

HEPATITIS A: AISLAMIENTO *IN VITRO* DE UN AGENTE CON RARAS PROPIEDADES DE PROLIFERACION, EN UN CASO CLINICO OCURRIDO EN COSTA RICA^{1, 2}

Dres. W. Pelon³, J. H. Miller⁴, y J. E. Deas⁵

Se aisló in vitro un agente enteroviroide que poseía propiedades distintas de las de este tipo de virus. Se hallaron indicaciones de infección en pares de sueros de un caso de hepatitis ocurrido en Costa Rica. Muchas de las propiedades concuerdan con las descritas acerca de los agentes de hepatitis aislados en monos títi y observados en heces humanas.

Introducción

Esta comunicación describe un agente vírico aislado en cultivos celulares inoculados con un espécimen fecal de un caso de hepatitis clínica ocurrido en Costa Rica y mantenido en condiciones especiales. Las investigaciones indican que este agente posee varias características que lo diferencian de los tipos conocidos de enterovirus.

Los picornavirus son pequeños organismos víricos (15–30 nm) que contienen ácido ribonucleico, que se dividen en subgrupos de rinovirus y enterovirus (1). Los primeros se distinguen de los últimos sobre la base de reducciones significativas en el título de virus infeccioso después de la exposición a un pH de 3.0 durante un período de 1 a 3 horas (2). A pesar de la notificación no confirmada del aislamiento de rinovirus en las heces, las tentativas para lograr este aislamiento en muestras fecales de

pacientes infectados y voluntarios han sido, hasta la fecha, infructuosas (3). Por añadidura, todos los tipos de rinovirus ensayados han resultado acidolábiles (2).

Las tentativas persistentes de los investigadores no han logrado todavía aislar *in vitro* al virus de hepatitis A (HeA). Sin embargo, se ha transmitido a títi un agente derivado de casos de HeA que posee características semejantes a las del picornavirus (4, 5). Recientemente se informó del hallazgo de un antígeno de virus de tipo esférico (27 nm de diámetro) en las heces de un voluntario humano afectado por HeA (6).

Los métodos actuales de aislamiento de enterovirus (7) no han permitido detectar el agente HeA. Puesto que estos métodos emplean medios de cultivo que contienen de 0.11 a 0.22% de NaHCO₃, se exploró la utilización de un medio ácido más estable para el aislamiento de virus HeA, y sobre lo que se informa en esta ocasión.

Métodos y resultados

Muestras fecales ensayadas

El personal del Centro Internacional de Investigaciones y Enseñanza Médica de la Universidad del Estado de Luisiana (LSU-ICMRT), situado en San José, Costa Rica, procedió a recoger muestras fecales en forma de estudio de doble anonimato. Se

¹ Este estudio fue sostenido en parte por el Comando de Investigaciones y Desarrollo de la Medicina del Ejército de los Estados Unidos de América (contrato DADA 17-68-C-8023) y, en parte, por la Fundación Edward G. Schlieder para la Educación y la Subvención AI-02347 para Investigaciones del Servicio de Salud Pública. Los resultados de este informe no representan necesariamente la opinión oficial del Departamento del Ejército, salvo que así se especifique por documentos autorizados.

² También aparece en inglés en *Bulletin of the Pan American Health Organization* 8(3):212-220, 1974.

³ Profesor Asociado, Departamentos de Microbiología y de Medicina Tropical y Parasitología Médica, Centro Médico de la Universidad del Estado de Luisiana, Nueva Orleans, Luisiana, E.U.A.

⁴ Profesor, Departamento de Medicina Tropical y Parasitología Médica, Centro Médico de la Universidad del Estado de Luisiana.

⁵ Especialista en Investigaciones Médicas, Departamento de Medicina Tropical y Parasitología Médica, Centro Médico de la Universidad del Estado de Luisiana.

obtuvieron especímenes de 35 casos de HeA ocurridos en una zona geográfica en que la enfermedad era endémica (8, 9). También se tomaron 55 muestras a individuos residentes fuera de la zona endémica que sirvieron de testigo. Todos los especímenes se prepararon en extractos al 10%.

Estudios de aislamiento de virus

Todas las muestras fecales se inocularon en cultivos primarios de células renales de mono rhesus y en cultivos de células HEP₂ para el aislamiento de enterovirus (7). Los especímenes de los que se obtuvieron aislamientos de virus se eliminaron de otros estudios; y los restantes se ensayaron en cultivos de células pulmonares diploides de embrión humano WI-38.

Medio I. Se mantuvieron cultivos celulares confluentes en un medio basal de Eagle (MBE), preparado en solución salina equilibrada de Earle (SSE de Earle), con suero de feto de ternero (SFT) al 10% y NaHCO₃ al 0.11% (concentración final), incubados a 36°C y observados para determinar la presencia de efectos citopáticos (ECP). El pH del medio oscilaba entre 7.4, en el momento de la inoculación, y 6.6 a los tres días de incubación.

