

Los enterovirus se incluyen dentro de la familia *Picornaviridae* (pico: pequeño, RNA virus), que consta de cuatro géneros. Dos de éstos afectan sólo a los animales (*Cardiovirus* y *Aphovirus*) y los otros son importantes patógenos humanos: *Rhinovirus* y *Enterovirus*. El virus de la hepatitis A fue originalmente clasificado como Enterovirus tipo 72, aunque actualmente ha sido separado del grupo, siendo considerado un género aparte denominado *Hepatovirus* (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los enterovirus humanos.

Poliovirus: tipos 1-3
Coxsackievirus A: 23 tipos, A1-A24 (el Coxsackie 23 es conocido como Echovirus 9)
Coxsackievirus B: tipos B1-B6
Echovirus (<i>Enteric Cytopathogenic Human Orphan</i>): 31 tipos
Enterovirus tipos 68-71: previamente clasificados como Echovirus o Coxsackievirus

Los enterovirus comparten gran número de características clínicas, epidemiológicas y ecológicas, así como ciertas propiedades físicas y químicas. Difieren entre sí por el distinto comportamiento en cultivo, antigenicidad y ciclo replicativo aunque, en todos los casos, el hábitat común y el lugar de replicación es el tracto intestinal humano.

Se conocen más de 70 serotipos que causan infecciones, muchas veces clínicamente inaparentes, pero que, en un pequeño porcentaje de casos, dan lugar a enfermedades graves del sistema nervioso central, como la meningitis aséptica, encefalomielitis, ataxia cerebelar, síndrome de Guillain-Barré, mielitis transversa y poliomielitis, entre otras. Aunque determinados enterovirus se asocian con frecuencia a brotes epidémicos, dando lugar a un síndrome específico, los mismos serotipos pueden, en otras ocasiones, ser responsables de infecciones esporádicas, con distintas manifestaciones clínicas, incluso 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 diagnóstico.

La poliomielitis es una infección aguda que afecta de forma grave al SNC, con destrucción de las neuronas motoras de la médula espinal, dando lugar a una parálisis flácida. Los virus Coxsackie tipo A producen una variedad de enfermedades que incluyen la meningitis aséptica, herpangina, mialgia epidémica (pleurodinia o enfermedad de Bornholm), síndrome mano-pie-boca, miocarditis, pericarditis, neumonía, exantema cutáneo y resfriado común. Se han relacionado también con malformaciones congénitas y algunas formas de diabetes.

Existen evidencias de que las infecciones por virus Coxsackie del grupo B juegan un papel importante en la etiología de la diabetes mellitus dependiente de insulina (DM-1). Algunos estudios post-mortem de pacientes con cetoacidosis diabética han relacionado a determinados virus de este grupo con esa patología, particularmente el virus Coxsackie B4. Aunque parece posible su implicación en desarrollo de la DM-1, queda por determinar si inician los procesos que dan lugar a la diabetes o bien precipitan la enfermedad en aquellos pacientes con la función endocrina ya dañada. También se ha relacionado a los virus Coxsackie B4, B5 y del grupo A con la pancreatitis en los adultos.

Por último, existe una vasta miscelánea de cuadros clínicos en los que se ha implicado a los enterovirus. El síndrome de fatiga crónica, caracterizado por una debilidad del músculo esquelético, acompañada de mialgias, cefaleas, dificultad de concentración, parestesias, etc., se ha asociado con múltiples agentes etiológicos víricos, siendo los enterovirus uno de ellos. La meningitis aséptica, ciertas enfermedades febriles con o sin exantema cutáneo y el resfriado común también se relacionan con los Echovirus. El enterovirus tipo 68 causa infección de vías respiratorias bajas; el enterovirus tipo 70 es el agente de epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda y el enterovirus tipo 71 causa meningitis aséptica, encefalitis y síndrome mano-pie-boca (Tabla 2).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas asociadas con los distintos tipos de enterovirus.

Grupo	Manifestación clínica
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

MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA. PROPIEDADES FÍSICAS

Los enterovirus presentan una cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura; tienen un tamaño pequeño (20-30 nm), poseen RNA de cadena única y polaridad positiva, por lo que se replican utilizando el propio RNA como mensajero. Su genoma se divide en 4 regiones que codifican proteínas estructurales y 2 regiones no codificadoras, reguladoras. Sus cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína VPg. Dentro de cada grupo, existe un número de serotipos definidos por los epítomos de la cápside que se deben a modificaciones estructurales de la superficie del virión. Los epítomos antigénicos, que definen a cada serotipo, estimulan la formación de anticuerpos específicos que se comportan como neutralizantes de la infección, ya que no permiten su unión al receptor celular. La evolución de los serotipos sigue un proceso de deriva antigénica, en el que durante el proceso de copia del genoma se producen errores que introducen mutaciones puntuales. Estas mutaciones son acumulativas y modifican progresivamente la estructura de la cápside.

