

---

---

# **Importancia de la Microscopía Electrónica de Transmisión en el diagnóstico de la epidemia de Encefalitis equina Venezolana de 1995 en la Guajira Venezolana.**

*Nereida Valero-Fuenmayor<sup>1</sup>, Jorge García-Tamayo<sup>2</sup>, Saudy Escorihuela-García<sup>2</sup>, Eduardo Caleiras<sup>2</sup> y David Parada<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela,

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Patología Ultraestructural y Biología Molecular, Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Apartado 50647, Sabana Grande, Caracas.

**Palabras claves:** Microscopio electrónico, partículas virales, epidemia, EEV.

**Resumen.** Se estudió con el microscopio electrónico de transmisión el cerebro de 25 ratones lactantes, inoculados intracerebralmente con el sobrenadante de células VERO cultivadas e infectadas con el virus de la EEV, como control positivo, con muestras de suero o de líquido cefalorraquídeo de pacientes con síntomas y signos de encefalitis, con sueros de pacientes sanos, con sueros de equinos enfermos y con solución borato-salina de albúmina bovina, como control negativo. Las muestras se tomaron del brote epizootico y epidémico en Octubre del año 1995 en la región de la Guajira Venezolana al norte del Estado Zulia. El estudio ultraestructural se hizo a ciegas, pero, confirmó la presencia de partículas de Togavirus en el 100% de los casos examinados cuando correspondían a muestras virológicamente positivas. Se destaca la utilidad, precisión y la rapidez del método empleado.

**The importance of Transmission Electron Microscopy in the diagnosis of Venezuelan Equine Encephalitis during the epidemic of 1995 in the Venezuelan Guajira.**

*Invest Clin 38(2): 73- 82, 1997.*

**Key words:** Electron microscopy, viral particles, epidemy, VEE.

**Abstract.** Transmission electron microscopy of the brain in 25 newborn mice was performed. Mice were intracerebrally inoculated with cultured VERO cells infected with VEE to be used as positive control, with samples of serum of cerebrospinal fluid from patients with clinical symptoms and signs of encephalitis, with serum from healthy patients or with serum from sick equines. Borate bovine albumin serum was also inoculated in some mice to be used as negative control. All samples were obtained during the epizootic and epidemic outbreak in the Venezuelan Guajira area, northern of Zulia State during October 1995. The ultrastructural study was blindly performed, however the presence of Togavirus particles were detected in 100% of the virologically positive cases. The usefulness, accuracy and speed of the employed methodology is stressed.

*Recibido: 30-1-97. Aceptado: 13-5-97.*

## INTRODUCCIÓN

Es bien conocida la importancia del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) por las numerosas epizootias y epidemias que han ocurrido en el país desde el aislamiento del virus en 1939, por Kubes y Rios (1). A partir de entonces, se ha clasificado utilizando pruebas serológicas en seis subtipos (I a VI). El subtipo I tiene siete variantes reconocidas, dentro de las cuales se encuentra la cepa vacuna TC-83 (2, 3, 4, 5).

El virus de EEV, se encuentra latente en sus reservorios naturales provocando periódicamente brotes epidémicos, se han examinado las áreas endemoepidémicas y se han publicado numerosos trabajos de

investigación especialmente dirigidos por nuestro laboratorio (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Las epidemias de EEV fueron graves en los años sesenta y setenta (2, 3, 12). La epidemia de 1962 se extendió por la zona norte de la Guajira y se denunciaron más de mil casos en humanos, luego que la onda epidémica circuló por la Costa de Venezuela llegando hasta el estado Bolívar. En 1967, se inició en Colombia una epidemia del subtipo IB del virus de la EEV se extendió hasta el Ecuador, Venezuela, Centroamérica y México, llegando hasta los Estados Unidos en 1971. Dos años después se produjo otro brote en el municipio Páez del estado Zulia. Entre diciembre de 1992 y enero de 1993, el Ministerio de Agricultura y

Cría informó de un brote de EEV en el estado Trujillo, se registraron 12 muertes en equinos y se notificaron 39 casos febriles en humanos. En esta ocasión se aisló el subtipo ID. En junio de 1993 se notificaron nuevos brotes en el estado Zulia con 55 casos humanos (13).

En abril de 1995, se inició una de las epidemias más grandes que han afectado al país, se notificaron más de 10.000 casos en humanos y el número de equinos afectados fue incontable.