Medio II. En un estudio simultáneo se mantuvieron cultivos celulares en un MBE sin suero, preparado en una SSE de Hanks exenta de glucosa, gaseado con CO₂ e inoculado. Después de la incubación a 36°C este medio se estabilizó aproximadamente a un pH de 6.8 y permaneció invariable durante el período de incubación. Con frecuencia los extractos fecales resultaban tóxicos para las células mantenidas en el medio ácido exento de suero, lo que obligó el pase de líquidos de cultivo degenerados a otros cultivos celulares frescos, mantenidos en condiciones similares.

Hallazgos. Por lo común se observaban ECP en los cultivos mantenidos solamente en el medio acostumbrado (I) o en los

mantenidos en ambas condiciones (I y II). Sin embargo, en una ocasión estos efectos se observaron exclusivamente en cultivos mantenidos en un medio ácido exento de glucosa e inoculado con un extracto fecal que se denominaría CR69(076) (10). Más adelante se averiguó que esta muestra procedía de un niño de siete años clínicamente diagnosticado como caso de HeA. Se debe mencionar que se logró aislar de nuevo del mismo espécimen fecal el agente responsable de los ECP observados en el Medio II, procedimientos que se describen a continuación.

Reproducción de virus CR69(076)

Las dificultades surgidas en la propagación del agente CR69(076) en los Medios I o II originaron la siguiente metodología que permitió una reproducción rápida y consistente. Se mantuvieron monocultivos de células WI-38 en un medio EBM preparado con 100X concentrados de mezclas de vitamina y aminoácidos y una solución de 200 mM de glutamina en SSB de Hanks modificada, que contenía una cantidad equivalente de galactosa en lugar de glucosa (11, 12). Además, el medio constaba de 0.035% de NaHCO₃, 0.6% de suero de feto de ternero (SFT), piruvato sódico (55 mg/litro) (11), alanina (45 mg/litro) (11) y 5-bromodeoxiuridina (BrDUR) 20 µg/ml, y fue gaseado con CO₂ (Medio III). A partir de esta última operación el pH del medio era de 6.0. Después de la incubación el medio alcanzó un equilibrio a un pH de 6.7 a 6.8. Se añadieron a cada cultivo 2 ml del medio y se dejaron incubar a 36°C durante 24 horas antes de la inoculación.

Con este método, se hallaron títulos de virus infeccioso de CR69(076) de 10^{6.0} a 10^{7.1} DICT₅₀ (dosis infectantes en cultivo tisular) por ml. En general, se alcanzaron los títulos máximos al 4° ó 5° día de incubación después de la inoculación.

Con los medios que contenían las cantidades acostumbradas de NaHCO₃ (0.11 ó 0.22%) o cuando el medio se había con-

vertido en alcalino en tubos mal cerrados, se observaban muy pocos, o ninguno, ECP. Se observó también que ocurría proliferación de virus pero a un ritmo mucho menor si el medio que contenía una fuerte concentración de NaHCO_3 se saturaba primero con CO_2 y luego se añadía a los cultivos celulares y se inoculaba.

Los estudios de estas titulaciones han indicado las ventajas de un medio ácido, como el del Medio III, para la reproducción de CR69(076). Como ya se ha advertido, el empleo del Medio I no permitió una buena reproducción de este agente, aunque las concentraciones de iones de hidrógeno de los cultivos inoculados oscilaban entre un pH de 7.4 en el momento de la inoculación y un pH de 6.6, después de la incubación. Para aclarar esta aparente discrepancia, se procedió a la titulación simultánea de virus infeccioso en células mantenidas en un Medio I y en las mantenidas en el Medio III, ya descrito. Debido al excesivo pH ácido producido en el curso de la incubación, se cambió el Medio I al 3° y 6° día de incubación. El cuadro 1 presenta los resultados de estas titulaciones. Conviene señalar que el título máximo de virus infeccioso se obtuvo casi después del 3er día de incubación en el Medio III, en cambio la cantidad de

virus detectada en presencia del Medio I fue considerablemente menor. Cuando se cambió este medio al 3er día, y se determinó el título al 6°, la cantidad de virus infeccioso detectado se había duplicado mientras que solo se observó un ligero aumento en los cultivos que contenían Medio III, durante el mismo período. El segundo cambio de Medio I al 6° día originó otro aumento del título de virus infeccioso, y en menor grado al 9° día. Hay que advertir a este respecto que sin los cambios de medio, se hubiera producido una regresión de los ECP; las células infectadas se hubieran desprendido del vidrio al medio y habrían dejado una capa celular de aspecto normal.

Estos resultados sugieren que el agente CR69(076) no solo requiere un ambiente ácido para su reproducción sino que se reproduce mejor en un margen más limitado de pH dentro del medio ácido. En el Medio I, el metabolismo celular da lugar a un cambio rápido en la concentración de iones de hidrógeno del lado alcalino de la neutralidad al relativamente ácido, pasando con rapidez por este margen óptimo para la reproducción vírica y permitiendo solo una infección limitada por CR69(076).

