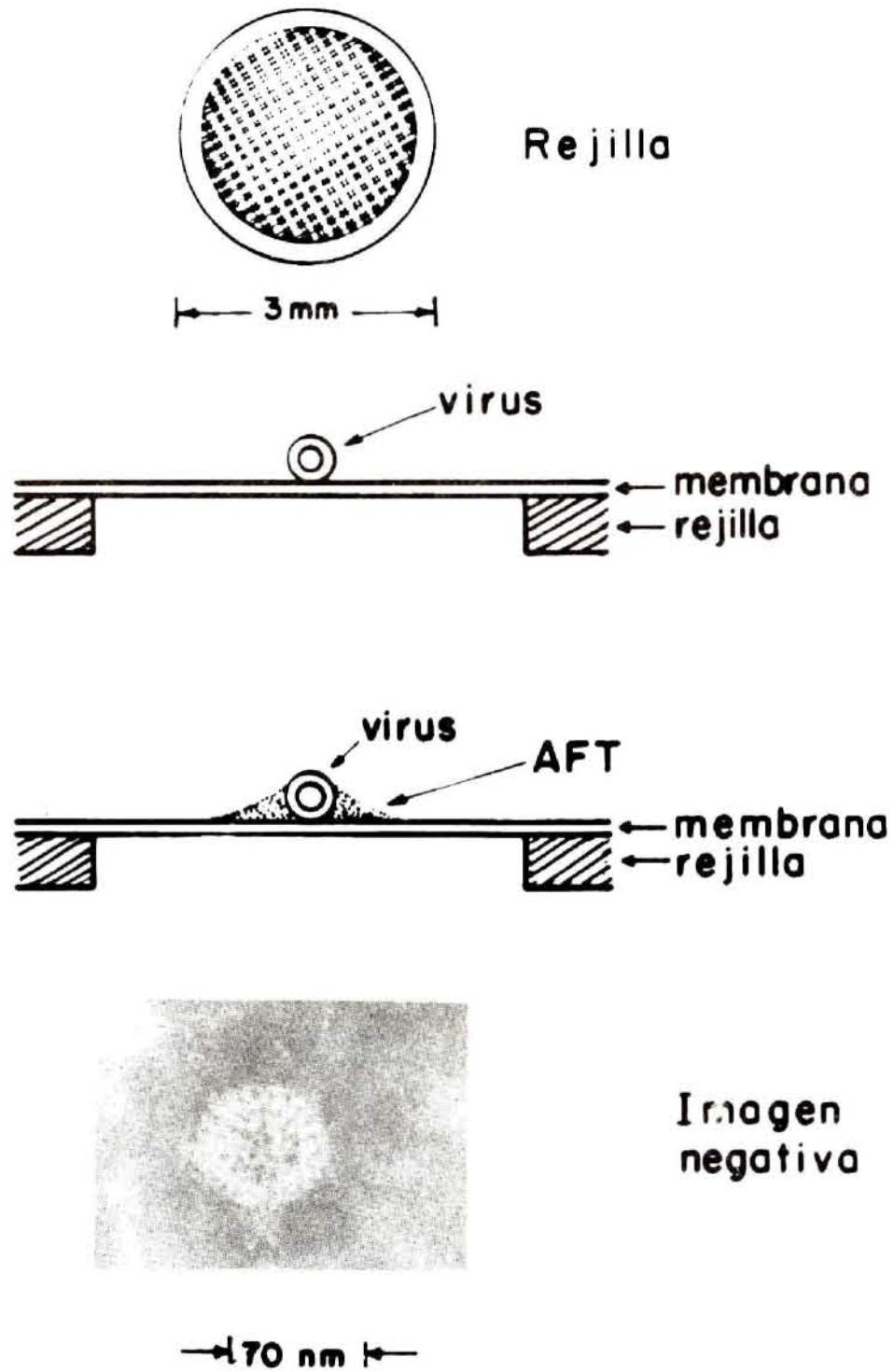


FIGURA 5:

Esquema de preparación de una tinción negativa para rotavirus (ver detalles en el texto).

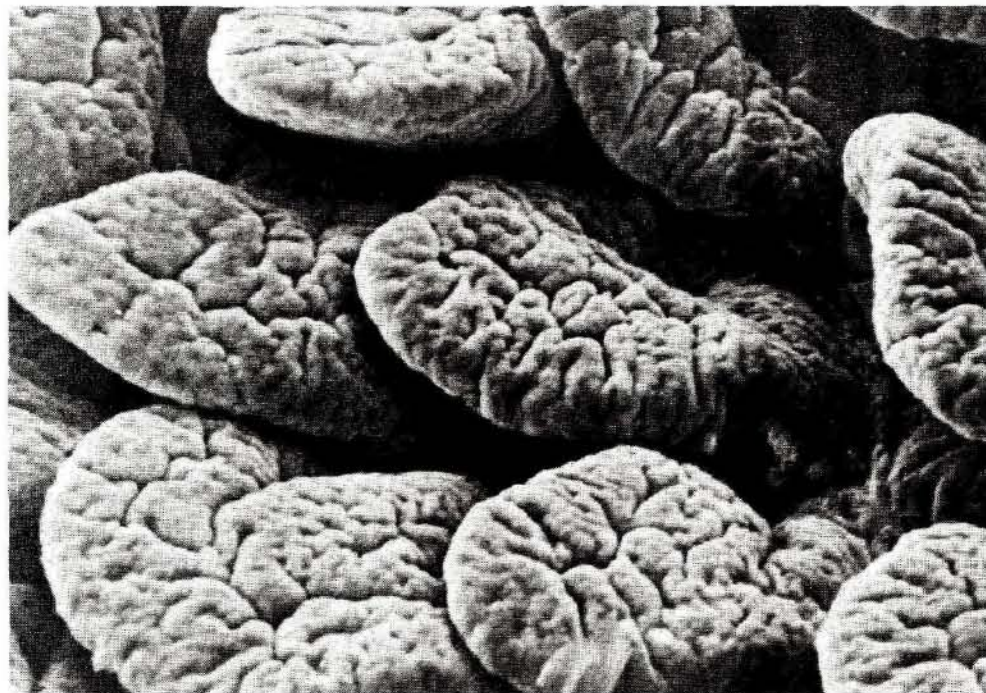


FIGURA 6:

Microscopía electrónica de barrido: mucosa doudenal de ratón normal. Obsérvese las vellosidades intestinales lingüiformes. Magnificación original 200x.

RESUMEN

Se revisan sucintamente los conceptos existentes sobre la etiología viral de las diarreas.

Antes de 1973, estudios epidemiológicos señalaron la posible participación de virus en la causalidad de las diarreas. El desarrollo de los histocultivos permitió demostrar el papel etiológico de echovirus, coxsackievirus y adenovirus en ciertas diarreas.

Después de 1973, por la microscopía electrónica de transmisión se descubrieron los rotavirus, así como toda una gama de agentes virales asociados a cuadros diarreicos de tipo epidémico o endémico. Entre ellos han sido mejor descritas las partículas de 27 nanómetros (agentes de Norwalk, Hawaii y Montgomery County), los coronavirus, minireovirus, calicivirus, astrovirus y agentes de 50 nanómetros.

Se describen brevemente las técnicas de microscopía electrónica que han permitido el diagnóstico de virus entéricos, incluyendo ciertas adaptaciones o modificaciones a las condiciones locales.

SUMMARY

Concepts concerning the viral etiology of diarrheal disease are briefly reviewed. Prior to 1973, several studies indicated the possible participation of viruses in the causation of diarrhea. As a result of the development of tissue culture techniques, the etiologic role of echovirus, coxsackievirus and adenovirus was advanced. After 1973, transmission electron microscopy allowed discovery of rotavirus and other particles in feces of patients with diarrheal disease of endemic and epidemic nature. The list of viruses now comprises, in addition to rotaviruses, 27 nm particles, coronaviruses, minireovirus, calicivirus, astrovirus and 50 nm agent.

The techniques employed in the diagnosis of enteric viruses by electron microscopy are described, including their adaptation to local conditions.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, del Ministerio de Salud de Costa Rica y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica. Se agradece al doctor Yoshimichi Kozuka la colaboración prestada. Para los estudios se utilizaron las facilidades de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida, J. D. & A. P. Waterson
The morphology of virus-antibody interaction.
Advan. Virus. Res. 15:307, 1969.
2. Black, J. T.
The scanning electron microscope: operation principles. En: *Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications* Vol. 1. Hayat, M. A. (editor) Van Nostrand Reinhold Company, p. 1, 1974.
3. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes & B. J. Ruck
Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281, 1973.
4. Bryden, A. S., R. E. Hadley, H. A. Davies, T. H. Flewett, C. A. Morris & P. Oliver
Rotavirus enteritis in the West Midlands during 1974. *Lancet* 2: 241, 1974.
5. Caul, E. O., W. K. Paver & S. K. R. Clarke
Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet* 1, 1192, 1975.
6. Davidson, G. P., R. R. W. Townley, R. F. Bishop, I. H. Holmes & B. J. Ruck
Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 242, 1975.
7. Enders, J. F., T. H. Weller & F. C. Robbins
Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109: 85, 1949.
8. Felici, A., I. Archetti, F. Russi, C. Bellocchi & F. Mazzi
Contributo allo studio delle malattie da virus Coxsackie-manifestazione epidemica ad impronta diarroica causata da un virus coxsackie tipo B-3. *Riv. Inst. Sieroterap. Ital.* 35: 377, 1960.
9. Flewett, T. H., A. S. Bryden & H. Davies
Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497, 1973.
10. Flewett, T. H., A. S. Bryden & H. Davies
Diagnostic electron microscopy of faeces I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J. Clin. Path.* 27: 603, 1974.
11. Flewett, T. H. & H. Davies
Calicivirus in man. *Lancet* 1: 311, 1976.

12. Gordon, I., H. S. Ingraham & R. F. Korns
Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J. Exp. Med.* 86: 409, 1947.
13. Gordon, J. E., M. Béhar & N. S. Scrimshaw
La enfermedad diarreica aguda en los países en vías de desarrollo. I. Base epidemiológica de su control. En: *Control de las infecciones entéricas. Discusiones técnicas XIV Reunión del Consejo Directivo de la O.P. S.* p. 6, 1964.
14. Hernández, F., L.J. Mata, Cecilia Lizano & E. Mohs
Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica. *Acta Méd. Cost.* 20: 297, 1977.
15. Hodes, H. L.
American Pediatric Society presidential address. *Pediat. Res.* 10: 201, 1976.
16. Kapikian, A. Z., G. R. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalika & R. M. Chanock
Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10: 1075, 1972.
17. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, W. L. Cline, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, W. J. Rodríguez, D. A. Sack, R. M. Chanock & R. H. Parrot.
Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New. Eng. J. Med.* 294: 965, 1976.
18. Kapikian, A. Z., W. H. Kim, R. G. Wyatt, W. L. Cline, R. H. Parrot, R. M. Chanock, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, W. J. Rodríguez, A. R. Kalika & D. H. Van-Kirk
Recent advances in the aetiology of viral gastroenteritis. En: *Diarrhoeal Disease in Childhood. Ciba Foundation Symposium 42 (New Series).* Elsevier-Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam Oxford, New York p. 273, 1976.
19. Kjellén, L., A. Zetterberg & A. Suedmyr
An epidemic among Swedish children caused by adenovirus type 3. *Acta Paediat.* 46: 561, 1957.
20. Klein, J. O., A. M. Lerner & M. Finland.
Acute gastroenteritis associated with Echo virus, type II. *Amer. J. Med. Sci.* 118: 749, 1960.
21. Light, J. S. & H. L. Hodes
Isolation from cases of infantile diarrhea of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *J. Exp. Med.* 90: 113, 1949.

22. Madeley, C. R. & B. P. Cosgrove
28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 451, 1975.
23. Madeley, C. R. & B. P. Cosgrove
Calicivirus, in man. *Lancet* 1: 199, 1976.
24. Mata, L. J., J. J. Urrutia & J. E. Gordon
Diarrhoeal disease in a cohort of Guatemala village children observed from birth to age two years. *Trop. Geogr. Med.* 19: 247, 1967.
25. Mata, L. J., C. Lizano, F. Hernández, E. Mohs, L. Herrero, M. E. Peñaranda, F. Gamboa y J. León.
Agentes infecciosos en la diarrea del niño hospitalizado en Costa Rica. *Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx).* 34: 955, 1977.
26. Mata, L. J., E. Mohs & F. Hernández
Los virus de las diarreas. En: *Enfermedades diarreicas en el niño.* 4a. Ed. Ediciones Médicas Hospital Infantil de México p. 105, 1977.
27. Meek, G. A.
Practical electron microscopy for biologist, 2a. edición. A. Wiley Intersc. Pub., London, Great Britain pp XIX T 528, 1976.
28. Midleton, P. J., M. T. Szymonski & M. Petric
Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Amer. J. Dis. Child.* 131: 733, 1977.
29. Rice, J. L., W. T. Best, S. Frant & H. Abramson
Epidemic diarrhea of the new-born. I. Preliminary considerations on outbreaks of highly fatal diarrhea of undetermined etiology among new-born babies in hospital nurseries. *J. Amer. Med. Ass.* 14: 475, 1937.
30. Steer, H. W.
The pseudomembranous colitis associated with clindamycin therapy a viral colitis. *Gut.* 16: 695, 1975.
31. Weller, T. H.
The application of tissue-culture methods to the study of poliomyelitis. *New Eng. J. Med.* 249: 186, 1953.