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 (Poliovirus), el hígado o el intestino. Son resistentes a todos los antivíricos y quimioterápicos conocidos, y a la inactivación por solventes de lípidos. Presentan una tendencia natural a la agregación espontánea que los defiende del efecto de los agentes externos. Se inactivan rápidamente a más de 50°C, por la luz ultravioleta y en condiciones de desecación. Son estables a pH ácido, característica que los diferencia de los *Rhinovirus*.

EPIDEMIOLOGÍA

El hombre es el único reservorio conocido y la transmisión es, fundamentalmente, por vía fecal-oral y respiratoria. Se dan casos de transmisión por fómites o moscas, 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. Pueden presentarse en forma endémica o en brotes epidémicos, siendo más frecuente en verano y otoño, en niveles socioeconómicos bajos y en lactantes y niños (más frecuente en varones).

La poliomielitis grave ocurría en los países industrializados antes de la introducción de los programas de vacunación. El objetivo 5 de la estrategia de "Salud para todos en el año 2000" de la OMS plantea la erradicación mundial de la poliomielitis, para lo que dicho organismo ha elaborado un "Plan de actuaciones para la consecución del Certificado de Erradicación de la Poliomielitis", en el que España participa dentro del grupo europeo. Las actuaciones que dicho grupo considera necesarias para la consecución de dicho certificado son: a) implantar un sistema de vigilancia eficaz de la parálisis flácida aguda, b) alcanzar y mantener altas coberturas de

vacunación, c) organizar un sistema de vigilancia ambiental, d) realizar un estudio seroepidemiológico que valore el estado inmunitario de la población frente al virus de la poliomielitis. Estas cuatro actuaciones se están llevando a cabo en España desde 1997.

PATOGENIA

El virus penetra en el organismo por vía oral o nasofaríngea, con un periodo de incubación que oscila entre 2 y 30-40 días. Se multiplica localmente en el tejido linfoide de la faringe y las placas de Peyer y después se disemina por vía sanguínea a otros tejidos diana, como la piel, miocardio, meninges, páncreas, etc., en donde se replica. Los síntomas pueden ser el resultado directo de la destrucción de células diana en los tejidos (como ocurre en la poliomielitis), o puede deberse a la respuesta inmune frente al virus (como ocurre en el modelo murino de miocarditis por virus Coxackie tipo 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). Las personas con un déficit de la inmunidad humoral tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad paralítica cuando se utiliza para su vacunación la vacuna de antipolio oral con virus atenuados (Sabin, OPV), siendo recomendable en esta situación el empleo de la vacuna parenteral de virus inactivados (Salk, IPV).

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Aislamiento vírico e identificación

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 se deben remitir muestras de heces (o torunda rectal), o bien un exudado faríngeo. En el caso de la meningitis aséptica debe remitirse LCR, aunque en la fase aguda de la infección se puede detectar el virus también en plasma. Asimismo, se puede aislar de fluidos vesiculares, orina, exudado conjuntival y secreciones nasales. Se recomienda el envío conjunto de muestras de LCR, exudado faríngeo y heces, ya que aumenta el porcentaje de aislamiento. La excreción es con frecuencia intermitente; por tanto, debe recogerse más de una muestra en un intervalo de 24-48 h. Dicha excreción comienza a los pocos días de la infección y puede mantenerse semanas o incluso meses, excepto en el caso de los Echovirus, donde rara vez excede de un mes. El aislamiento a partir del exudado faríngeo es posible durante la fase aguda de la infección, especialmente en los casos con síntomas 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. Las muestras se transportan refrigeradas a 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.

Se puede realizar un diagnóstico presuntivo de infección enteroviral sobre la base del cuadro clínico, época del año, línea celular que permite el aislamiento vírico y efecto citopático asociado. Esta identificación preliminar, sin esperar el tipo específico de virus, tiene utilidad en estudios de salud comunitaria, para no administrar tratamiento antibiótico innecesario y para racionalizar las pruebas diagnósticas a utilizar con posterioridad.

El aislamiento de un enterovirus únicamente a partir de heces, no indica necesariamente que sea el agente etiológico de la infección, pues estos virus pueden excretarse asintómicamente durante bastante tiempo; asimismo, en el caso de los poliovirus, puede tratarse de un virus vacunal si el paciente ha sido vacunado hace poco o ha tenido contacto con alguna persona vacunada. De ahí que sea importante la identificación de los serotipos.

