

SINDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE EL LABORATORIO DE SALUD PUBLICA FRENTE A UNA EMERGENCIA GLOBAL

ELSA G. BAUMEISTER¹, ADRIAN P. LEWIS², JUAN P. BOZZINI³, VILMA L. SAVY¹

¹*Servicio de Virosis Respiratorias*, ²*Servicio de Cultivos de Tejidos* y ³*Servicio de Microscopía Electrónica, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Malbrán, Buenos Aires*

Resumen A fines del año 2002 se inicia un brote de neumonía atípica en el Sudeste asiático el cual se extiende posteriormente a otros continentes. El nuevo síndrome respiratorio agudo grave (SARS) era producido por un coronavirus novedoso. Debido a la gravedad de la situación y al riesgo de introducción de esta patología en Argentina, se implementaron técnicas de diagnóstico clásicas como la microscopía electrónica, y moleculares como una reacción de retrotranscripción seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La inclusión en araldita de células infectadas con un coronavirus bovino permitió visualizar más fácilmente las partículas virales, pero requirió más tiempo en comparación con la coloración negativa de partículas libres de cultivos virales. La RT-PCR implementada fue capaz de detectar ARN de cepas de casos de Hong Kong y de Alemania.

Palabras clave: SARS, partículas de coronavirus, microscopía electrónica, PCR, neumonía atípica

Abstract *Severe acute respiratory syndrome. The public health laboratory in a global emergency.* By the end of year 2002 there was an outbreak of atypical pneumonia in Southeast Asia which soon spread to other continents. This new severe acute respiratory syndrome (SARS) was produced by a novel coronavirus. Due to the severity of the situation and risk of introduction of this pathology in our country, the need to arrange specific laboratory diagnostic tests arose. Classic techniques, such as the electron microscopy and molecular biology test such as retrotranscription followed by the polymerase chain reaction (RT-PCR) were implemented. The araldit included cells infected with bovine coronavirus which allowed the viral particles to be visualized easily but it took more time in comparison with the negative staining of free particles from viral cultures. RT-PCR was able to detect RNA of isolated viruses from cases in Hong Kong and Germany.

Key words: SARS, coronavirus like particles, electronic microscopy, PCR, atypical pneumonia

El mundo ha aprendido una nueva palabra, "SARS", para denominar al síndrome respiratorio agudo grave. Se considera que es la primera enfermedad grave y de fácil transmisión del siglo XXI y que tuvo su origen en el sur de China a fines del año 2002¹. Desde ahí llegó a Hong Kong, Región Administrativa Especial de China (Hong Kong RAECh) en febrero de 2003 y sólo unos días más tarde se introdujo en Viet Nam, Singapur, Canadá y Alemania, diseminándose posteriormente a otras regiones. Desde noviembre de 2002 a julio de 2003 se comunicaron en 26 países un total de 8098 casos probables con más de 774 muertes². Se observó que la transmisión interhumana era efectiva y que el traslado de personas por avión permitía que individuos infectados

arribaran desde la región de origen a destinos lejanos sin presentar síntomas o comenzando con los mismos durante su viaje. Debido a esta situación y en consecuencia con el alerta mundial dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS)³, el Ministerio de Salud de la Nación reunió una Comisión Nacional para que, entre otras cosas, definiera cuáles serían los casos a estudiar y su aislamiento respiratorio, estableciera los mecanismos de control a nivel de fronteras y solicitara al laboratorio la implementación de herramientas que permitieran hacer un diagnóstico etiológico para confirmar o descartar los casos sospechosos de SARS que pudieran ingresar al país. De esta manera se trataría de impedir que la infección se diseminara localmente. Se presentan aquí las técnicas de laboratorio desarrolladas.

Recibido: 17-VI-2004

Aceptado: 10-XI-2004

Dirección postal: Dra. Elsa G. Baumeister, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Malbrán, Av Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11)4301-1035 e-mail: ebaumeister@anlis.gov.ar

Materiales y métodos

Virus y ARN virales: Se utilizó un coronavirus de origen bovino, cepa Mebus (BCoV) y el ARN de dos cultivos de ce-

pas de coronavirus aisladas de pacientes con SARS, uno proveniente de Hong Kong RAECy y otro de Alemania (HCoV-SARS- HK y HCoV-SARS- AL).

Líneas celulares: Se emplearon cultivos de células humanas de tumor de recto, HRT-18 para amplificar el BCoV .