El propósito de este trabajo es demostrar como el microscopio electrónico de transmisión (MET) puede ser una poderosa arma para detectar la presencia de partículas del virus de la EEV en los casos examinados, aunque las muestras provengan del medio rural, hayan sido tomadas a partir de líquido cefalorraquídeo, o de sueros de pacientes febriles, o provengan de cultivos celulares infectados con material de los enfermos con cefalea y fiebre durante el brote epidémico. La metodología utilizada en este estudio a ciegas, demuestra que la amplificación del virus de la EEV en el cerebro de ratón lactante y su ulterior estudio ultraestructural permite un diagnóstico virológico rápido y preciso.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población estudiada**

Entre septiembre y diciembre del año 1995 fueron recolectadas 1123 muestras de sangre de humanos con enfermedad febril aguda, cefalea y otras manifestaciones que

hacían sospechar el diagnóstico de encefalitis. La mayoría de los enfermos fueron niños residentes de los municipios Mara, Páez, Insular Padilla, Miranda y Maracaibo. El promedio de muestras por localidad se tomó según la incidencia de los casos febriles en las mismas. A cada paciente se le llenó una ficha diseñada para la investigación de arbovirus. Se tomaron también 132 muestras de sangre de équidos (80 del municipio Mara y 52 de Páez); los animales fueron identificados por sus características fenotípicas y un número de historia y las muestras fueron tomadas por punción venosa en tubos al vacío. Todas las muestras, después de mantenerse los tubos refrigerados y ya separado el suero, fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

### **Evaluación serológica**

La detección de anticuerpos IgM específicos se hizo por el método de ELISA descrito por Rosato y Col (14).

### **Aislamiento viral**

Las muestras de suero recolectadas en la fase aguda de la enfermedad y en condiciones óptimas para ser cultivadas, fueron inoculadas en cultivos de células VERO y en células de mosquito C6/36. Para la identificación del subtipo viral, se escogieron al azar algunas muestras para ser enviadas al laboratorio de aislamiento viral del CDC en Fort Collins, donde se implementaría la técnica de inmunofluorescencia con

anticuerpos monoclonales, para los diferentes subtipos del virus de la EEV. Los cultivos en los que no se observó efecto citopático, fueron ensayados por Inmunofluorescencia, ante 28 sueros antivirales.

### **Microscopía Electrónica**

Se inocularon intracerebralmente 24 ratones lactantes con muestras provenientes de suero y líquido cefalorraquídeo de humanos y con suero de equinos, así como también algunos ratones se inocularon con cultivos celulares que habían sido inoculados inicialmente con muestras de seres humanos. Se utilizaron controles positivos del virus de la EEV y como controles negativos se usó el diluyente de solución borato-salina con albúmina bovina al 0,4% pH 9,0 (BABS 0,4%). Dos o tres días después de la inoculación, se extrajo el cerebro de los ratones y se tomaron muestras para aislamiento viral, así como también una parte del cerebro fue fijada en glutaraldehído al 2,5% a pH 7,2 y a 4°C para su estudio ultraestructural. Cada frasco se recibió numerado de 1 al 24 sin ninguna información sobre las características de la muestra. Se procesó el material de los 24 cerebros para su estudio histológico y para ser examinado con el MET. Las muestras se cortaron en fragmentos de 2 a 3 mm y se lavaron con buffer cacodilato antes de ser postfijadas en tetraóxido de osmio al 2% durante una hora. Los fragmentos de cerebro de cada caso se deshidrataron en alcoholes a concentraciones crecientes y en óxi-

do de propileno, para incluirse en resinas epoxy con 48 horas de polimerización a 60°C. Cortes gruesos de una micra de espesor sirvieron para localizar las áreas sospechosas de alteraciones con el microscopio de luz. Los cortes ultrafinos se hicieron con cuchillas de diamante en un ultramicrotomo Porter Blum y se recogieron en rejillas de cobre de 300 mesh sin película de soporte para ser contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se examinaron en un MET Hitachi 500 a 85 Kv. y aumentos directos entre 2.500 y 25.000 x.

### **RESULTADOS**

Los resultados están expresados en la Tabla I. Los datos sobre la inoculación de cada cerebro se obtuvieron después de que el estudio ultraestructural había finalizado y se habían planteado las conclusiones sobre la presencia o no de partículas virales en cada muestra. Por esta razón se propuso este trabajo como una investigación a ciegas. Las muestras que resultaron negativas fueron examinadas exhaustivamente, llegando a observar hasta dos o tres rejillas de varios bloques de plástico. En los casos positivos (confirmados virológicamente como EEV, subtipo IC), las partículas virales fueron usualmente halladas sin mucha dificultad. La cantidad de partículas virales parecía variar de un bloque a otro, pero siempre se detectaron poco tiempo después de haber iniciado la observación.

Se observaron en el citoplasma

**TABLA I**  
**INOCULACION EN CEREBRO DE RATON LACTANTE DE MUESTRAS CON EL**  
**VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA . 1995**

MUESTRAS	CEREBRO DE RATON LACTANTE	MET	
1-2-3-4	INOCULADO CON BABS 0,4%	1(-)	2(-)
		3(-)	4(-)
5-6-7	INOCULADO CON SOBRENADANTE DE CELULAS CULTIVADAS INFECTADAS CON VIRUS EEV	5(+)	6(+)
			7(+)
8-9-10-11	INOCULADO CON LCR N° 1146	8(+)	9(+)
		10(+)	11(+)
12-13-14	INOCULADO CON SUERO N° 14 (SUERO DE PACIENTE SANO)	12(-)	13(-)
			14(-)
15-16-17-18	INOCULADO CON SUERO DE CABALLO ENFERMO SINTOMATICO	15(+)	16(+)
		17(+)	18(+)
19-20-21	INOCULADO CON SUERO DE PACIENTE FEBRIL	19(+)	20(+)
			21(+)
22-23-24	INOCULADO CON BABS 0,4%	22(-)	23(-)
			24(-)

de las neuronas, masas de material granular con formación de partículas redondeadas electrón-densas, de 28 a 30 nm. Muchas de estas estructuras que corresponden a los nucleocápsides vírales, se encontraban adheridos a las membranas de cisternas o de vesículas lisas en el citoplasma (Figs. 1 y 2). Algunas ocasionalmente se vieron adheridas a cisternas de retículo rugoso y la mayoría se detectaron haciendo protrusión hacia la luz de las vesículas, vacuolas y las cisternas lisas, incorporando la membrana de estas estructuras y rodeándose de una envoltura para transformarse en partículas virales maduras de 45 nm de diámetro. Estas partículas virales, mostraban una superficie espiculada y estaban organizadas en algunas áreas con una disposición paracristalina (Fig. 1). En algunas neu-

ronas se observó gemación en su membrana plasmática y se vieron numerosas partículas virales agrupadas en espacios interaxonales o entre las dendritas en el neuropilo. Las células endoteliales no mostraron alteraciones y se observó marcado edema representado por un exagerado hinchamiento de los astrocitos y procesos pedales.

### DISCUSIÓN

La morfogénesis del virus de la EEV fue descrita en animales vivos, por primera vez, por nosotros, en 1971 (8, 15). Diez años después demostramos (9), como el desarrollo de las partículas virales en el sistema nervioso central de los ratones lactantes experimentalmente inoculados con el virus de la EEV, reproducía las observaciones hechas con



Fig. 1. Partículas del virus de la EEV (flechas) con organización paracrystalina en vesículas citoplasmáticas de una neurona en cerebro de ratón lactante. Se ven partículas virales en el intersticio (cabezas de flechas). x60.000.

el virus de la selva de Semliki (SF) (16, 17), y confirmaba nuestras observaciones sobre el desarrollo del virus de la EEV, en el corazón de los ratones lactantes (18), a través de masas de viroplasmata similares a las descritas inicialmente en el cerebro de los ratones inoculados con este virus ( 8, 9, 15). En lo que se refiere a la multiplicación del virus de la EEV en las membranas celulares, nuestras publicaciones venían a ratificar observaciones hechas con

otros arbovirus como Chinkungunya (19), Aura (20) y Sindbis (21). En lo referente a la estructura de los Togavirus y en particular del virus de la EEV, nuestras observaciones iniciales (22), vendrían a ser corroboradas por estudios posteriores sobre las espículas de la envoltura viral con el virus SF (23, 24).

Estas observaciones sobre la ultraestructura de las partículas del virus de la EEV, sirven para señalar las posibilidades existentes de de-



Fig. 2. Citoplasma y núcleo (N) de neurona en cerebro de ratón lactante inoculado con suero de paciente con signos clínicos de encefalitis. Se observan nucleoides (cabezas de flechas) y partículas virales (flechas). x 50.000.

tectar e identificar como Togavirus a cualquier agente viral que se multiplique en el cerebro de ratones lactantes. Evidencias recientes sobre la replicación temprana de la cepa atenuada TC-83 del virus de la EEV en núcleos aislados de cerebros de ratas (25), confirman la vulnerabilidad selectiva del cerebro de los roedores y su capacidad para multiplicar los Togavirus. La importancia del MET para lograr un diagnóstico preciso ante una situación epidémica como

la vivida en el año 1995, es más notoria si destacamos la metodología sencilla que fue utilizada y la rapidez con que pueden hacerse las observaciones, puesto que los ratones lactantes se sacrifican un par de días después de la inoculación intracerebral. La precisión de un 100% de positividad para la detección de partículas virales está avalada por la precisa correlación virológica ulterior de los hallazgos, a pe-

sar de haber realizado el estudio completamente a ciegas.

Finalmente debemos recalcar como a pesar de haber logrado el desarrollo de un modelo experimental para reproducir las lesiones intrauterinas provocadas por el virus de la EEV (7, 26, 27) y corroborar las observaciones hechas por Wenger en la epidemia del año 1962 (3), luego de treinta años de estudios experimentales en ratones y en ratas sobre la patología ultraestructural viral (28, 29, 30) y la patogenia de la infección *in utero* (10, 26, 27), lamentablemente en la epidemia del año 1995, se reprodujeron los hechos ya descritos (3, 10) y tuvimos que conocer del nacimiento de niños con necrosis cerebral masiva y con malformaciones cerebrales, nacidos de las madres guajiras quienes padecieron de encefalitis durante los primeros meses del embarazo (Cedeño R., Valero-Fuenmayor N., García Tamayo, J. Nuevos aportes teratogénicos del virus de la Encefalitis Equina Venezolana. Memorias del III Congreso Internacional de Medicina Perinatal. Maracaibo, Venezuela, Octubre de 1996).

Es de esperar que este sencillo trabajo sobre la aplicación del MET al diagnóstico virológico, despierte el interés de aquellos quienes deben promover el desarrollo de estudios multidisciplinarios para lograr la erradicación del virus de la EEV de sus focos enzoóticos. No debemos olvidar que ante una emergencia epidémica, las autoridades sanita-

rias están obligadas a aceptar lo que la clínica, el laboratorio y las más sencillas técnicas morfológicas tradicionales o los métodos más sofisticados de Biología Molecular determina sobre los males que aquejan a nuestros ciudadanos de escasos recursos.

### AGRADECIMIENTO

Al personal de la Dirección de Malarilogía y Endemia rural de Sinaimaica. Al Dr. Jesús Estévez por la elaboración de los cortes cerebrales y al Técnico Florencio Añez por su excelente asistencia.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- NEGRETTE A.: Epidemia de Encefalitis del año 1959 en Maracaibo (San Francisco) Estado Zulia, Venezuela. Aspectos Históricos y Epidemiológicos. Invest Clín 1974; 36: 471-474.
- 2- AVILÁN J.: El Brote de Encefalitis Equina Venezolana al Norte del Estado Zulia a fines de 1962. Rev Sanidad y Asistencia Social 1964; 29(3): 231-321.
- 3- WENGER F.: Necrosis cerebral masiva del feto en casos de Encefalitis Equina Venezolana. Invest Clín 1967; 21: 13-31.
- 4- QUERALES J., PAZ J.: Estudios Seroepidemiológicos de Encefalitis por virus Venezolano en la zona de Barlovento. Rev Inst Nac Hig 1985; XVIII.
- 5- KUBES V., RIOS F. A.: The

- causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 1939; 90: 20-21.
- 6- BELLARD M. E., LEVINE S., BONILLA E.: Encefalitis Equina Venezolana. Revisión. *Invest Clin* 1989; 30: 31-58.
- 7- FREITES F., GARCÉS A. G., GARCÍA TAMAYO J.: Alteraciones Fetoplacentarias inducidas en ratas por la cepa TC-83 del virus de la Encefalitis Equina Venezolana. *Invest Clin* 1986; 27: 25-48.
- 8- GARCÍA TAMAYO J.: Desarrollo del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en el tejido nervioso de ratones recién nacidos. Ultraestructura e histoquímica. *Invest Clin* 1971; 37: 7-63.
- 9- GARCÍA TAMAYO J.: Encefalitis Equina experimental. Estudio histológico, histoquímico y ultraestructura. *Invest Clin* 1980; 21 (4): 277-371.
- 10- GARCÍA TAMAYO J.: Efecto teratogénico del virus de la Encefalitis Equina Venezolana: Una revisión del problema. *Invest Clin* 1992; 33: 81-86.
- 11- MORENO C. M., BONILLA E., HERNANDEZ H., SALAZAR M.: Fijación de H3 GABA por el cerebro de ratas infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana. *Invest Clin* 1984; 36: 471-474.
- 12- RYDER S.: Encefalitis Equina Venezolana. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad entre 1962 y 1971, en la Guaji-  
ra Venezolana. *Invest Clin* 1972; 13(3): 91-141.
- 13- RYDER S., CAMARGO J., RANGEL P., AÑEZ F.: Encefalitis Equina Venezolana. Determinación de Anticuerpos en la población humana del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Invest Clin* 1993; 34: 135-141.
- 14- ROSATO R., MACASAET F., JAHRLING P.: Enzyme linked immunosorbent assay for detection of Immunoglobulins G and M to venezuelan Equine Encephalomyelitis virus in vaccinated and naturally infected humans. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 421-425.
- 15- GARCÍA TAMAYO J.: Acid Phosphatase activity in mouse brain infected with Venezuelan Equine Encephalitis virus. *J Virol* 1971; 8: 232-241.
- 16- ACHESON M., TAMM Y.: Replication of Semliki Forest virus: An electron microscopic study. *Virology* 1967; 32: 128-143.
- 17- ERLANDSON R. A., RABOCK V. I., SOUTHAN C. M., BAILEY R. B., SHIPKEY F. M.: Semliki Forest virus in HEP-2 cell cultures. *J Virol* 1967; 1: 996-1009.
- 18- GARCÍA TAMAYO J.: Venezuelan equine Encephalitis virus in the heart of newborn mice. *Arch Pathol* 1973; 96: 294-297.
- 19- HIGASHI H., MATSUMOTO A., TABATA K., NAGAMOTO Y.: Electron microscopic study of development of Chinkungunya virus in green monkey kidney

- stable (VERO) cells. *Virology* 1967; 33: 55-59.
- 20- LASCANO E. F., BERRIA M. I., BARRERA ORO J. G.: Morphogenesis of Aura virus. *J Virol* 1969; 4: 271-282.
- 21- PEDERSEN-JUN C. E., SAGIK B. P.: Sindbis virus maturation. *J gen Virol* 1973; 18: 375-379.
- 22- GARCÍA TAMAYO J., RYDER S., RYDER E.: Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus: Structural components. *Invest Clín* 1974; 15: 52-61.
- 23- GAROFF H., SIMONS K., RENKONEN O.: Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. *Virology* 1974; 61: 493-504.
- 24- GAROFF H., SIMONS K: Location of the spike glycoprotein in the Semliki Forest virus membrane. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1974; 71: 3988-3992.
- 25- VALERO-FUENMAYOR N., AÑEZ F., TERUEL-LÓPEZ M.E.: Efecto de la cepa atenuada (TC-83) del virus de la Encefalitis Equina Venezolana sobre la transcripción nuclear en células cerebrales de ratas. *Invest Clín* 1996; 37: 5-15.
- 26- GARCÍA TAMAYO J., ESPARZA J., MARTINEZ A. J.: Placental and fetal alterations due to Venezuelan Equine Encephalitis virus in rats. *Infect & Immun* 1981; 32: 813-821.
- 27- GARCÍA TAMAYO J., ESCORIHUELA-GARCÍA S., ESPARZA J.: Alteraciones iniciales inducidas en los vasos placentarios de la rata por el virus de la Encefalitis Equina Venezolana. *Invest Clín* 1983; 24: 3-15.
- 28- GARCÍA TAMAYO J., ESPARZA J.: Importancia de la respuesta celular en el fenómeno encefalítico inducido por el virus de la Encefalitis Equina Venezolana. *Patología ( Mex)* 1978; 16: 215-231.
- 29- GARCÍA TAMAYO J., CARREÑO G., ESPARZA J.: Central nervous system alterations and sequelae of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection in the rat. *J Pathol* 1979; 128: 87-91.
- 30- GARCÍA TAMAYO J., ESPARZA J.: Venezuelan Equine Encephalitis . *Comp Pathol Bull* 1981; 13: 2-4.