La mayoría de los serotipos más habituales de enterovirus citopáticos crecen bien en células de riñón de mono, aunque este tipo celular no se usa actualmente en los laboratorios de diagnóstico virológico debido a la dificultad de obtención. Por esta razón, si se quiere recuperar el máximo de tipos posibles, se deben inocular las muestras clínicas en distintas líneas celulares, y así aumentar la frecuencia y rapidez de recuperación de enterovirus en las muestras clínicas. Para detectar los virus Coxsackie A es necesaria la inoculación en ratones recién nacidos, ya que en las líneas celulares se multiplican mal, o no lo hacen.

Los cultivos celulares más sensibles son las líneas WI-38 (pulmón embrionario humano), HEK (riñón embrionario humano) y RD (rhabdomyosarcoma humano). 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 despegamiento del frasco de cultivo. No deben considerarse únicamente estas características citopáticas como la base para la identificación, ya que puede confundirse con efectos tóxicos sobre el cultivo, e incluso es semejante al producido por la toxina de *Clostridium difficile*.

Algunas veces, el efecto citopático no es claramente visible en ciertos tipos celulares como las células Vero o los fibroblastos humanos, pero la realización de una tinción inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales específicos permite su identificación, de ahí que sea recomendable hacerlo antes de descartar un cultivo como negativo. La centrifugación aumenta la posibilidad de recuperación vírica, así como la rapidez de aparición del efecto citopático.

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 sí tiene un claro interés epidemiológico. Para la mayoría de los enterovirus, la identificación específica se realiza mediante la neutralización, aunque también se utilizan otros tipos de técnicas como la hemaglutinación indirecta (HIA) y la fijación del complemento (FC). La inmunofluorescencia (IF) es actualmente la forma más sencilla y rápida de tipificación de los enterovirus.

La prueba de neutralización se basa 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.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es que ciertas cepas presentan agregación de partículas víricas u otros factores que reducen el contacto del virus con el anticuerpo. La fracción no neutralizable puede ser debida a partículas víricas recubiertas entera o parcialmente de material proveniente de la membrana celular, que incrementa la tendencia a agregarse del virus y lo hace menos accesible a la neutralización. Ésta puede mejorarse con tratamientos físicos y químicos de la muestra. La filtración a través de una membrana de porosidad apropiada consigue eliminar la fracción no neutralizable, pero la recuperación no siempre es óptima. Los tratamientos químicos con desoxicolato sódico, éter o cloroformo también mejoran el contacto virus-anticuerpo, por disgregación de las partículas virales, siendo de elección el tratamiento con cloroformo para las suspensiones víricas de bajo título. 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. Sin embargo, la laboriosidad de la técnica de neutralización y la aparición de otros métodos más sencillos (como la IF) ha hecho que se utilice cada vez menos en los laboratorios de diagnóstico virológico. También se utilizan para identificar serotipos la HIA y la FC, aunque sólo un tercio de los diferentes enterovirus son capaces de aglutinar los hematíes, y no todos pueden ser identificados por FC, por lo que han caído en desuso.

Las técnicas inmunofluorescentes que detectan antígenos víricos son las más utilizadas por su rapidez y sencillez. Actualmente, existen disponibles antisueros contra el antígeno común de los enterovirus, que sirven de cribado inicial. Si es positivo, se realiza una segunda técnica de IF con antisueros comunes de los virus Coxsackie A y B, Echovirus y Enterovirus 68-71. Por último existen también antisueros específicos de tipo que permiten fácilmente su reconocimiento individualizado.

Detección de anticuerpos específicos

Las técnicas serológicas deben considerarse como un arma diagnóstica adicional. La detección de anticuerpos específicos de tipo sólo deberían realizarse: a) si se dispone del aislamiento de un enterovirus y es necesaria la confirmación del serotipo infectante, b) cuando en un cuadro clínico puedan estar implicados varios enterovirus de un mismo grupo (v. g., pleurodinia por Coxsackievirus del grupo B), c) ante un brote epidémico causado por un serotipo determinado, y d) en estudios seroepidemiológicos.

Seroneutralización. La técnica recomendada, y considerada de referencia, es la seroneutralización. Se necesitan muestras pareadas, la primera tomada tan precozmente como sea posible durante en el curso de la infección, y la segunda 3-4 semanas después. Los sueros de la fase aguda y convaleciente se estudiarán simultáneamente, utilizando varias diluciones del suero frente a una cantidad constante de virus. El título se calcula sobre la base de la dilución de suero que es capaz de neutralizar una cantidad dada de virus. Se consideran significativos de una infección reciente aquellos incrementos de al menos cuatro veces respecto del título basal. Los títulos de anticuerpos neutralizantes pueden ya ser elevados en el comienzo de la fase sintomática, haciendo difícil la interpretación de resultados en una muestra única. Si el título es igual en las dos muestras apareadas, no es posible discernir si la infección se ha producido recientemente o mucho tiempo antes, ya que los anticuerpos neutralizantes persisten durante años, cuando no de por vida.

Fijación del complemento (FC). Inicialmente se realiza la FC con un antígeno común de enterovirus; si el resultado es positivo, se debe repetir la técnica utilizando antígeno de los distintos grupos. Los anticuerpos FC aparecen durante el curso de la infección, pero pueden desaparecer o caer a niveles bajos en pocos meses; si se obtienen las muestras en momentos apropiados, es posible aumentar la utilidad diagnóstica de la FC. Pueden aparecer reacciones cruzadas entre los distintos enterovirus, que hacen a ésta técnica poco específica de serotipo.

Hemaglutinación. Relativamente fácil de realizar, los pacientes que son infectados con un enterovirus hemaglutinante desarrollan anticuerpos homotípicos que pueden persistir años, aunque también pueden producirse anticuerpos heterotípicos que hacen que la prueba pierda especificidad.

Inmunofluorescencia indirecta. Es posible detectar y titular anticuerpos usando una técnica de inmunofluorescencia. Se trata de métodos sencillos que están teniendo cada vez un uso mayor en los laboratorios diagnósticos, ya que permite la detección separada de los anticuerpos IgG e IgM. Si sólo se dispone de una muestra, la detección de anticuerpos específicos de la clase IgM puede ser útil para identificar infecciones recientes.

Hemaglutinación pasiva. Es un método que permite detectar elevaciones en el título de anticuerpos frente a los enterovirus. Existe reactividad cruzada y los serotipos no pueden distinguirse, aunque la prueba puede servir de cribado para diagnosticar una infección por enterovirus.

Enzimoimmunoanálisis (ELISA). Permite medir la respuesta sérica de los distintos tipos de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG; sin embargo no, está establecido su uso en el diagnóstico de las infecciones enterovirales. Se ha empleado para detectar IgG específicas, que aparecen generalmente siete días después del establecimiento de los síntomas. Más recientemente se han desarrollado técnicas de captura que permiten detectar IgM específica de los virus Coxsackie grupo A y B y algunos Echovirus. Aunque existe reactividad cruzada, suele reflejar una infección enteroviral reciente.

Detección de genoma (PCR)

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 PCR, aporta rapidez, aumento de sensibilidad y posibilidad de detección de todos los enterovirus, por lo que, aunque está actualmente en evaluación, resulta muy recomendable en los laboratorios de Virología. Así, Andréoletti *et al.* (1998), detectan un 22% de muestras de LCR positivas, frente a un 2,3% por cultivo. Recomiendan realizar la PCR en LCR y suero para aumentar la sensibilidad diagnóstica.

Gorgievski-Hrioshko *et al.* (1998) obtuvieron una diferencia significativa entre el porcentaje de diagnóstico etiológico por PCR (85%) frente a un 24% por cultivo en muestras de LCR procedentes de pacientes con meningitis aséptica. Estos autores, además, cultivaron muestras de heces y de exudado faríngeo, asemejándose más el porcentaje diagnóstico al obtenido por la PCR (71% vs 85%).

Existen varios métodos comercializados, aunque el más evaluado y con buena rentabilidad diagnóstica (Roche Amplicor) ha sido

momentáneamente retirado del mercado. Recomendamos que, debido a las posibilidades diagnósticas que ofrecen estos métodos, sean utilizados en todos aquellos laboratorios con experiencia en técnicas de biología molecular.

BIBIOGRAFÍA

Andréoletti L, Blasel-Damman N, Dewilde A, Vallée L, Cremer R, Wattré P. Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36:589-591.

Gorgievski-Hrisoho M, Schumacher Jd, Vilimonovic N, Germann D, Matter L. Detection by PCR of enterovirus in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2408-2412.

Melnick JL. Poliovirus and other enteroviruses. En: Evans AS, Kaslow RA (eds). *Viral infections of humans. Epidemiology and control* (4ªed). Plenum Medical Book Company. New York, 1997, pp. 583-663.

Minor PD, Morgan-Capner P, Schild GC. Enteroviruses. En: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR (eds). *Principles and practice of clinical virology* (3ª ed). John Wiley and Sons. London, 1994. 3ª ed.. pp. 417-466.

Schunrr D. Enteroviruses. En: Lennette ET (ed). *Laboratory diagnosis of viral infections* (2ª ed). Marcel Dekker. New York, 1992, pp. 351-364.