



ARTÍCULO ORIGINAL

Aislamiento y diagnóstico de cepas clínicas de enterovirus humanos por métodos convencionales y moleculares

Isolation and diagnosis of clinical human enterovirus isolates by conventional and molecular methods.

Liena de Regla Ponce Rey^{1*}, Orbel Alejandro Marrero Pérez², Lai Heng Hung Ricardo², Danay García Sardiñas², Sonia Resik Aguirre²

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

² Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Cuba

*Autor para correspondencia:
lponce@fbio.uh.cu

RESUMEN

Los enterovirus humanos son la causa más común de meningitis y meningoencefalitis virales, enfermedades del Sistema Nervioso Central. Además, provocan enfermedades agudas y crónicas como la poliomielitis, el Síndrome de Mano, Pie y Boca, la cardiomiopatía dilatada, la conjuntivitis hemorrágica y la diabetes mellitus. La vía de transmisión es oral-fecal o respiratoria. Los causantes de conjuntivitis hemorrágica y exantema son transmitidos por contacto directo o indirecto con secreciones oculares y con fluidos de las vesículas. El diagnóstico confirmatorio en el laboratorio es importante para el manejo de las infecciones provocadas por estos virus. El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar enterovirus humanos por métodos convencionales y moleculares, a partir de muestras provenientes de pacientes con cuadro clínico característico. Se procesaron tres tipos de muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo, heces e hisopado rectal, procedentes de dos pacientes pediátricos con cuadro clínico de síndrome gastroentérico y estado convulsivo y encefalitis, respectivamente. Las muestras se procesaron e inocularon en cultivo de células Vero para el aislamiento viral. El diagnóstico molecular se realizó mediante una RT-PCR semi anidada punto final, previa extracción automatizada del ácido nucleico viral. El aislamiento en el cultivo celular evidenció efecto citopático, indicativo de replicación viral, en las muestras de hisopado rectal y heces, con un 75 y 100% de destrucción de la monocapa celular, respectivamente, a las 72 horas de inoculación. Los cultivos celulares inoculados con líquido cefalorraquídeo no mostraron efecto citopático. El diagnóstico molecular por RT-PCR corroboró la presencia de enterovirus en las muestras de heces e hisopado rectal, así como en el líquido cefalorraquídeo del paciente con estatus convulsivo, coherente con el cuadro clínico mostrado. El empleo simultáneo de técnicas convencionales como el aislamiento en cultivo de células y técnicas moleculares como el PCR, fortalecen, complementan y confirman el diagnóstico clínico de las infecciones de etiología enteroviral.

Recibido: 2020-07-16

Aceptado: 2021-04-07

Palabras clave: cultivo celular, reacción en cadena de la polimerasa, células Vero, meningitis aséptica, meningoencefalitis viral, efecto citopático, líquido cefalorraquídeo, exudado

ABSTRACT

Human enteroviruses represent the main cause of viral meningitis and meningoencephalitis, frequent Central Nervous System diseases. Moreover, they cause acute and chronic diseases such as poliomyelitis, Mouth, Hand and Foot Syndrome, dilated cardiomyopathic, hemorrhagic conjunctivitis and diabetes mellitus. The transmission is oral-fecal and/or respiratory, while those causing hemorrhagic conjunctivitis and exanthema are transmitted by indirect or direct contact with ocular secretions and vesicle fluids. The confirmatory diagnosis is extremely important in order to handle the enteroviral infections. The main objective of this work was to isolate and diagnostic human enterovirus in biological samples from patients with typical signs of enterovirus disease by conventional and molecular methods. **Materials and methods.** Three kind of clinical samples were processed: cerebrospinal fluid, feces and rectal swab from two patients with gastroenteric syndrome and convulsive status and encephalitis respectively. Samples were inoculated in Vero cells. Cell culture was daily observed in order to look for cytopathic effect. The molecular diagnosis was carried out by a semi-Nested RT-PCR previous automatic nucleic acid extraction. The cell culture isolation showed cytopathic effect in cells inoculated with rectal swab and feces at 72 hours post inoculation with a 75 and 100% cell destruction respectively. However, the cell culture inoculated with cerebrospinal fluid did not show CPE. The molecular diagnostic by RT-PCR corroborated the presence of enterovirus in the rectal swab and feces. Furthermore, it showed a positive result in the cerebrospinal fluid of the patient with convulsive status. The simultaneous employment of conventional and molecular techniques such as cell culture and PCR, strengthen, complement and confirm the clinical diagnosis of enterovirus infections.