Puesto que la reproducción de tipos de rinovirus no solo requiere un medio ácido sino que también la favorece una incubación a 33°C en comparación con la de 36°C, se llevaron a cabo estudios para determinar si existía una situación análoga con respecto al CR69(076). Se procedió a titulaciones duplicadas simultáneas con virus de siembra CR69(076). El material de una titulación se incubó a 33°C y el de la otra a 36°C. Se efectuaron titulaciones similares con ECHO 25 y se incubaron de la misma manera. En ambos casos se observaron títulos más elevados de virus infeccioso y una proliferación más rápida a 36°C que a 33°C.

Fueron infructuosos los esfuerzos por detectar hemaglutininas víricas con eritrocitos "0" humanos a varias temperaturas (4°, 20° y 37°C), utilizando como diluyente

CUADRO 1—Influencia de los distintos medios de mantenimiento sobre el título de infecciosidad vírica del CR69(076).

Días de incubación	Medio I ^a	Medio III ^b
3	10 ^{2.56}	10 ^{9.27}
6	10 ^{4.05}	10 ^{9.7}
9	10 ^{5.35}	10 ^{9.87}

^a MBE en SSE de Earle, STF al 10%, NaHCO_3 al 0.11%. Al 3° y 6° día de incubación, el medio se cambió en cultivos inoculados.

^b MBE y SSE de Hanks (galactosa) STF al 0.6%, NaHCO_3 al 0.035%. BrDUR (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), piruvato de Na (55 mg/1), alanina (45 mg/1) y gaseado con CO_2 . No se cambió el medio durante la incubación.

^c $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$, log 10, 10 cultivos de WI-38 en tubo/dilución.

solución tope salina normal y de fosfato (pH 5.7, 6.1, 6.5, 7.1, 7.5, 8.0).

Efectos citopáticos del CR69(076)

Los efectos citopáticos (ECP) producidos por el CR69(076) en cultivos de células WI-38 fueron similares a los producidos por los enterovirus. Las células infectadas, teñidas con Giemsa y con hematoxilina y eosina, mostraron con frecuencia núcleos dilatados que posteriormente se convertían en picnóticos. Aunque no aparecían inclusiones citoplásmicas ni nucleares, el citoplasma de algunas células contenía masas eosinofílicas como las observadas en las células infectadas por enterovirus.

Las investigaciones limitadas del espectro de células huésped indicaron la improbabilidad de que el CR69(076) constituyera la mayoría de los enterovirus. Además, no hubo indicaciones de ECP en los cultivos primarios de células renales de mono rhesus en las condiciones de cultivo normalmente empleadas para el aislamiento de enterovirus ni en las que resultaron óptimas para este virus. Resultados análogos se obtuvieron con células hepáticas VERO, HEp-2, HeLa y Chang. Ahora bien, utilizando la metodología descrita para la reproducción de CR69(076), se observaron ECP con una estirpe de células diploides fibroblásticas de prepucio humano (HuFS-6).^o

Características fisicoquímicas del CR69(076)

A diferencia de los tipos de enterovirus con el CR69(076), se observó una pérdida considerable de título de virus infeccioso después del almacenamiento a -70°C . El líquido de cultivos infectados, aclarado mediante la centrifugación, se distribuyó en frascos con tapón de rosca en partes iguales de 1 ml y se almacenó en un congelador mecánico a -70°C ; periódicamente se retiraba y se procedía a la titulación del contenido. Como se indica en el cuadro 2,

CUADRO 2—Estabilidad del CR69(076) almacenado a -70°C .

Meses de almacenamiento	DICT ₅₀ /ml (Log ₁₀) ^a
0	10 ^{7.35}
1	10 ^{5.7}
3	10 ^{1.00}