Anticuerpos monoclonales (MABS): Los MABS: BC21, BC22, BC28 y BC29, dirigidos contra proteínas estructurales de BCoV, fueron empleados para confirmar la amplificación de BCoV en los cultivos celulares.

Amplificación de BCoV: Monocapas de células HRT-18 con 100% de confluencia, con no más de 96 horas de preparación fueron inoculadas con la cepa de BCoV, adsorbidas durante 1 hora, e incubadas a 37°C en atmósfera de CO₂ 0.5% con MEM-E y pancreatina 2.5 µg/ml, durante 48-72 horas⁴. El efecto citopático (ECP) observado por acción de la replicación de BCoV fue de redondeamiento celular y formación de sincicios.

Confirmación de la amplificación del BCoV en cultivos de HRT-18: Se prepararon portaobjetos con suspensiones de los cultivos celulares en las que se había observado ECP, se fijaron en acetona durante 10 minutos a -20°C y se colorearon posteriormente por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando los MABS para BCoV y un antisuero anti-ratón comercial (Dako® A/S, Dinamarca). El stock de virus correspondiente fue utilizado en las pruebas de microscopía electrónica y de amplificación de genoma viral

Amplificación de un segmento de genoma de HCoV-SARS por RT-PCR: La amplificación de una porción de la región de la polimerasa viral fue realizada utilizando los oligonucleótidos descritos por Ksiazek et al⁵, empleando un equipo comercial (*One step RT-PCR kit, Qiagen®*, GmbH, Alemania).

Visualización de los productos de PCR: Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, el que fue teñido con bromuro de etidio y posteriormente observado en un transiluminador con luz UV.

Coloración negativa de partículas de BCoV: Las partículas de BCoV fueron visualizadas por coloración negativa utilizando el método de difusión en agar, que permite la concentración de las partículas virales, así como la eliminación de sales cristalizadas del medio de cultivo. El sobrenadante de los cultivos de células HRT-18 a las 72 hs post infección (p.i.) fue fijado durante 15 minutos con glutaraldehído al 2.5% y sembrado sobre grillas de microscopía electrónica (*mesh 400*) recubiertas con membranas de polivinyl formal, colocadas sobre agar solidificado al 1% durante 30 minutos. Una vez que el líquido difundió completamente en el agar, las grillas fueron coloreadas con solución de ácido fosfotúngstico al 2% durante 30 segundos, secadas al aire dentro de una cabina de seguridad biológica clase II, irradiadas 30 minutos bajo luz UV y observadas al microscopio electrónico de transmisión (*Carl Zeiss EM-109*)⁶.

Cortes ultrafinos de células HRT-18 infectadas con BCoV: Se fijaron monocapas de células HRT-18, a las 48 horas p.i. durante 2 horas a 4°C con solución de glutaraldehído al 2.5% en buffer cacodilato 0.1 M (pH: 7.2). Las células fueron despegadas por raspado, centrifugadas 5 minutos a 1000 g y posteriormente fijadas durante 1 hora con tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato 0.1 M . El paquete celular resultante fue deshidratado por pasaje en soluciones de etanol de concentración creciente (50; 70 y 95%) y por pasaje en óxido de propileno, e incluido en araldita. Los cortes ultrafinos fueron montados sobre grillas mesh 400, coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados al microscopio electrónico de transmisión⁶.

Resultados

Se observó la aparición de ECP compatible con BCoV en los cultivos inoculados a las 48 horas p.i. Su amplificación fue confirmada por IFI, como se muestra en la Fig. 1. Se pudieron observar al microscopio electrónico partí-

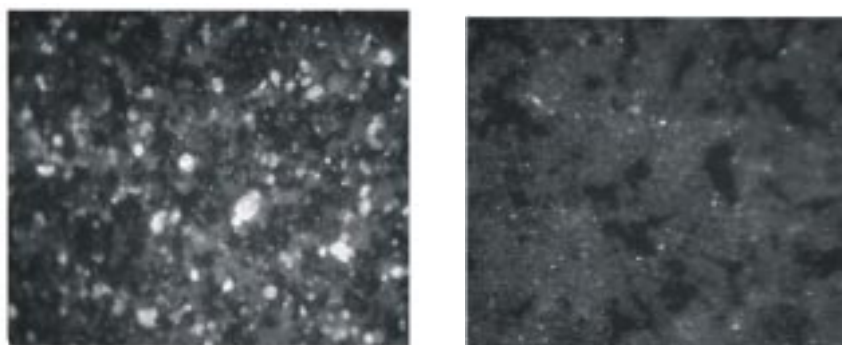


Fig.1.- Amplificación de BCoV, cepa Mebus en células HRT-18
 A: IFI de células HRT-18 infectadas con BCoV con MABS anti-BCoV.
 B: IFI de células HRT-18 con MABS anti-BCoV

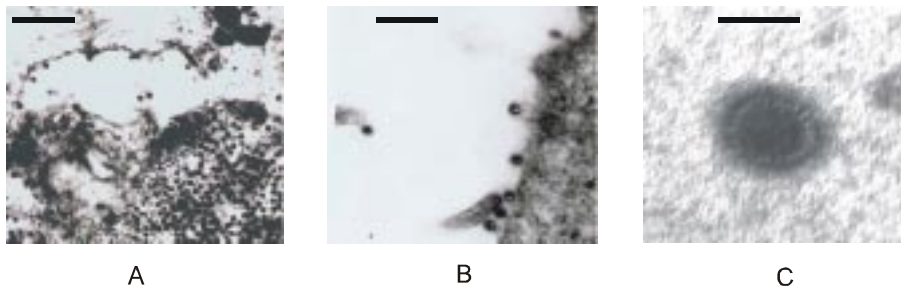


Fig. 2.– Visualización al microscopio electrónico de partículas similares a coronavirus.
 A: Células HRT-18 infectadas con BCoV, cepa Mebus, incluidas en araldita. Escala: barra = 1 µm. B: Células HRT-18 infectadas con BCoV, cepa Mebus, incluidas en araldita. Escala: barra = 500 nm. C: Sobrenadante de cultivos de células HRT-18 infectadas con BCoV, cepa Mebus. Escala: barra = 100 nm.

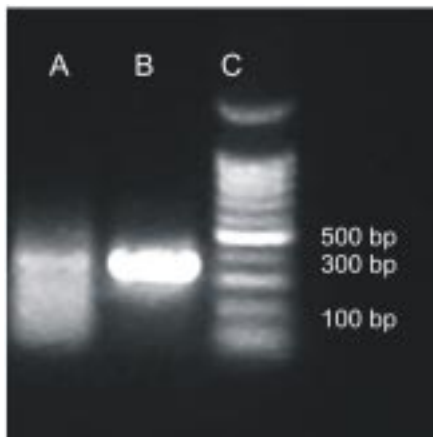


Fig. 3.– Amplificación por RT-PCR de una porción del gen que codifica para la polimerasa de HCoV-SARS.
 A: ARN de aislamiento de HCoV-SARS-AL. B: ARN de aislamiento de HCoV-SARS-HK. C: Marcador de peso molecular.

culas similares a coronavirus con los dos tipos de materiales ensayados: sobrenadante (Fig. 2C) y células de cultivos de BCoV (Fig. 2 A y B).

Al utilizar el ARN de HCoV-SARS en la prueba de amplificación de genoma viral se obtuvieron fragmentos cuyos tamaños se ubicaron entre las bandas de 300 y 400 bp del marcador de tamaño molecular (Fig. 3), mientras que no se observaron productos con el ARN proveniente del cultivo de BCoV.

Discusión

En noviembre de 2002, un hombre de negocios de la ciudad de Foshan, provincia de Guandong en el sur de China fue quizás la primera víctima de una enfermedad

misteriosa que luego fue denominada síndrome respiratorio agudo grave (SARS).

Este síndrome no atrajo la mirada del resto del mundo hasta mediados de febrero de 2003. En ese momento, un médico proveniente de la provincia de Guandong enfermó mientras se alojaba en el noveno piso de un hotel en la ciudad de Hong Kong (Hong Kong RAECh). También enfermaron 12 pasajeros más del hotel, incluyendo al menos 7 viajeros cuyas habitaciones se ubicaban también en el noveno piso⁷. Estos pasajeros serán los que subsecuentemente transporten esta nueva enfermedad a Vietnam, Singapur, Canadá, Irlanda y EE.UU., introduciéndola también en el sistema hospitalario de algunos de esos países.