Keywords: cell culture, polymerase chain reaction, Vero cells, aseptic meningitis, viral meningoencephalitis, cytopathic effect, cerebrospinal fluid, exudate

INTRODUCCIÓN

Los enterovirus humanos son miembros de la familia *Picornaviridae*, género *Enterovirus* (EV) (Adekunle *et al.*, 2014; Zell *et al.*, 2017). Desde el punto de vista estructural son virus pequeños con genoma de ARN (ácido ribonucleico). Este ARN es monocatenario y de polaridad positiva, lo cual significa que actúa como un ARN mensajero que se traduce directamente en una poliproteína viral. El ácido nucleico presenta una cola de poli adeninas en el extremo 3' y en el extremo 5' se encuentra un oligopéptido unido covalentemente (VPg, del inglés *viral protein genome*) (Racaniello *et al.*, 2013). Algunas de las infecciones provocadas por los EV son asintomáticas, sin embargo, otras pueden provocar serios daños a la salud. Los grados de susceptibilidad frente a la infección son diversos, predominando la vulnerabilidad en niños y personas inmunocomprometidas (Pallansch, 2013; Kupila *et al.*, 2006). Estos virus constituyen la causa más común de meningitis virales y meningoencefalitis, enfermedades frecuentes del Sistema Nervioso Central. Además, están involucrados en enfermedades agudas y crónicas, entre las que se incluyen la poliomielitis, el Síndrome de Mano, Pie y Boca, la dermatomiositis, la polimiositis, la cardiomiopatía dilatada, la diabetes mellitus y la conjuntivitis hemorrágica (Pallansch, 2013; Banerjee *et*

al., 2006; Kupila *et al.*, 2006). Los EV se transmiten por las vías oral-fecal o respiratoria. Los causantes de conjuntivitis hemorrágica y exantemas son transmitidos por contacto directo o indirecto con las secreciones oculares o con los fluidos de las vesículas respectivamente.

En la actualidad solo se dispone de vacunas dirigidas contra los PV (poliovirus) y el EV-71 (enterovirus 71) y se carece de fármacos antivirales capaces de prevenir o tratar las enfermedades que provocan el resto de los miembros del género (Yi *et al.*, 2017; Baggen *et al.*, 2018). Por lo que el diagnóstico temprano en el laboratorio se hace necesario y cumple el objetivo de confirmar la existencia de una infección viral y realizar el manejo clínico inmediato de la enfermedad. Una de las misiones del Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" es el diagnóstico de infecciones virales provocadas por enterovirus humanos en muestras clínicas provenientes de pacientes de todo el país. Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo identificar la presencia de enterovirus humanos en muestras clínicas de pacientes con cuadros clínicos de encefalitis, estados convulsivos y trastornos gastrointestinales mediante técnicas convencionales y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Registro de las muestras clínicas

Este procedimiento establece las normas para un adecuado manejo de cada muestra desde su recepción hasta su procesamiento y almacenamiento en el laboratorio, lo cual está establecido y es de obligatorio cumplimiento en los laboratorios de diagnóstico. Para el recibo de las muestras clínicas se verificó el cumplimiento de los criterios de la Guía sobre la Reglamentación Relativa al Transporte de Sustancias Peligrosas del 2009, recomendada por la Organización Mundial de la Salud. De ser cumplidos los requisitos se asigna un número consecutivo a cada muestra en el RT-ENTE-01: Registro de datos clínicos, epidemiológicos y virológicos de los casos recibidos en el laboratorio y a la vez son transcritos en la BD-ENTE-01: Base de datos digital, que consta de los mismos campos que el registro. Los registros son almacenados durante un período de 5 años. Los datos de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de las muestras clínicas registradas en el libro de Entrada de Muestras del Laboratorio de Enterovirus.

Table 1: Data of the clinical samples registered in the Enterovirus Laboratory Sample Entry book.

| Paciente | Edad | Procedencia | Sintomatología | Tipo de muestra |
|----------|---------|------------------------------------|---|--|
| 1 | 5 meses | Hospital "William Soler" La Habana | Síndrome gastroentérico Estatus convulsivo | Hisopado Rectal Líquido cefalorraquídeo |
| 2 | 9 años | Holguín | Encefalitis | Heces Líquido cefalorraquídeo |

Procesamiento de las muestras

Se colectaron 500 µL de líquido cefalorraquídeo en dos frascos estériles. Una de las alícuotas se conservó en congelación a -70°C hasta su análisis mientras la otra se conservó para su permanencia durante un año en el laboratorio después del arribo.