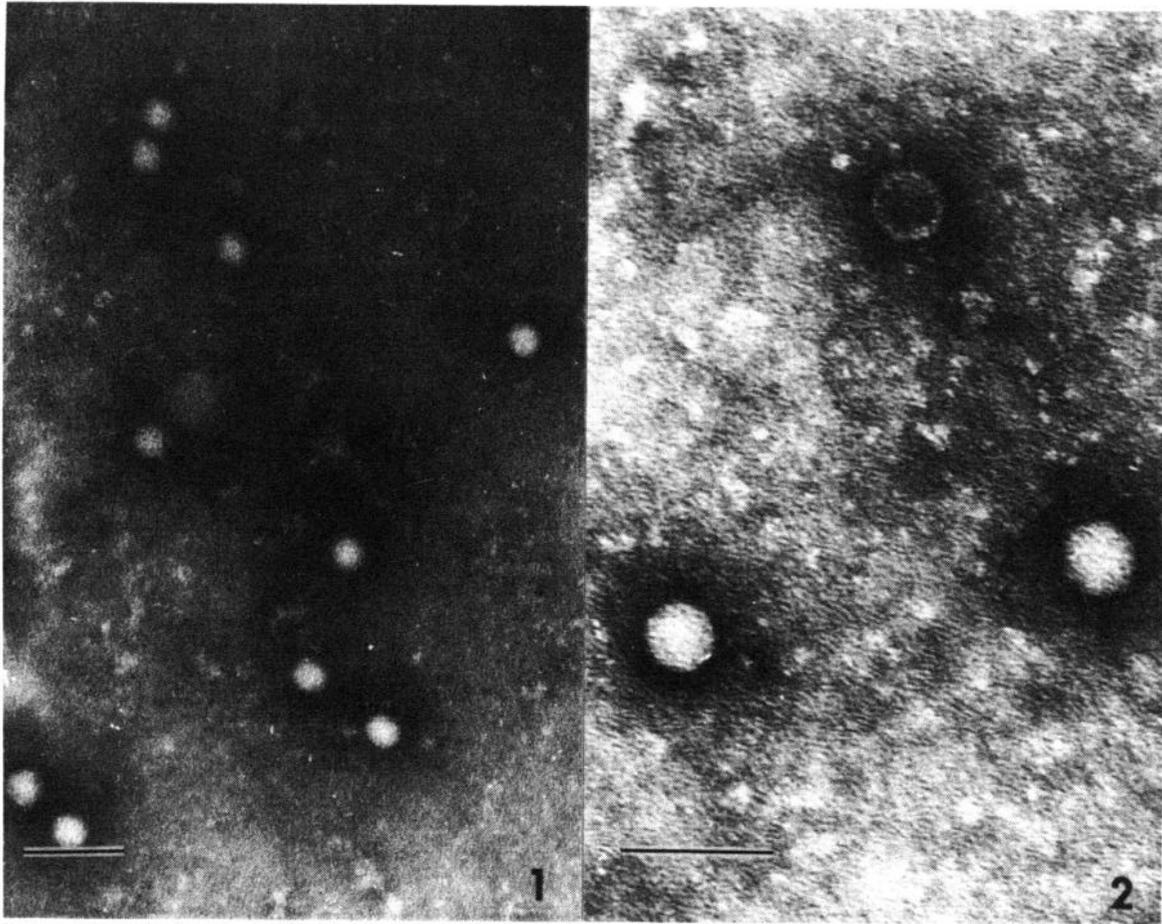
^a 10 cultivos de WI-38 en tubo/dilución.

después del almacenamiento durante tres meses se observó una pérdida considerable de título de virus infeccioso. Al disminuir la temperatura de almacenamiento a -90°C la tasa de pérdida fue menor.

Se investigó la estabilidad del virus CR69(076) infeccioso después de la exposición a 60°C durante una hora. Se hicieron diluciones de CR6(076) y ECHO 25 en agua desionizada esterilizada, se incubaron al baño María a 60°C durante una hora, se colocaron en un baño de hielo y luego se inocularon en cultivos de células WI-38, utilizando el medio más apropiado para cada tipo de virus. No se halló indicación alguna de ECP en cultivos inoculados con diluciones de ECHO 25 expuestos a 60°C , si bien se observaron esos efectos con diluciones similares mantenidas a 20°C . En cambio, en uno de cuatro cultivos de células WI-38 inoculados con una dilución de 10-2 de CR69(076) se demostró la presencia de ECP (confirmados por el pase) después de la exposición a 60°C durante una hora. No se registraron ECP con otras diluciones. De manera análoga, se ha informado de la ausencia completa de inactivación después de la exposición a 60°C durante una hora con el agente HeA de los monos tití (5).

El CR69(076) no mostró ninguna pérdida en el título de infecciosidad después de la exposición durante toda la noche a éter dietílico al 20% a 4°C o después de tres horas de exposición a un pH de 3.0 a 20°C , cuando se comparó con los testigos no tratados. La proliferación en células previamente expuestas a BrDUR (20 μg /ml)

^oNorth American Biologicals, Inc.



LAMINAS 1 y 2—Muestras representativas de partículas de virus obtenidas de cultivos congelados y descongelados, centrifugados para sedimentar los residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 150,000 revoluciones por hora por tres horas y el gránulo resultante se suspendió en formalina al 10% y teñida negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%. La barra de la lámina 1 representa 100 nm, y la de la lámina 2, 60 nm.

confirmó su composición de ácido ribonucleico.

Las micrografías electrónicas de líquidos de cultivo celulares infectados con CR69-(076) concentrado revelaron la presencia de partículas icosaédricas con diámetros de 29 nm, aproximadamente, dentro del margen de tamaños de los picornavirus y que concordaban con el antígeno viroide antes descrito (6) (láminas 1 y 2).

Relación del CR69(076) con los enterovirus conocidos

El CR69(076), ensayado con antisueros enterovíricos de tipo específico mediante la neutralización no produjo inhibición alguna con antisueros de virus ECHO de tipo 1-24, 26, 27, 29-32; el grupo A Coxackie, tipos 1-3, 9; el grupo B Coxackie, tipos 1-6, y

virus poliomiéltico tipos 1-3. Se observó que el antisuero de conejo de virus ECHO de tipo 25 neutralizaba 100 $DICT_{50}$ de CR69(076) a una dilución de 1:400. El título de anticuerpos neutralizantes de este mismo antisuero se determinó en 1:10,000 frente a 1,000 $DICT_{50}$ del virus homólogo (JV-4).