La presentación clínica del SARS no se distingue de la de otras neumonías adquiridas en la comunidad. Fiebre, mialgias, diarrea y linfopenia son frecuentes pero no constituyen hallazgos característicos^{8, 9, 10, 11}. Por ello la disponibilidad en el laboratorio de herramientas que permitan identificar casos de SARS dentro de los casos sospechosos es clave en la vigilancia de esta enfermedad.

Al comienzo del brote, cuando aún no se tenía información sobre el desarrollo de técnicas de amplificación genética de HCoV-SARS, la microscopía electrónica se presentaba como un elemento de diagnóstico virológico rápido de gran ayuda. Así entonces se amplificó en cultivos celulares BCoV para hacer preparados para microscopía electrónica. La inclusión de células infectadas permitió obtener preparaciones donde la identificación de las partículas virales fue más sencilla, ya que se las pudo visualizar en diferentes estadios de formación en el citoplasma celular, a nivel de las cisternas del aparato de Golgi y brotando de las membranas del mismo. En cambio, si bien pudieron reconocerse con facilidad las partículas virales en la coloración negativa realizada al sobrenadante de cultivo, la presencia de artefactos y detritos celulares dificultaron su detección. Esta última

desventaja se contraponen al beneficio de la rapidez, ya que con esa técnica se pueden obtener resultados en menos de una hora, mientras que la inclusión de células y la realización posterior de los cortes ultrafinos demandan al menos 24-48 hs.

Con la información disponible al publicarse la caracterización del agente causante del SARS^{5, 12-15} se decidió implementar una RT-PCR que amplificara un segmento del marco de lectura 1-b del genoma de HCoV-SARS con los oligonucleótidos descritos en el trabajo de Ksiazec y col⁵. El tamaño del producto obtenido a partir del ARN de los dos aislamientos de virus humanos con dicha RT-PCR se correspondió con el tamaño esperado de 368 bp⁵. Según las recomendaciones de la OMS, en el caso de que una muestra de un paciente sospechoso de SARS hubiera resultado positiva por la técnica de RT-PCR, se debería realizar la confirmación en un segundo laboratorio empleando una segunda alícuota de muestra. De obtenerse una segunda prueba positiva, el producto de la PCR se debería secuenciar para verificar que el fragmento amplificado obtenido correspondía a una secuencia específica del HCoV-SARS^{15, 16}. Esta metodología podrá ser aplicada a muestras clínicas en el caso de que se produzcan casos sospechosos de SARS, preferentemente de materia fecal, ya que se ha observado que éste es un espécimen clínico que permite identificar los casos de SARS que se encuentren dentro de la primera semana de evolución de la enfermedad¹¹.

La contención de la epidemia ocurrió en momentos en los que no se conocían claramente los mecanismos de transmisión, no se disponía de una prueba diagnóstica de laboratorio validada para definir los casos, ni de vacunas o tratamientos efectivos. Se puede atribuir el éxito al trabajo epidemiológico tradicional de base, la identificación de casos por nexos epidemiológicos y su posterior aislamiento, la implementación de cuarentenas de un gran número de personas y también al cumplimiento de las normas básicas de bioseguridad durante la búsqueda activa de casos y la atención de casos sospechosos y confirmados.

Se han notificado 15 nuevos casos desde que la OMS comunicó en julio de 2003 la contención del brote¹⁷. En septiembre de ese año aparece el primer caso posepidémico cuando un investigador de Singapur adquiere la infección como consecuencia de fallas de biocontención al trabajar en un laboratorio en el que realizaban procedimientos de propagación del virus del SARS¹⁸. En enero de 2004 China confirma la aparición de 3 casos adquiridos en forma natural sin vínculos epidemiológicos¹⁹ y en marzo se producen en ese mismo país 2 casos asociados a fallas de biocontención en un instituto de virología. A partir de uno de ellos se generaron en la comunidad 9 casos más, conectados epidemiológicamente²⁰. Debemos mantenernos en alerta pensando que en cualquier momento pueden presentarse nue-

vos casos por adquisición natural de la infección y que se deben respetar las recomendaciones de la OMS de trabajar estrictamente en condiciones de bioseguridad al menos de nivel BSL3, cuando se realizan procedimientos que involucren al HCoV-SARS viable²⁰.

