

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: LA NECESIDAD DE UNA IMAGEN EN EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

### ELECTRONIC MICROSCOPY: THE NEED FOR IMAGE IN VIROLOGICAL DIAGNOSIS

Giordano M.O.<sup>1</sup>, Ferreyra L.J.<sup>1,2</sup>, Martínez L.C.<sup>1</sup>, Isa M.B.<sup>1</sup>, Pavan J. V.<sup>1,2</sup>, Nates S.V.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar y recalcar, desde un caso clínico de gastroenteritis aguda, la importancia de la microscopia electrónica en la rápida caracterización y diagnóstico diferencial de varios agentes virales que no habían sido previamente considerados y que además en el laboratorio presentaron luego resultados discrepantes. Fue estudiada por microscopia electrónica la materia fecal de un niño con gastroenteritis aguda. La microscopia electrónica reveló una coinfección por virus de la familia *Adenoviridae* y *Reoviridae*.

La muestra fue luego positiva para el antígeno de rotavirus por inmunocromatografía (ICA) y un enzimoimmunoensayo (EIA) con configuración monoclonal y negativa con un enzimoimmunoensayo policlonal, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y reacción de polimerasa en cadena. La muestra fue positiva para adenovirus por ICA y tipificada como 40/41 por EIA. Finalmente se reveló por PAGE un patrón electroforético correspondiente a reovirus. La imagen de microscopia electrónica señala sin cuestionamientos la presencia de un agente de la familia *Reoviridae* en una muestra con resultados inciertos por ensayos inmunoenzimáticos y moleculares. De este modo la microscopia electrónica caracterizó una coinfección viral muy poco frecuente.

Palabras claves:

#### SUMMARY

Using a clinical case of acute gastroenteritis, the aim of this study was to determine the importance of electronic microscopy in the characterization and differential diagnosis of viral agents that had not been considered before and had shown discrepant results in the laboratory.

One fecal sample was collected from a child with acute gastroenteritis. The electronic microscopy showed co-infection by viruses from *Adenoviridae* and *Reoviridae*. The sample was positive for rotavirus antigen by one-step membrane test based on immunochromatographic assays (ICA) and enzyme immunoassays (EIA) monoclonal test and it was negative by an EIA polyclonal test, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and polymerase chain reaction. On the other hand, the sample was positive for adenovirus antigen type 40/41 by ICA and EIA. Finally, the sample showed by PAGE an electrophoretic profile resembling that of reovirus.

Electronic microscopy was shown to be effective in revealing the presence of *Reoviridae* agents which constitute uncertain results by enzyme and molecular immunoassays. In this way a very infrequent viral co-infection has been characterized by electronic microscopy.

Keyword:

<sup>1</sup>Instituto de Virología "Dr. J. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

<sup>2</sup>Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Autor con quien mantener correspondencia

Prof. Dra Silvia V Nates.

Instituto de Virología "Dr. J. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gómez s/n, Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba

E mail: snates@cmefcm.uncor.edu

## INTRODUCCIÓN

Desde 1676, año en que Antonie van Leewenhoek observó y describió las primeras formas de vida microscópica, "ver el microorganismo" significó el primer paso orientativo para el diagnóstico de una enfermedad infecciosa. De esta manera, el laboratorio microbiológico concentró históricamente su atención en la detección del agente causal a través de su visualización.

A partir de la pasada década de los 70, la microscopia electrónica se constituyó como herramienta diagnóstica en la detección de infecciones virales. Así, su utilización fue muy provechosa en el diagnóstico de las gastroenteritis virales debido a que permite la observación directa en la materia fecal de la morfología de los virus productores de dicha enfermedad. Pero actualmente, debido a que esta técnica requiere un equipamiento especializado y muy costoso, además del desarrollo de otras técnicas diagnósticas, se ha dejado de utilizar para este fin.

Algunos virus, tales como rotavirus, astrovirus, calicivirus, agente Norwalk y los adenovirus 40/41, son denominados como agentes etiológicos clásicos de gastroenteritis. Por otra parte, otros virus, tales como coronavirus, torovirus y reovirus, son agentes que pueden producir gastroenteritis pero cuyo hallazgo en muestras clínicas de materia fecal es muy poco frecuente; por esto son denominados agentes inusuales de gastroenteritis. Para este último grupo de virus no existen pruebas diagnósticas comerciales y la microscopia electrónica puede ser una herramienta diagnóstica importante.