El significado de esta observación es incierto porque se ha informado que el antisuero de virus ECHO tipo 25 es inhibidor para el virus ECHO tipo 12 a una dilución de 1:100 (13). Conviene mencionar también que se ha informado de relaciones cruzadas entre el grupo A Coxackie, tipos 3 y 8, 11 y 15 y 13 y 18; virus ECHO tipos 1 y 8, 12 y 29, 6 y 30, y en menor grado, virus poliomiéltico de tipo 1 y 2 (7). Se están llevando a cabo estudios de neutralización cruzada.

Relación del CR69(076) con el HeA

Se examinaron mediante los procedimientos de neutralización y fijación del complemento pares de sueros recogidos de casos ocurridos durante epidemias de hepatitis B (1964) y A (1967) en Costa Rica (8,9), utilizando como antígeno CR69(076) (cuadro 3). En 20 pares de sueros recogidos durante la epidemia de 1964 (hepatitis B) solo un individuo mostró un aumento significativo del nivel de anticuerpos del suero de convaleciente. En cambio, la investigación de pares de sueros de la epidemia de 1967 reveló que 8 de 24 pares de sueros (33%) mostraban un aumento significativo de los niveles de anticuerpos de los sueros de convalecientes. Es interesante señalar que las investigaciones subsiguientes en relación con los sueros de antígeno australiano revelaron la naturaleza de las epidemias (9).

Discusión

La naturaleza enterovírica del agente HeA aislado en tífes (5), la demostración de un antígeno semejante al enterovirus en las heces de un voluntario humano afectado por HeA, mediante técnicas de microscopio electrónico (6), y la ausencia de aislamientos *in vitro* del agente etiológico indican que los procedimientos actuales de aislamiento de enterovirus tienen limitaciones a pesar de haberse aislado gran número de tipos enterovíricos. Por añadidura, la demos-

tración en el microscopio electrónico de partículas parecidas a orbivirus en muestras fecales de niños enfermos de diarrea y la imposibilidad de aislar esos agentes en muestras que, con los procedimientos acostumbrados, muestran una aparente positividad vírica, ponen de relieve la necesidad de obtener nuevos procedimientos de aislamiento de virus (14,15).

Este informe presenta datos relativos a un agente cuya presencia no se hubiera detectado con el empleo único de los procedimientos convencionales de aislamiento. Independientemente de la función del CR69(076) en la enfermedad, se considera que estas observaciones son significativas y que merecen más consideración en los casos en que las tentativas para aislar el agente etiológico de una enfermedad hayan sido infructuosas.

La concentración limitada de iones de hidrógeno en la que se reproduce mejor el agente CR69(076) constituye una característica singular, a diferencia de la atribuida a los tipos de enterovirus conocidos. Cabe suponer que, en principio, es aplicable a numerosos tipos de virus Coxsackie A que infectan al hombre pero que, hasta la fecha, solo han sido aislados en ratones recién nacidos, así como a los agentes de tipo vírico nuevos, como los orbivirus.

A juzgar por los resultados de las investigaciones, la acidez extrema no afecta la adsorción del virus a la superficie celular sino que más bien interfiere en su penetración. Aunque no se conoce a ciencia cierta el mecanismo de este fenómeno, se considera que la actividad enzimática es una posibilidad. El mecanismo estaría influido por una concentración de iones de hidrógeno existente. Una vez que se produce la penetración, el ambiente extracelular existente no parece afectar la reproducción del virus. Se supone que se produce una situación análoga cuando el ambiente extracelular está dentro del margen alcalínico de neutralidad.

Las investigaciones indican también que

CUADRO 3—Respuestas de anticuerpos de CR69(076) en pares de sueros procedentes de casos de hepatitis (Costa Rica).

Año	Hepatitis de tipo epidémico	No. de pares ensayados	No. de pares con aumentos significativos de anticuerpos ^a
1964	B	20	1(5)
1967	A	24	8(33)

^a Cuatro veces mayores o más en el suero de convaleciente.

el CR69(076) es un virus entérico, por su tamaño y la morfología de las partículas, composición de ácido nucleico, estabilidad del éter, reproducción óptima a 36°C, resistencia de un pH ácido, así como por los ECP producidos. Además, posee características distintas de las de los tipos de virus entéricos conocidos. Así lo demuestran su limitado espectro de células huéspedes y su reproducción también limitada dentro de un estrecho margen de pH en el lado ácido de la neutralidad, su imposibilidad de reproducirse en condiciones alcalinas o sumamente ácidas y su relativa inestabilidad en las circunstancias de almacenamiento antes descritas. Basados en estas observaciones se considera que el CR69(076) puede ser el prototipo de cepa de un nuevo grupo vírico.