Agradecimientos: Agradecemos a los Drs. Fernando Fernández, María Barrandeguy y Viviana Parreño del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Argentina, por cedernos gentilmente la cepa de coronavirus bovino, los anticuerpos monoclonales anti-coronavirus bovino y la línea celular HRT-18; al Dr. William Bellini de los Centros de Control de Enfermedades de EE.UU. y al Dr. Matías Niedrig del Instituto Robert Koch de Alemania por enviarnos cultivos inactivados de coronavirus humanos asociados a casos de SARS.

Bibliografía

1. World Health Organization: *Weekly Epidemiological Record* 2003. 78: 57-64.
2. World Health Organization: SARS. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November to 31 July 2003
http://www.who.int/csr/sars/countrytable2003_09_23/en/
3. World Health Organization: WHO issues a global alert about cases of atypical pneumonia. WHO PRESS RELEASE 12-3-2003
<http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr22/en/>
4. Benfield DA, Saif LJ: Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 1454-7.
5. Ksiazec TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003 May 15; 348: 1953-66.
6. Alain R, Berthiaume L. Electron Microscopy. In Payment P, Trudel M, (eds.) *Methods and Techniques in Virology*. New York: Marcel Dekker 1993; p. 105.
7. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, et al: A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003 [early release 2003 March 31]. <http://www.nejm.org>.
8. Centers for Disease Control: Preliminary clinical description of Severe Acute Respiratory Syndrome. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003; 52: 255-6.
9. Chan-Yeung M, Yu WC. Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region: Case report. *BMJ* 2003; 326: 850-2.
10. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, et al. Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003 May 15; 348: 1995-2005.
11. Peiris J, Chu C, Cheng V, et al. Prospective study of clinical progression and viral load of SARS associated coronavirus pneumonia in a community outbreak. *Lancet* 2003; 361 (9371): 1767-72.
12. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003 May 15; 348: 1967-76.
13. Peiris J, Lai ST, Pon L, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361 (9366): 1319-25.
14. Marra A, Jones S, Astell C, et al: The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. *Science* 2003 May 30; 300: 1399-404.
15. Rota P, Oberste S, Monroe S, et al: Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respi-

- ratory Syndrome. *Science* 2003 May 30; 300: 1394-9.
16. World Health Organization. SARS: International Reference and Verification Laboratory Network: Policy and Procedures in the Inter-Epidemic Period. January 23, 2004. <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en/>
 17. World Health Organization: Update 96: Taiwan, China: SARS transmission interrupted in last outbreak area. 5 July 2003. http://www.who.int/csr/don/2003_07_05/en/
 18. World Health Organization: Update 2: Severe acute respiratory syndrome (SARS) in Singapore: SARS case in Singapore linked to accidental laboratory contamination. 24 September 2003. http://www.who.int/csr/don/2003_09_24/en/
 19. World Health Organization: Update 4: Review of probable and laboratory-confirmed SARS cases in southern China. January 2004. http://www.who.int/csr/don/2004_01_27/en/
 20. World Health Organization: Update 7: China's latest SARS outbreak has been contained, but biosafety concerns remain. 18 May 2004. http://www.who.int/csr/don/2004_05_18a/en/

If I were magically put in charge of improving the status and image of science, I'd start using the media, instead of feeling victimized by them. Science is the most exciting and sustained enterprise of discovery in the history of our species. It is the great adventure of our time. In a stunningly short period of time, science has extended our knowledge all the way from the behavior of the galaxies to the behavior of particles in the subatomic world. Under the circumstances, for scientists to fret over their image seems absurd. This is a great field with great talents and great power. It's time to assume your power, and shoulder your responsibility to get your message to the waiting world. It's nobody's job but yours. And nobody can do it as well as you can.

Si yo estuviera a cargo de mejorar el *status* y la imagen de la ciencia, empezaría con los medios, en lugar de sentirme víctima del sistema. La ciencia es la empresa del descubrimiento más estimulante en la historia de nuestra especie. Es la gran aventura de nuestro tiempo. En un asombrosamente corto período de tiempo, la ciencia ha aumentado nuestro conocimiento desde el funcionamiento de las galaxias hasta el de partículas en el mundo subatómico. Se trata de una gran empresa con grandes talentos y gran poder. Es tiempo que los científicos asuman su poder y tomen conciencia de sus responsabilidades para proyectar su mensaje al mundo expectante. No es trabajo de nadie sino vuestro. Y nadie lo puede hacer mejor que ustedes.

Michael Crichton

Ritual Abuse, Hot Air, and Missed Opportunities. *Science* 1999; 283: 1461-3