El objetivo del presente trabajo es recalcar, desde los resultados diagnósticos de un caso clínico de gastroenteritis, la importancia de la microscopia electrónica en la caracterización de agentes virales que producen gastroenteritis y que no son corrientemente considerados en el diagnóstico.

## CASO CLÍNICO Y RESULTADOS DE LABORATORIO

Un niño de 6 meses de edad fue

hospitalizado en el mes de abril del 2002 por una gastroenteritis aguda con diarrea acuosa y deshidratación. La materia fecal de este niño fue analizada en el laboratorio. En el examen directo en fresco no se observaron leucocitos polimorfonucleares y en el cultivo no se aislaron bacterias enteropatógenas. Simultáneamente la muestra fecal fue analizada en el laboratorio virológico. En la primera etapa del diagnóstico virológico se realizó la microscopia electrónica de transmisión, debido a que la muestra se encontraba en el marco de un proyecto de detección de torovirus. La misma se realizó de la siguiente manera: la materia fecal fue centrifugada a 16 000 g por un tiempo de 60 minutos y el sedimento de la centrifugación fue resuspendido en agua destilada. A partir de este material se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2 % en solución acuosa sobre grillas tratadas previamente con membrana Formvar carbonizadas y desionizadas. Para la visualización se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol EM-SQH 10 a una magnificación de x40000.

En el análisis de la muestra se observaron dos tipos de estructuras virales: (a) partículas de 70 a 85 nm de diámetro con una estructura característica a la familia *Reoviridae* y compatibles con el género *Reovirus* o *Rotavirus*; y (b) partículas de 70 a 100 nm de diámetro con una estructura icosaédrica compatible con la familia *Adenoviridae*. Por otra parte, la muestra fue además procesada para la detección de los antígenos de grupo de rotavirus y adenovirus por inmunocromatografía (Diarlex MB, Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia), dando un resultado positivo para adenovirus y positivo débil para rotavirus del grupo A (observación de una banda débil en la tira inmunocromatográfica). La débil banda correspondiente a rotavirus motivó profundizar el estudio del mismo a través de otros dos ensayos de configuración poli y monoclonal (Rotazime II, Abbot Laboratorios, Diagnostics división, Abbott Park, IL 60064 y Pathfinder TM Rotavirus, Sanofi Diagnostic Pasteur, France), dando resultados negativo y positivo

-27-

débil, respectivamente. Debido a la discordancia de estos dos resultados se realizó una RT-PCR para amplificar el gen de rotavirus grupo A que codifica para la proteína VP7, la cual resultó negativa. Sin embargo la imagen de microscopia electrónica señalaba sin cuestionamientos la presencia de un agente de la familia *Reoviridae* en una muestra con resultados discrepantes por ensayos inmunoenzimáticos y moleculares.

Sin poder resolver la etiología del cuadro clínico, al material genético presente en la muestra fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida, técnica que dibuja el perfil de migración de los segmentos genómicos de los virus de la familia *Reoviridae* y que no es usualmente utilizada en el laboratorio de diagnóstico rápido. El patrón electroforético reveló una migración de 10 segmentos de ARN, característica del genoma del género *Reovirus*, confirmando así que una de las partículas virales observadas en la microscopia electrónica pertenecía a un reovirus. Finalmente la muestra fue analizada para adenovirus mediante el ensayo inmunoenzimático Adenoclon tipo 40/41 (Adenoclon Type 40/41, Cambridge Biotech Corporation, Worcester, Mass) con resultado positivo. Como resultado final, la muestra de materia fecal tenía la presencia de adenovirus y reovirus.

### DISCUSIÓN

Nuestro grupo de trabajo estudió la infección por reovirus en niños hospitalizados por gastroenteritis durante un período de 20 años, detectando 3 (0.10%) positivos sobre un total de 2854 muestras de materia fecal (1). De este modo, se puede aseverar que la gastroenteritis por reovirus son inusuales en nuestro medio y que la microscopia electrónica, en este caso, documentó una imagen muy poco frecuente de coinfección viral; la cual fue confirmada luego mediante diferentes metodologías diagnósticas.