Las propiedades fisicoquímicas del CR69(076) son muy similares a las descritas con respecto al virus HeA aislado en monos títí (5). Los estudios de filtración de este último indican que posee un tamaño de partículas menor de 5 nm pero mayor de 25 nm. Los estudios inmunológicos con el microscopio electrónico de muestras fecales de un voluntario afectado por HeA vinieron a corroborar el carácter enterovírico de este organismo (6). Estos estudios detectaron un agente viroide con una morfología icosaédrica y un tamaño medio de las partículas de 27 nm. Las micrografías electrónicas de CR69(076) (láminas 1 y 2) revelaron también una morfología icosaédrica y un tamaño medio de las partículas de 29 nm, similar al de los enterovirus e indistinguible del correspondiente al antígeno viroide descrito (5).

Estos datos, junto con la fuente de CR69(076) y este antígeno viroide, advierten la necesidad de estudiar con más detenimiento la relación entre estos agentes aunque no se haya demostrado una similitud antigénica.

En la actualidad no se puede afirmar que existe una relación etiológica entre CR69(076) y el HeA basados en un solo aisla-

miento vírico de un caso de HeA y nueve respuestas inmunológicas de casos de la enfermedad. No cabe duda pues, que se requieren más investigaciones en el sentido indicado.

La existencia de tipos múltiples de virus HeA debería tenerse en consideración al evaluar las relaciones entre los diversos aislados de HeA notificados y con la propia enfermedad. A este respecto, basta recordar la búsqueda del virus del catarro común, su primer aislamiento por el autor de este estudio y sus colaboradores (16) y la existencia actual de por lo menos 100 tipos serológicos distintos. Es concebible que el CR69(076) no haya sido el tipo de virus prevaleciente en la epidemia de 1967; y las respuestas serológicas obtenidas en el 33% de los pares de sueros de casos de hepatitis clínica pueden representar infecciones causadas por un segundo tipo de virus presente en pequeña escala en una zona geográfica de endemicidad conocida (9). Además, la propia naturaleza de la hepatitis dificulta el diagnóstico serológico, particularmente si el individuo infectado experimentó una prolongada fase aguda o preictérica⁷ del síndrome. En estas circunstancias es razonable suponer que la respuesta inmunitaria ya ha sido provocada en el momento en que aparece la ictericia, el paciente acude al médico y se toman las apropiadas muestras de suero para su estudio. Es posible que, en estas condiciones, ya se haya llegado al nivel máximo de anticuerpos, o que si se detectaron aumentos no estuvieran dentro del margen que se considera significativo. Es evidente, aunque tal vez no se ajuste a la realidad, que las muestras de suero en el período inicial o agudo han de recogerse al comienzo de las fases preictéricas de la enfermedad para que permitan una evaluación serológica verdadera.

También debe considerarse el problema del aislamiento de otras cepas de virus

⁷ La fase de la enfermedad que precede a la aparición de la ictericia.

CR69(076). Durante el presente estudio, es posible que haya ocurrido una pérdida de título de infecciosidad vírica a consecuencia del almacenamiento prolongado de las muestras. Este aspecto sería muy crítico, particularmente si se excretara virus a bajo nivel en el momento de obtener las muestras y si estas se recogieran en las fases tardías de la enfermedad. Se considera que sería más provechosa la investigación de muestras fecales recientes, obtenidas en el momento más cercano posible al comienzo de la ictericia. Los estudios realizados en voluntarios han indicado que la excreción de virus cesa aproximadamente una semana después de la manifestación de ictericia (17). Los autores han observado que a menudo los enfermos no acuden al médico hasta después de varios días de sufrir ictericia. Debido al curso clínico, la obtención de una muestra apropiada parece constituir un problema aún más crítico en las investigaciones etiológicas del HeA que en las de otras enfermedades asociadas con enterovirus. Por lo tanto, es evidente la necesidad de ampliar las investigaciones en este campo.

Resumen

En una muestra fecal de un niño costarricense de siete años de edad que presentaba hepatitis clínica se aisló un agente enteroviroide, que se denominó CR69(076), cuyas propiedades diferían de las que poseen los enterovirus conocidos y que requería unas condiciones desacostumbradas para su proliferación. El agente, aislado en cultivo de células WI-38, se reproducía mejor en un margen estable y relativamente estrecho de pH ofrecido por el medio de mantenimiento. Cuando se emplea un medio de una concentración de iones de hidrógeno superior a un pH de 7.0 o que resulte excesivamente baja, la reproducción del agente es escasa o nula.

No se trata de un agente rinovírico, pues es acidostable y la temperatura óptima para su reproducción es de 36°C. El CR69-

(076) no infectó al espectro acostumbrado de células huésped que resultan susceptibles a la infección de numerosos tipos de enterovirus. Además del espectro celular limitado, el agente es relativamente inestable a -70°C en las condiciones que se emplearon para almacenamiento.

El tamaño de las partículas de ese agente es de 29 nm, aproximadamente, y poseen una morfología icosaédrica. Asimismo es resistente al éter y posee un núcleo de ácido ribonucleico. Aunque se observó cierta antigenicidad cruzada con anticuerpo de virus ECHO tipo 25, no ocurrió lo mismo con los antisueros de otros enterovirus ensayados.