En el caso del hisopado rectal la muestra se homogenizó mediante el uso del vórtex (Stuart Vortex mixer sa8, Sigma Aldrich, Alemania) en el medio de transporte universal y se colectaron 200 µL en un vial. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante colectado se le añadió

cloroformo en una proporción del 10%. Esta mezcla homogenizada fue centrifugada como se describió anteriormente. Se colectó el sobrenadante y se le añadieron 200 µL del antibiótico gentamicina (Gibco® Gentamicin, Sigma Aldrich, Alemania). Una alícuota de la muestra original fue conservada a -70°C, hasta un año después del arribo al laboratorio.

Para el procesamiento de las heces se agregó 1 gramo de la muestra en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de PBS 1X (suspensión al 10%). Se homogenizó durante 1 minuto y se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C en centrífuga modelo MIKRO 220R del grupo Hettich (Alemania). Transcurrido ese tiempo se extrajo el sobrenadante, se colocó en un vial estéril y se conservó a -20°C hasta el momento de realizar la técnica para el diagnóstico.

Diagnóstico de enterovirus humanos mediante aislamiento viral en cultivos de células

Subcultivo de células Vero

Se empleó la línea continua de riñón de mono verde africano normal adulto (Vero, ATCC® CCL- 81™), criada en medio 199 de base Earle (Gibco™) suplementado con suero fetal bovino inactivado (SBFI) al 5% (SIGMA®). El medio de crecimiento celular del frasco de 25 cm² con monocapa confluyente de células fue retirado y se agregaron 5 mL de tripsina por el lado contrario a la monocapa, agitándose cuidadosamente por varios segundos. Se retiró la tripsina y se repitió este paso nuevamente. Posteriormente se agregaron 500 µL de tripsina y se incubó durante 5 minutos en incubadora a 37°C. El medio de crecimiento fue preparado y 1 mL de este se agregó para inactivar la tripsina. La suspensión de células resultante fue distribuida en los frascos correspondientes (Wiley y Doyle, 1998), los cuales se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

Inoculación viral en cultivo de células Vero

Las muestras se inocularon en células Vero con monocapa confluyente. Las alícuotas de las muestras de heces e hisopado rectal previamente procesadas se descongelaron y se les agregaron 50 µL de cloroformo para eliminar cualquier otro agente patógeno como bacterias, hongos y virus envueltos. Estas mezclas se homogenizaron y luego se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomaron 500 µL del sobrenadante resultante para la inoculación. Se extrajo el medio de cultivo de los frascos de 25 cm² y se inocularon 500 µL de la muestra por duplicado.

Se dejó incubar a 37°C durante una hora y posteriormente se agregaron 5 mL de medio 199 de base Earle (Gibco™). Se destinaron controles de células los cuales no se inocularon. La lectura del ECP se realizó a las 16, 24 y 72 horas considerando la pérdida de la monocapa en un 25% (1X), 50% (2X), 75% (3X) y 100% (4X) según el Manual de Laboratorio de Poliovirus de la Organización Mundial de la Salud 2015, del Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus.

Diagnóstico de enterovirus humanos mediante RT-PCR semi-anidada

Extracción automática del ARN viral

Para la extracción del genoma viral se tomaron 140 µL de cada una de muestras previamente procesadas y se colocaron en el equipo de extracción automática QIAcube™. Se utilizó el juego de extracción de QIAGEN® según indicaciones del fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR semi-anidada)

Se amplificó el ácido nucleico viral mediante la técnica de Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-RCP) se mi-anidada (Tabla 2). Se emplearon tres cebadores con las siguientes secuencias: EV-PCR1 (antisentido) 5'- CATTGTCACCATAA-GCAGCA-3', EV-PCR2 (sentido) 5'- TCCTCCGGCCCTGAATGCG -3' y el EV-PCR 3 (antisentido) 5'- ACACGGACACCAAAGTAGTCGGTCC-3' para la amplificación de una región no codificante del extremo 5' del genoma de los enterovirus (5'NTR, del inglés: 5'-nontranslated region) de una extensión de 114 bases nitrogenadas (Tapparel *et al.*, 2009). Para estas reacciones se utilizaron diferentes reactivos como se resume en la Tabla 2.

Se efectuaron 30 ciclos en el termociclador con las siguientes temperaturas para cada reacción: desnaturalización (95°C), unión de cebadores (55°C para los normales y 42°C para los degenerados) y la extensión (70°C los normales o 60°C los degenerados). Se empleó como control negativo agua estéril libre de ARNasa y como control positivo dos muestras clínicas> positivas.