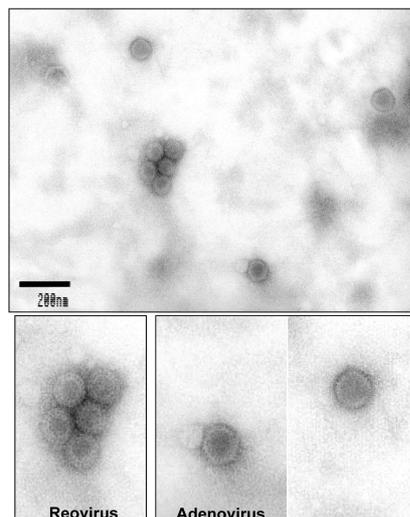
En la patogénesis de la gastroenteritis del presente caso intervinieron dos virus desnudos con grandes diferencias en su estructura química y mecanismos de replicación. Sin embargo es importante señalar que estos virus

comparten los mecanismos de entrada a la célula. En este sentido, la proteína de adhesión de los reovirus, sigma 1, tiene una estructura y función similares a la proteína de adhesión de los adenovirus: la proteína de la fibra. Además, estos agentes reconocen el mismo dominio en sus receptores celulares, estos últimos integrantes de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Una vez dentro del citoplasma estos virus utilizan luego diferentes mecanismos para la expresión de sus genes (4, 5); replicando los reovirus su genoma viral en citoplasma y los adenovirus en el núcleo celular, ambos durante la fase G1 del ciclo celular.

Unos 300 años después de Antonie van Leewenhoek, Helmut Ruska realizó un aporte al diagnóstico de las infecciones virales, al caracterizar desde la microscopía electrónica la morfología y tamaño de los poxvirus. Este aporte abrió un camino que aún continúa en el presente y pudo manifestarse en la detección del reovirus de este caso, el cual no hubiese sido detectado de no haberse visto la partícula viral por microscopia electrónica. La imagen del virus obtenida por microscopia electrónica aclara aspectos de su estructura, en una síntesis difícil de lograr por otras metodologías moleculares y que es clave para su comprensión. En un plano simbólico, la visualización del agente tiene una importante relación con nuestra representación del mismo y funciona en nuestra memoria como un "cemento de su identidad", tal como lo señalan Biel S. S. y Madeley D. (1). Además, la microscopía electrónica permite hoy orientar el diagnóstico virológico tanto en situaciones particulares como en contextos de emergencia epidemiológica y en actos de bioterrorismo (2). En contraste con otros ensayos que requieren la sospecha previa y blancos virales específicos, la directa visualización de la morfología viral permite su caracterización sin la prenocción de un agente etiológico determinado. De este modo la capacidad de la microscopia electrónica para identificar lo inusual y lo inesperado la convierten en una herramienta de primera línea en el diagnóstico de casos clínicos con agentes infecciosos que son poco frecuentes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Biel SS, Madeley D. Diagnostic virology. The need for electrón microscopy: a discussion paper. *J. Clin Virol*;2001, 22:1-9.
2. Giordano MO, Martínez L, Isa MB, Ferreyra L, Canna F, Pavan J, Paez M, Vergara M, Notario R y Nates S. Twenty year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in Argentina. *Pediatric Infect. Dis. J*; 2002, 21: 880-882.
3. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Infectious Agents in Emergent Situations. *Emerg Infect Dis*; 2003,9:294-303.
4. Ruska H, von Borries B, Ruska E. Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung. *Arch. Ges. Virusforsch*; 1940,1: 155-169.
5. Stehle T, Dermody TS. Structural evidence for common functions and ancestry of the reovirus and adenovirus attachment proteins. *Rev. Med. Virol.*;2003, 13: 132-132.
6. Wu E, Nemerow GR. Virus yoga: the role of flexibility in virus host cell recognition. *Trends Microbiol*; 2004, 12 :162-169.



### Pie de Figura

La microscopía electrónica revela una coinfección viral por adenovirus y reovirus en un niño con gastroenteritis aguda. En los recuadros se observan con más detalle las morfologías de los agentes virales.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto de Fitovirología (INTA-Córdoba) por facilitarnos el uso del microscopio electrónico (Jeol EM-SQH 10) y al Sr Claudio Nikolaus por su asesoramiento técnico.