Además de su aislamiento en un caso de HeA, los pares de sueros de nueve casos de HeA ocurridos en Costa Rica mostraron también un aumento de los niveles de anticuerpos. Asimismo se observó que muchas de las propiedades del CR69(076) eran similares a las descritas en relación con el agente de la hepatitis A aislado en monos tití y hallado por los investigadores de los Institutos Nacionales de Salud de E.U.A. en las heces de un voluntario afectado por la misma enfermedad. □

ADDENDUM

En un esfuerzo por obtener otros aislamientos de virus, se inocularon en cultivos de células WI-38, utilizando los métodos descritos, 160 especímenes de heces, orina y biopsias hepáticas procedentes de casos de hepatitis clínica ocurridos en Costa Rica y en los Estados Unidos desde 1963 hasta la fecha. Aunque los estudios están todavía en marcha, se han obtenido ya aislamientos víricos de un espécimen de biopsia hepática, otro de orina y dos de heces. Las tentativas realizadas anteriormente para aislar agentes de estos mismos especímenes resultaron infructuosas cuando fueron inoculados en cultivos de células WI-38 y de monos rhesus en las condiciones de cultivo acostumbradas para el aislamiento de enterovirus. No se ha determinado todavía la relación de estos aislados recientes con el CR69(076).

REFERENCIAS

- (1) Green, M. Major groups of animal viruses. En: Frank L. Horsfall e Igor Tamm (eds.). *Viral and Rickettsial Diseases of Man*. Filadelfia, Lippincott, 1965, págs. 11-18.
- (2) Kapikian, A. Z. Rhinoviruses. En: Edwin H. Lenette y Nathalie J. Schmidt (eds.). *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*. Nueva York, American Public Health Association, 1969, págs. 603-640.
- (3) Tyrrell, D. A. J. Rhinoviruses. En: S. Gard, C. Hallauer y K. F. Myer (eds.). *Virology Monographs* (Volumen 2). Nueva York, Springer-Verlag, 1965, págs. 67-124.
- (4) Mascoli, C. C.; O. L. Ittensohn; V. M. Villarejos; J. A. Arguedas; P. L. Provost, y M. R. Hilleman. Recovery of hepatitis agents in the marmoset from human cases occurring in Costa Rica. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:276-282, 1973.
- (5) Provost, P. J.; O. L. Ittensohn; V. M. Villarejos; J. A. Arguedas, y M. R. Hilleman. Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:1257-1267, 1973.
- (6) Feinstone, S. M.; A. Z. Kapikian, y R. H. Purcell. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028, 1973.
- (7) Melnick, J. L., y H. A. Wenner. Enteroviruses. En: Edwin H. Lenette y Nathalie Schmidt (eds.). *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*. Nueva York, American Public Health Association, 1969, págs. 529-602.
- (8) Villarejos, V. M., W. Pelon, B. Picado, J. G. Ortiz, R. Jiménez, y H. Navas. Epidemiologic investigation of an outbreak of infectious hepatitis in Costa Rica. *Am J Epidemiol* 84:457-466, 1966.
- (9) Villarejos, V. M.; Gutiérrez, y W. Pelon. Identification of a type B hepatitis epidemic in Costa Rica. *Am J Epidemiol* 96:372-378, 1972.
- (10) Pelon, W. Studies on the etiology of infectious hepatitis. En: *Department of Tropical Medicine and Medical Parasitology, LSU Medical Center, Annual THEMIS Progress Report for 1972*. Washington, D.C., US Army Medical Research and Development Command, 1972, págs. 29-36. (DADA 17-68-C-8023.)
- (11) Leibovitz, A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am J Hyg* 78:173-180, 1963.
- (12) Cristofalo, V. J., y Kritchevsky. Growth and glycolysis in the human diploid cell strain WI-38. *Proc Soc Exp Biol Med* 118:1109-1113, 1965.
- (13) Rosen, L.; J. Kern, y J. A. Bell. Observations on an outbreak of infection with a newly recognized enterovirus (JV-4). *Am J Hyg* 79:1-6, 1964.
- (14) Bishop, R. E.; G. P. Davidson; I. H. Holmes, y B. J. Buck. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283, 1973.
- (15) Bishop, R. F.; G. P. Davidson; I. H. Holmes, y B. J. Buck. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1:149-151, 1974.
- (16) Pelon, W.; W. J. Mogabgab; I. A. Phillips, y W. E. Pierce. Cytopathogenic agent isolated from recruits with mild respiratory illnesses. *Bacteriological Proceedings*, 1956, pág. 67. (Actas de la 56ª Reunión General de la Sociedad Americana de Microbiología, Houston, Texas, 29 de abril-3 de mayo de 1956.)
- (17) Krugman, S., y R. Ward. Hepatitis viruses. En: R. Debré y J. Celers (eds.). *Clinical Virology*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1970, págs. 285-299.