Comprobación de los productos de la amplificación

Los productos de la amplificación se comprobaron en un gel de agarosa al 2%. Para ello previamente se mezclaron 7 µL de cada producto de la reacción o de los controles correspondientes con 3 µL del tampón de corrida (Coral Load a 10x). Para el patrón de peso molecular se aplicaron 5 µL (Patrón VII (Boheringer Mahe-in, DNA leader, Promega, EEUU). Las muestras se hicieron correr a 110 V, 400mA, por 25 minutos en una cámara de electroforesis. Una vez transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta (UVT-02S, Biobase, China). El resultado positivo a la presencia del genoma viral en la muestra se comprobó por la observación de una banda con una talla aproximada de 100 pares de bases.

RESULTADOS

Aislamiento de enterovirus humanos en células Vero

En la Tabla 3 se resumen los resultados de la lectura realizada. En esta se asignaron los porcentos de ECP en función de la magnitud del daño celular .

En las células inoculados (Fig. 1) con el líquido cefalorraquídeo de ambos pacientes no se observó un cambio en la morfología celular. Estas mantuvieron la morfología fibroblástica característica de las células Vero al igual que el control.

Tabla 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) semi-anidada de las muestras clínicas procesadas.

Table 2: Semi-nested Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) of processed clinical samples.

| Volumen | Reacción 1 | Reacción 2 |
|---------|--|-----------------------|
| 5 | Tampón (tris HCl 67mM y pH 8.8, NH4SO4 17mM, EDTA 6µM, MgCl2 2mM, 2-mercaptoetanol, 1mM) | |
| 2 | dNTP | |
| 1 | Cebador EV-PCR2 | |
| 1 | Cebador EV-PCR1 | Cebador EV-PCR3 |
| 1 | Enzima reverso-transcriptasa | Enzima Taq-polimerasa |
| 5/2 | ARN de extracción | ADN de Reacción 1 |
| 29 | Agua para biología molecular (libre de ARNasa) | |

Tabla 3. Resultados de la lectura del efecto citopático de células Vero inoculadas con las muestras clínicas.**Table 3:** Results of reading the cytopathic effect of Vero cells inoculated with clinical samples.

| Muestra inoculada/ Tiempo de lectura del ECP | 16 hrs | 24 hrs | 72 hrs |
|--|--------|--------|--------|
| Control celular | 0 | 0 | 0 |
| Paciente 1 | | | |
| Hisopado rectal | 1x | 1x | 3x |
| Líquido Cefalorraquídeo | 0 | 0 | 0 |
| Paciente 2 | | | |
| Líquido Cefalorraquídeo | 0 | 0 | 0 |
| Heces | 2x | 3x | 4x |
| Control Positivo | 3x | 4x | 4x |

Leyenda: ECP (Efecto citopático), "0": ausencia de ECP, 1X (ECP en el 25 % de la monocapa celular), 2X (ECP en el 50 %), 3X (ECP en el 75 %), 4X (ECP en el 100%).

Por el contrario, en las muestras correspondientes al hisopado rectal y las heces se observó una alteración en la monocapa de células que se caracterizó por el redondeamiento, el aumento de la refringencia y el desprendimiento celular desde las 16 horas posteriores a la inoculación (Fig. 2).

Diagnóstico molecular de las muestras clínicas

El diagnóstico molecular por RT-PCR de las muestras clínicas estudiadas mostró la presencia del genoma amplificado, representado por una banda en las muestras de hisopado rectal y líquido cefalorraquídeo del paciente 1, mientras que para el paciente 2 solo se observó de forma menos intensa en la muestra de heces (Fig. 3).

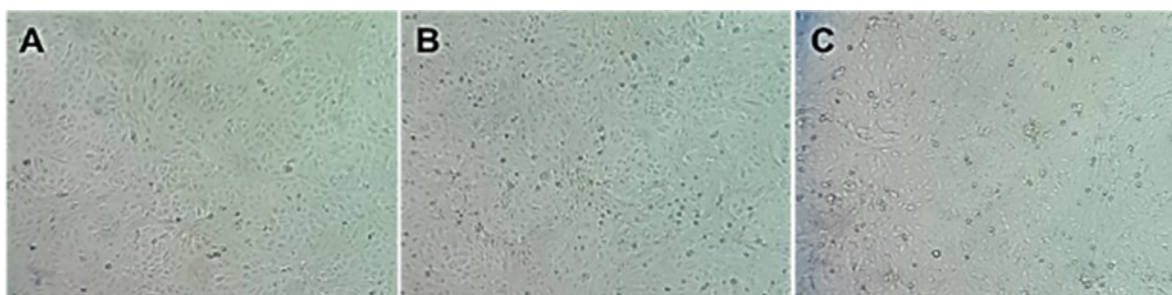


Figura 1. Efecto citopático provocado por la inoculación viral en células Vero. A: control de células. B: líquido cefalorraquídeo paciente 1. C: líquido cefalorraquídeo paciente 2. (Aumento 100x).

Figure 1. Cytopathic effect caused by viral inoculation in Vero cells. A: cell control. B: cerebrospinal fluid patient 1. C: cerebrospinal fluid patient 2. (100x magnification).

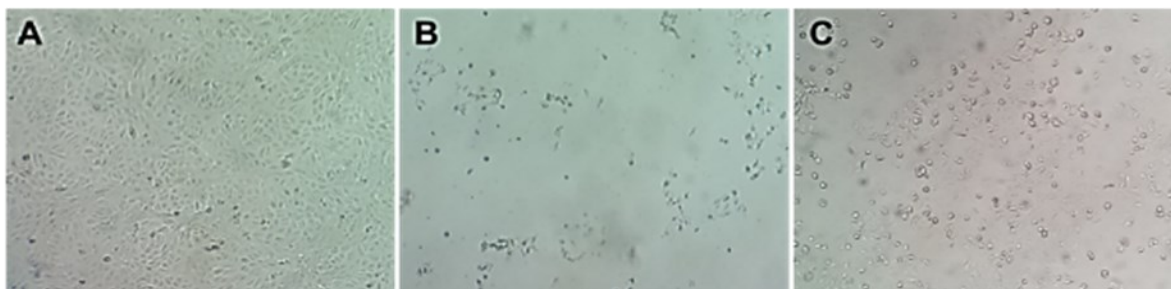


Figura 2. Efecto citopático provocado por la inoculación viral en células Vero a las 24 horas. A: control de células. B: heces del paciente 2. C: hisopado rectal del paciente 1. (Aumento 100x).

Figure 2. Cytopathic effect caused by viral inoculation in Vero cells at 24 hours. A: cell control. B: stool from patient 2. C: rectal swab from patient 1. (100x magnification).

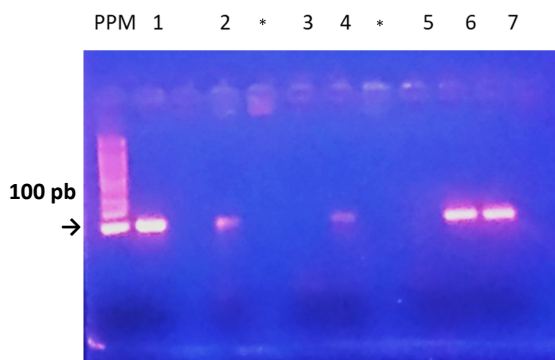


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR semi-anidada. PPM: Patrón de peso molecular, 1: hisopado rectal, paciente 1, 2: líquido cefalorraquídeo, paciente 1, 3: líquido cefalorraquídeo, paciente 2, 4: heces, paciente 2, 5: control negativo (mezcla de PCR), 6 y 7: control positivo. (* pocillos vacíos entre muestras).

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of the semi-nested RT-PCR products. PPM: Molecular weight standard, 1: rectal swab, patient 1, 2: cerebrospinal fluid, patient 1, 3: cerebrospinal fluid, patient 2, 4: stool, patient 2, 5: negative control (PCR mix), 6 and 7: positive control. (* empty wells between samples).

DISCUSIÓN

El diagnóstico virológico es un proceso que permite la identificación del agente etiológico de una infección viral. Se puede realizar mediante el empleo de métodos convencionales y modernos. Entre los que se encuentran: el aislamiento del virus en un cultivo celular; la detección del virus o antígenos por medio de anticuerpos; la detección del material genético del virus. Además se incluyen la secuenciación del genoma y la observación de una muestra por microscopía electrónica (Souf, 2016). Existen virus que solo pueden diagnosticarse mediante biología molecular, pues no son capaces de provocar ECP. Mientras otros son detectados a partir de su inoculación en un cultivo de células (Lipson *et al.*, 2001; Dilnessa y Zeleke, 2017).

Los EV son capaces de replicarse en varias líneas celulares tales como las RD (línea continua de rhabdomyosarcoma humano, ATCC® CCL-136™) (Kok *et al.*, 1998), las L20B (línea murina transgénica que expresa el receptor CD155 de poliovirus) y las células Vero (Sarmiento *et al.*, 2007; Adekunle *et al.*, 2014; Adeniji *et al.*, 2017). Esta última se caracteriza por ser susceptible y permisiva para un gran número de virus. Además, resulta útil para el diagnóstico de virus capaces de provocar un ECP evidente (Dilnessa y Zeleke, 2017).

El diagnóstico de enterovirus mediante el aislamiento viral en cultivos celulares muestra como ventaja adicional la posibilidad de replicar el virus y obtenerlo como virión, es decir como partícula viral infectiva (Nourkhoda *et al.*, 2016). Ello no solo garantiza la conservación de la cepa en el laboratorio, sino que además puede emplearse posteriormente para análisis de secuenciación del genoma o genticotipificación o análisis del serotipo por técnicas inmuno-enzimáticas como el ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) o serológicas como la Neutralización (Hematian *et al.*, 2016).

La inoculación del líquido cefalorraquídeo de ambos pacientes en los cultivos celulares no mostró presencia de ECP. Ello puede deberse a la ausencia de virus en dicha muestra clínica o a la presencia en la misma de una carga viral muy baja, incapaz de afectar la monocapa en el período de observación. En los cultivos celulares la aparición del ECP en células Vero puede tardar entre tres y ocho días si la carga viral es baja (González *et al.*, 2007), mientras en otras líneas celulares como las RD (línea continua de rhabdomyosarcoma humano) y las MRC-5 (células normales de pulmón de feto humano), puede tardar poco más de siete días, en función también de la sensibilidad de estas (Pérez *et al.*, 2003). Todo lo cual requeriría la realización de sucesivas inoculaciones en cultivo de células o pases ciegos para aumentar el título viral. Se sugiere que el mayor número de partículas virales infectivas en los medios intracelular y extracelular se alcanza a las 30 y 40 horas post-infección, respectivamente (Ya-Ching *et al.*, 2017).

Se descarta la posibilidad de que las células Vero empleadas no sean susceptibles y permisivas a la replicación viral puesto que para ambos pacientes sí se observó la presencia de un ECP considerable cuando se inocularon en el cultivo las muestras de heces (paciente 2) e hisopado rectal (paciente 1). Como se observa en la figura 2 en las imágenes B y C, no solo hay presencia de células refringentes y redondeadas sino también se observa un desprendimiento y destrucción total de la monocapa. En el caso de las muestras proveniente de heces es importante tener en cuenta que estas tienden a ser tóxicas aun cuando son previamente procesadas dada la presencia de toxinas producidas por bacterias, por lo que la destrucción de la monocapa también puede estar condicionada por este aspecto y no solo a una carga viral alta (Ramírez *et al.*, 1999).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica específica y sensible. Este elemento, así como la posibilidad de obtener un resultado en pocas horas hacen del

PCR una técnica valiosa para el diagnóstico de enfermedades virales (Mohini y Deshpande, 2010; García *et al.*, 2012; Field, 2013). En este trabajo se empleó un RT-PCR semi-anidada. Consiste en una reacción de amplificación en la que primero ocurre una reverso-transcripción donde se obtiene una molécula de ADN a partir de una molécula de ARN mediante el uso de dos cebadores. Este paso es necesario dado que los enterovirus tienen como genoma una única molécula de ARN de polaridad positiva. Posteriormente se realiza una segunda amplificación del ADN obtenido utilizando uno de los cebadores anteriormente usado y otro que se une a una región más interna de la secuencia diana (Koishi *et al.*, 2010).

El ensayo se considera positivo si se visualiza el producto de amplificación correspondiente con la talla esperada según la secuencia específica, en los tubos de reacción de los controles positivos empleados en la prueba. Mientras que en el control negativo (agua estéril libre de ARNasa), no se visualiza ninguna banda. Las técnicas de diagnóstico molecular como el PCR y la secuenciación revolucionaron el diagnóstico de microorganismos difíciles o imposibles de cultivar, siendo sumamente utilizadas en el diagnóstico de virus con genoma de ADN y ARN. Ofreciendo como ventaja adicional la obtención en menos tiempo de los resultados (De Biasi y Tyler, 2004; Joshi y Deshpande, 2010; Giulieri *et al.*, 2015).

Para el paciente 1 la presencia de una banda en las muestras de hisopado rectal y líquido cefalorraquídeo es coherente con el cuadro clínico de síndrome gastroentérico y estatus convulsivo. Por otro lado, en el LCR del paciente 2 no se detecta el genoma viral y sí en las heces. Esto pudiera explicarse en ambos casos por el hecho de que es en el intestino delgado donde ocurre la mayor replicación viral, por lo cual es mucho más probable detectar el virus en muestras fecales (Chung *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2020).

Un cuadro clínico más severo en el paciente 1 pudiera estar asociado a la presencia de un sistema inmunológico inmaduro o de comorbilidades (Asnet *et al.*, 2014; Wen-Chan *et al.*, 2017). La ausencia de virus en el líquido cefalorraquídeo en el paciente 2 pudiera explicarse porque la infección aún no ha alcanzado las meninges y por ende no presenta un cuadro clínico de meningitis o meningoencefalitis. Si bien una banda ligera puede hacer alusión a la presencia de una carga viral baja en la muestra esto solo puede ser corroborado mediante un PCR cuantitativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan el empleo de las técnicas diagnósticas moleculares como el PCR en combinación con los métodos virológicos convencionales como el aislamiento en cultivo de células.

Una de las ventajas de emplear técnicas de biología molecular es que estas nos permiten comprobar la presencia del agente infeccioso o de su material genético con una gran especificidad y sensibilidad, a lo que se suma la disponibilidad de los resultados en pocas horas (Conca *et al.*, 2016). Algunos autores informan cómo el diagnóstico molecular por PCR en casos clínicos con meningitis y positivos a enterovirus, permitió disminuir los días de hospitalización, el uso de antibióticos, los estudios de laboratorio y los costos de hospitalización en pacientes pediátricos (Ramers *et al.*, 2000). Esta técnica garantiza, ante la gravedad del cuadro, clínico un diagnóstico inmediato y un manejo oportuno de la enfermedad, evitando tratamientos y estudios empíricos. Además, un diagnóstico molecular por PCR puede definir con más claridad el agente etiológico de un cuadro clínico inespecífico (Coronel *et al.*, 2019). Otros autores han comprobado que el ensayo de PCR es ligeramente superior en comparación con el aislamiento en cultivo de células en cuanto a la detección de los EV en muestras de LCR (Machado *et al.*, 2016; Alonso *et al.*, 2017).

La presencia de efecto citopático o destrucción total de la monocapa celular respecto al control celular, en los cultivos celulares inoculados con las muestras de heces e hisopado rectal de dos pacientes con síntomas de estatus convulsivo y encefalitis respectivamente, permitió comprobar la etiología enteroviral de estas enfermedades. El empleo de la técnica del PCR corroboró la presencia de enterovirus humanos en las muestras positivas al aislamiento viral en cultivo de células y permitió comprobar en uno de los casos la presencia del virus en el líquido cefalorraquídeo. Todo lo cual avala el empleo combinado de ambos métodos de diagnóstico para la identificación oportuna de enterovirus humanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, tanto por el método convencional de aislamiento en cultivo de células como el molecular de amplificación del genoma viral, permitieron corroborar la impresión clínica correspondiente a cada paciente. Los métodos convencionales y moleculares representan herramientas útiles que se complementan y permiten realizar un diagnóstico viral certero (Souf, 2016).

LITERATURA CITADA

- Adekunle, J., T. O. Cephas. (2014). Impact of cell lines included in enterovirus isolation protocol on perception of nonpolio enterovirus species C diversity. *J. Virol. Methods.* 207:238-47.
- Adeniji, J. A., M. O. Adewumi, A. O. Oragwa, UE George *et al.* (2017). Preponderance of enterovirus C in RD-L20B-cell-culture-negative stool samples from children diagnosed with acute flaccid paralysis in Nigeria. *Arch. Virol.* 162:3089-101.

- Alonso, N., B. Sagastizabal, L. M. Prieto, S. Guillén *et al.* (2017). Evaluación de una técnica de diagnóstico molecular Xpert EV (Cepheid®) en la meningitis por enterovirus. *An Pediatr (Barc)*. 87(4):201-205.
- Asnet, S. A., A. Petrich, J. S. Hamid., D. Mertz, *et al.* (2014). Clinical severity of rhinovirus/enterovirus compared to other respiratory viruses in children. *Influenza and other respiratory viruses*. 8(4): 436-442.
- Baggen, J., H. T. Jan, J. R. P. M. Strating, F. J. M. van Kuppeveld (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* (6): 368-381.
- Banerjee, I., S. Ramani, B. Primrose, P. Moses, *et al.* (2006). Comparative study of the epidemiology of rotavirus in children from a community-based birth cohort and a hospital in south India. *J. Clin. Microbiol.* 44(7): 2468-74.
- Coronel, I. M., A. Porras, E. M. Rodríguez, B. Croche. (2019). Enfermedad boca-mano-pie atípica infantil con rasgos de eczema herpético y de acrodermatitis. *Arch. Argent. Pediatr.* 117(1): e59-e62.
- Conca, N., M. E. Santolaya, M. J. Farfan, F. Cofré, *et al.* (2016). Diagnóstico etiológico en meningitis y encefalitis por técnicas de biología molecular. *Rev. Chil Pediatr.* 87(1):24-30.
- Chung, P. W., Y. C. Huang, L. Y. Chang, T. Y. Lin, *et al.* (2001). Duration of enterovirus shedding in stool. *J. Microbiol. Infect.* 34(3):167-70.
- De Biasi, R. L., K. L. Tyler (2004). *Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis*. *Clin. Microbiol. Rev.* pp 903-925.
- Dilnessa, T., H. Zeleke. (2017). *Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection*. *J. Microbiol. Modern. Tech.* 2(1).
- García, G., A. Esparza, C. Méndez, G. del Rey, *et al.* (2012). Estandarización de RT-PCR en LCR de pacientes pediátricos con infección del sistema nervioso central por enterovirus. *RIC*. 64(1): 59-61.
- Giulieri, S. G., C. Chapuis, O. M. Olivier, C. Pinget, *et al.* (2015). Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *J. Clin. Virol.* 62: 58-62.
- Joshi, M., J. D. Deshpande. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 5: 81-97.
- Koishi, A. C., D. F. Vituri, P. S. R. Dionizio, A. A. Sasaki; *et al.* (2010). Semi-nested PCR para a detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(6).
- Kok, T. W., T. Pryor, L. Payne. (1998). Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. *J. Clin. Virol.* 11:61-65.
- Kupila, L., T. Vuorinen, R. Vainionpää, V. Hukkanen, *et al.* (2006). Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 66(1):75-80.
- Li, J., C. Lin, M. Qu, L. Xinyu. (2013). Excretion of EV 71 in persons infected with hand, foot and mouth disease. *Virol J.* 10(1): 31.
- Lipson, S. M., D. Kathryn, F. Shaikh, L. Qian (2001). Detection of Pre-cytopathic Effect of Enteroviruses in Clinical Specimens by Centrifugation-Enhanced Antigen Detection; *J. Clin. Microbiol.* 39(8): 2755-2759.
- Machado, B. C., H. R. Vieira, M. R. M. Alves, R. C. C. Carmona. (2016). Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por Enterovirus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo*. 75:1695.
- Mohini, J., J. D. Deshpande. (2010). Polymerase Chain Reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 1(5): 81-97.
- Monteiro, C. R., J. A. Monteiro, R. Machado, J. Lima, *et al.* (2020). Enterovirus detection and serotyping of fecal material collected from three children living on the outskirts of Belém City, Amazon region, Brazil, during the first three years. *J. Med. Virol.* 92(8): 1075-1084.
- Nourkhoda, S., M. Reza, T. Morovat, N. Abbas, *et al.* (2016). Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Ali Hematiana, Osong Public Health Res Perspect.* 7(2): 77-82.
- Pallansch, M., M. Oberste, L. Whitton. (2013). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enterovirus. En: Knipe D, Howley P, Griffin D, *et al.* (Eds.). *Fields Virology*. Sixth ed. pp: 490-530. Pa: Lippincott Williams and Wilkins Publisher. Philadelphia.
- Pérez, M., J. M. Navarro, E. Palacios del Valle, M. Rosa. (2003). Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by shell-vial assay. *J. Med. Microbiol.* 52:789-791.
- Racaniello, V. R. (2003). Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe, D. y Howley, P. (Eds.) *Fields Virology*. Sixth ed. pp: 453-89. Lippincott Williams and Wilkins Publisher. Filadelfia.
- Ramers, C., G. Billman, M. Hartin, S. Ho, *et al.* (2000). Impact of diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA*. 283:2680-5.
- Ramírez, M., L. Morier, J. Alonso, L. Bravo, *et al.* (1999). *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 51(3):152-5.
- Sarmiento, L., P. Más, R. Palomera, L. Morier, *et al.* (2007). Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells. *Rev. Cubana Med. Trop.* 59(2):98-101.
- Souf, S. (2016). Recent advances in diagnostic testing for viral Infections. *Bioscience Horizons*. Vol. 9.
- Tapparell, C., S. Cordey, S. Van Belle, L. Turin, *et al.* (2009). New Molecular Detection Tools Adapted to Emerging Rhinoviruses and Enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 47(6): 1742-1749.
- Wen-Chan, H., S. Wen-Liang, Y. Shung-Cheng, Y. Ting-Yu, *et al.* (2017). Predicting severe enterovirus 71 infection: Age, comorbidity and parental behavior matter. *J. Microbiol. Immunol.* 50(1):10-16.
- Wiley, A. Doyle, A. (1998). *Cell and Tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. Griffiths, J. Brayan (Eds.).
- Ya-Ching, L., W. Cheng-Nan, S. Shin-Ru, H. Mei-Shang. (2017). Characterization of a Vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate. *Vaccine* 20: 2485-2493.
- Yi, E.J., Y.J. Shin, J. H. Kim, T.G. Kim *et al.* (2017). Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 6, 4-14.
- Zell, E., Gorbalenya A. E., Hovi T., King A. M. Q., Knowles N. J., *et al.* (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 98(10):2421-2422.