Hepatitis A: *In Vitro* isolation of an agent with unusual growth requirements from a clinical case occurring in Costa Rica (Summary)

An enterovirus-like agent, designated CR69-(076) and possessing properties unlike the known enteroviruses as well as an unusual growth requirement, was isolated from a fecal sample collected from a seven-year-old male Costa Rican experiencing clinical hepatitis. The agent, isolated in cultures of WI-38 cells, replicates best within a stable and relatively narrow pH range provided by the maintenance medium. Little or no replication has been observed when

the medium has a pH above 7.0 or an excessively acid pH.

The agent is not a rhinovirus, being acid-stable and replicating best at a temperature of about 36°C. Moreover, it failed to infect a spectrum of cells usually susceptible to infection by enterovirus types, and proved relatively unstable when stored at a temperature of -70°C under conditions described in the text.

CR69(076) has a particle diameter of ap-

proximately 29 nm and an icosahedral morphology. It is ether-resistant and possesses a ribonucleic acid core. Although some antigenic crossing was noted when it was tested with antiserum to ECHO virus type 25, no inhibition was noted when it was tested with antisera to other enteroviruses.

Besides being isolated from a case of hepatitis A, the agent prompted an increased anti-

body response in paired sera from nine cases of hepatitis A in Costa Rica. Furthermore, many of the properties of CR69(076) were found to be similar to those described for the hepatitis A agent isolated in marmosets and previously observed in the feces of a volunteer with hepatitis A by investigators at the United States National Institutes of Health.

Hepatitis A: Isolamento *in vitro* de um agente com raras propriedades de proliferação, em caso clínico ocorrido na Costa Rica (Resumo)

Isolou-se, numa amostra fecal de um menino costarricense de sete anos de idade com hepatite clínica, um agente enterovirótico que se denominou CR69(076), cujas propriedades, além de diferir das apresentadas pelos vírus entéricos conhecidos, requeriam condições incomuns para sua proliferação. O agente, isolado em cultivo de células WI-38, reproduzia-se melhor num âmbito estável e relativamente estreito de pH proporcionado pelo meio de manutenção. Mínima ou nula é a reprodução do agente quando se emprega um meio de concentração de íons de hidrogênio superior a um pH de 7,0 ou um pH excessivamente ácido.

O agente não é rinovirótico por ser ácido-estável e porque a temperatura ótima para sua reprodução é de 36° C. Além disso, não infectou o espectro de células costumeiramente suscetíveis de infecção por variedades de vírus entéricos e se mostrou relativamente instável ao

ser armazenado sob uma temperatura de -70° C, em condições descritas no texto.

O diâmetro das partículas do agente CR69(076) é de cerca de 29 nm, com uma morfologia icosaédrica. O agente também é resistente ao éter e possui um núcleo de ácido ribonucleico. Embora se tenha observado certa antigenicidade cruzada com o anticorpo de vírus ECHO tipo 25, o mesmo não ocorreu com anti-soros de outros vírus entéricos testados.

Além de serem isolados de um caso de hepatite A, em nove casos dessa doença na Costa Rica os pares de soros também revelaram um aumento dos níveis de anticorpos. Além disso, constatou-se que muitas das propriedades do CR69(076) eram semelhantes às que se descreveram com relação ao agente da hepatite A isolado em sagüis e encontrado nas fezes de um voluntário afetado pela mesma doença, através de uma pesquisa realizada pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos.

Hépatite A: Isolement *in vitro* d'un agent à rares propriétés de prolifération chez un cas clinique survenu au Costa Rica (Résumé)

Il a été isolé dans un échantillon fécal d'un enfant costaricain de sept ans qui souffrait d'hépatite clinique, un agent entéroviroïde, appelé CR69(076) dont les propriétés différaient de celles que possèdent les entérovirus connus et qui pour proliférer exigeait des conditions inhabituelles. L'agent, isolé dans des cultures de cellules WI-38, se reproduisait mieux dans une gamme stable et relativement étroite de pH que fournissait le milieu de maintien. Lorsque le milieu a un pH supérieur à 7 ou une acidité pH excessive, la reproduction de l'agent est faible ou nulle.

Il ne s'agit pas d'un rhinovirus puisqu'il a une acidité stable et que sa température idéale de reproduction est de 36° C environ. En outre, il n'a pas infecté un spectre de cellules d'ordinaire vulnérables à l'infection de nombreuses catégories d'entérovirus, et il s'est avéré relativement instable à une température de

-70° C dans les conditions décrites de stockage.

Le CR69(076) a des particules dont le diamètre est d'environ 29 nm et dont la morphologie est icosaédrale. Il est résistant à l'éther et possède un noyau d'acide ribonucleique. Bien qu'on ait constaté une antigénicité croisée avec l'anticorps de virus ECHO du type 25, aucune inhibition ne s'est produite avec les antiséras d'autres entérovirus expérimentés.

Mis à part son isolement d'un cas d'hépatite A, l'agent a provoqué une réaction accrue d'anticorps dans les pairs de séra de neuf cas d'hépatite A au Costa Rica. De surcroît, bon nombre des propriétés du CR69(076) se sont avérées semblables à celles décrites pour l'agent d'hépatite A isolé chez des oustitis et constatées précédemment dans les matières fécales d'un volontaire atteint d'hépatite A par des chercheurs des Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis.