

# LOS POSTULADOS DE KOCH Y LA NEUROPATÍA EPIDÉMICA

✉ José de la Fuente, María Pilar Rodríguez, Fidel O Castro, Jorge Berlanga, Eileen Riego, Orlando Hayes, Alexis Musacchio y Ricardo Lleonat

Grupo para el Estudio de la Neuropatía Epidémica  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162,  
Ciudad de La Habana, C.P. 10600, Cuba.

## ABSTRACT

During 1992-1993 Cuba was affected by an epidemic neuropathy (EN) classified as a new emerging disease. Toxic, nutritional and biological factors were argued to be involved in the etiology of the disease. The toxic-nutritional hypothesis was supported by some laboratory evidences and may acted as a predisposing cause for the disease. In the search for biological agents, samples of the cerebrospinal fluid from patients and controls were analyzed and a slow cytopathic effect was detected in 93 % of the patient's sample. The characterization of the virus indicated that it was a picornavirus and suggested that it was probably a mutated enterovirus or a new unidentified virus. Preliminary experiments suggested that the virus associated with the EN fulfilled the Koch's postulates. Our hypothesis is that the etiology of the EN could be related with nutritional deficits and stress that made the population more susceptible to the appearance of clinical symptoms because of the infection with a virus, responsible for the neurological injury through a probable autoimmune reaction against structures of the nervous system, that otherwise, would be asymptomatic. This paper is not intended to assay our hypothesis but rather to summarize our preliminary results and to promote scientific debate.

Key words: neuritis, picornavirus, enterovirus, monkey

*Biotecnología Aplicada 1997;14:137-141*

## RESUMEN

Durante 1991-1993 Cuba fue afectada por una epidemia de neuropatía (NE) con características particulares que hicieron se clasificara como una nueva enfermedad emergente. Se sugirieron diferentes hipótesis sobre la etiología de la enfermedad con la participación de factores tóxico-nutricionales y biológicos. La hipótesis tóxico-nutricional fue respaldada por algunas evidencias de laboratorio y puede haber actuado como una condición de base para la enfermedad. En la búsqueda de agentes infecciosos dentro del cuadro de la epidemia, se analizaron muestras de líquido céfalo-raquídeo de pacientes y controles sanos, y se detectó un efecto citopático ligero en el 93 % de las muestras de pacientes. La caracterización de este virus permitió clasificarlo como un picornavirus y sugerir que se trataba posiblemente de un enterovirus mutante o un virus no descrito previamente. Experimentos preliminares permitieron sugerir que el virus asociado con la NE cumple con los postulados de Koch. Nuestra hipótesis es que la etiología de la NE puede estar relacionada con déficits nutricionales y estrés que hicieron a la población más susceptible a la aparición de síntomas clínicos debido a la infección con un virus, responsable del daño neurológico que desencadenó posiblemente una reacción de tipo autoinmune dirigida a estructuras del sistema nervioso y que, de otra manera, hubiese sido asintomático. Este trabajo no pretende someter a prueba esta hipótesis, sino esbozarla a partir de los primeros resultados obtenidos y alentar al debate alrededor de un tema de tanta significación.

Palabras claves: neuritis, picornavirus, enterovirus, mono

"Fíjense cómo nos sorprendió el misterio de la neuropatía, cosa muy rara también, rarísima, y de todo eso recogimos bastante información, porque eran constantes las reuniones, los análisis y las pruebas. Sobre la marcha hubo que librar la guerra de la neuropatía, que apareció de una manera rara en un lugar y después por otro. Todavía guarda misterios..."

Fidel Castro Ruz (discurso pronunciado en la clausura del XI Foro de Ciencia y Técnica el 21 de diciembre de 1996. Fuente: *Granma*, 24 de diciembre de 1996, pág. 5).

## Los postulados

En 1884 el bacteriólogo alemán Robert Koch definió un ensayo para probar que una determinada enfermedad es causada por un agente infeccioso (1, 2). Este ensayo, conocido como los Postulados de Koch, se ha convertido en una regla general para la investigación biomédica.

✉ Autor de correspondencia

Los postulados, según los definió el científico alemán, mantienen que:

- El germen debe encontrarse creciendo o haber crecido en todos los pacientes.
- El germen debe aislarse y multiplicarse en el laboratorio.

1. Joklik WK, Smith DT, Wheat RW, Willett HP. Desarrollo histórico de la microbiología médica. En: Zinsser Microbiología. Ed. por Joklik WK, Willett HP y Amos DB. Edición Revolucionaria, La Habana, Cuba. 1984;18-19.

2. Cohen J. Fulfilling Koch's postulates. *Science* 1994;66:1647.

Tabla 1. Caracterización de los virus aislados de pacientes con NE.

Característica	IG-28/IG-32	CoxA9 (cepa Griggs)*	HSV-1*
ECP	Lento, 80 % daño celular después de 6-10 días de cultivo	100 % efecto lítico en 1-2 días de cultivo	ND
Placas virales	Ø < 1 mm, circulares y aparición en 12-15 días	Ø 3-5 mm, circulares y aparición en 4/5 días	ND
Título viral promedio	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> UFP/mL	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup> UFP/mL	ND
Microscopía electrónica	Partículas esféricas no envueltas con Ø 28-30 nm, presencia de partículas vacías	Partículas esféricas no envueltas con Ø 28-30 nm, presencia de partículas vacías	ND
Densidad de flotación en CsCl	1,30 g/mL	1,34 g/mL	ND
Tratamiento con diferentes pHs	Resistente a pH 9, sensible a pH 3	Resistente a pHs 3-9	ND
Resistencia al calor en presencia de MgCl <sub>2</sub> 1 M	NR	R	ND
Tratamiento con 20 % de éter por 1 h	NR	R	R
Tratamiento con 1 % cloroformo por 1 h	NR	R	R
Tratamiento con 70-80 µg/mL hidrocloreuro de guanidina	R	NR	ND
Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CoxA9 de tejidos de animales inoculados	P	P	ND

\*Los virus coxsackie A9 (CoxA9) y herpes simplex 1 (HSV-1) se emplearon como controles de referencia.

ND: no determinado.

NR: no resistente.

P: positiva.

- El germen purificado debe causar la enfermedad cuando se inocule en otro hospedero.
- El germen debe ser reaislado de los animales experimentalmente infectados.

No obstante haberse demostrado su universalidad, varias enfermedades asignadas a virus como los virus lentos, el virus de la hepatitis C y el HIV-1 no cumplen con los postulados de Koch (3).

## La epidemia

Una epidemia de neuropatía que produjo síntomas centrales y periféricos ocurrió en Cuba entre 1991 y 1993; hasta octubre de 1993 fueron reportados alrededor de 50 000 casos. La enfermedad fue nombrada como neuropatía epidémica (NE) y presentó tres cuadros clínicos: uno puramente ocular (neuropatía óptica), otro en forma de neuropatía periférica y casos mezclados. La caracterización clínica y epidemiológica de la enfermedad ha sido publicada con anterioridad (4). No se reportaron muertes y la incidencia de la enfermedad decreció sustancialmente a partir de junio de 1993, fecha en que el Ministerio de Salud Pública comenzó a suministrar polivitaminas orales a toda la población.

Se sugirieron diferentes hipótesis sobre la etiología de la enfermedad con la participación de factores tóxico-nutricionales y biológicos. La hipótesis

tóxico-nutricional fue respaldada por algunas evidencias de laboratorio (4, 5) y puede haber actuado como una condición de base para la enfermedad. Las evidencias sobre la participación de agentes infecciosos en la enfermedad fueron apareciendo desde los comienzos del estudio (6-12).

Aunque varios hallazgos clínicos en la NE fueron consistentes con cuadros de neuropatías tóxicas o metabólicas, otros evidenciaron el compromiso de pequeñas fibras nerviosas en adición a las fibras largas de mielina, comúnmente involucradas en las neuropatías tóxico-metabólicas. Adicionalmente, la epidemia cedió sin cambios en los factores de riesgo que fueron identificados en los estudios de campo (disponibilidad de alimentos y hábito de fumar (5)), sugiriendo que otros factores pueden haber jugado un papel en la epidemia.

La disminución en los casos de la epidemia puede explicarse por la eliminación del agente predisponente (con la administración de las vitaminas orales por ejemplo), por la eliminación de susceptibles o por una combinación de ambos factores.

*Nuestra hipótesis es que la etiología de la NE puede estar relacionada con déficits nutricionales (complejo de vitaminas B por ejemplo) y estrés que hicieron a la población más susceptible a la aparición de síntomas clínicos debido a la infección con un virus que, de otra manera, hubiese sido asintomático.*

3. Duesberg PH. Inventing the AIDS virus. Regnery Publishing Inc. Washington, USA. 1996.

4. Autores varios. Neuropatía epidémica en Cuba 1992-1994. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, 1995.

5. The Cuban Neuropathy Field Investigation Team. Epidemic optic neuropathy in Cuba -clinical characterization and risk factors. The New England J of Medicine 1995;333:1176-1182.

Tabla 2. Diagrama de los análisis a los que fueron sometidos los monos según el grupo experimental.

Grupo experimental Mono	Virus en LCR (7 dpi)	Patología	Genética	Bioquímica	Memoria
Vit-/V-					
ST	X		X	X	
C16		X			
4M		X			
840					X
Vit-/V+					
944	X	X	X	X	X
X5	X	X			
825	X				X
Vit+/V- (control sano)					
1		X	X	X	
2			X	X	

Monos verdes (*Cercopithecus aethiops*) se sometieron a una dieta deficiente en tiamina y una vez comprobada la depleción de vitamina B1 (Vit<sup>-</sup>), se inocularon con los aislamientos virales IG-28/93 o IG-32/93 (V<sup>+</sup>) o con solución salina para el caso de los controles (V<sup>-</sup>). Los controles sanos se mantuvieron con las condiciones de alimentación y manejo recomendadas para esta especie. Las cuadrículas sombreadas indican los análisis realizados a cada mono durante el experimento.

## El agente infeccioso

En la búsqueda de agentes infecciosos dentro del cuadro de la epidemia, se analizaron muestras de líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes y controles sanos. Se detectó un efecto citopático (ECP) ligero en el 93 % de las muestras de pacientes y en el 9 % de los controles cuando las muestras de LCR se inocularon en líneas celulares derivadas de riñón de mono verde africano (6). La terapia con interferón alfa-2b recombinante (Heberon-alfaR; Heber Biotec S.A., Habana, Cuba) redujo el por ciento de LCR con ECP (6, 7). Se detectaron además por amplificación de ADNc (RT-PCR) secuencias homólogas a enterovirus en el 36 % (40/111) de los pacientes y en el 8 % (1/12) de los controles (8).

Las características fundamentales de los virus aislados en la mayoría de los pacientes se describen en la Tabla 1.

De estos análisis derivamos las siguientes reflexiones:

- El agente viral es un picornavirus.
- Presenta similitudes y diferencias con los enterovirus.
- Puede ser un enterovirus mutante o un virus nuevo.
- En el cuadro de la epidemia, el virus debe jugar el papel fundamental en el daño neurológico.

## El ensayo

Al enfrentar los resultados obtenidos con los virus aislados de pacientes con NE a los postulados de Koch encontramos lo siguiente:

**Postulado 1: el virus se encontraba en la mayoría de los pacientes con NE**

1. Obtuvimos un 93 % de aislamientos virales en LCR de pacientes (6). Esto se considera sumamente alto para LCR. Adicionalmente, la posibilidad de sobrediagnóstico durante la epidemia puede explicar en alguna medida la diferencia con el 100 %.
2. Todos los sueros estudiados tenían anticuerpos contra la proteína VP0 del C-47/IPK (aislamiento que presenta similitudes antigénicas con los aislamientos encontrados en la mayoría de los casos de NE (6,9,12)). Sólo los sueros de los pacientes con NE mostraron anticuerpos tipo IgG y/o IgM/IgA contra la proteína VP1 del aislamiento C-47/IPK (9).
3. El hallazgo de un 9 % de ECP en los controles puede explicarse por las dificultades en seleccionar un verdadero control pues, como se demostró por estudios inmunológicos, el virus circuló en la población sin que ello se correlacionara con la aparición de síntomas clínicos (6, 9).

6. Rodríguez MP, Álvarez R, García del Barco D, López-Saura P, Hernández F, Labarta V, Falcón V et al. Characterization of virus isolated from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *J Med Virol* (in press) 1997.

7. López-Saura P, Hernández F, Labarta V, the Group for the Study of the Epidemic Neuropathy. Interferon alpha-2b in epidemic neuropathy. *J Interferon Res* 1994;14(Suppl. 1): S120.

8. Álvarez M, Muzio V, Marrero M, Barro M, Rosario D, Jomarrón L et al. Detection by polymerase chain reaction of enterovirus-like sequences in patients with epidemic neuropathy in Cuba. *Biotecnología Aplicada* 1995;12: 46-51.

9. Musacchio A, Herrera L, Rodríguez P, Álvarez R, González Griego M et al. Humoral immunological response of patients with epidemic neuropathy against a virus isolated from the cerebrospinal fluid of a clinical case. *Biotecnología Aplicada* 1995;12:141-151.

Tabla 3. Resultados distintivos en los monos inoculados con los aislamientos virales.

Virus en LCR (7 dpi)	Patología	Genética	Bioquímica	Memoria
Negativos <sup>a</sup>	Muerte neuronal en la región mesencefálica -Vacualización severa del SNC y SNP Miocarditis	↑ del índice de intercambio de cromátidas hermanas <sup>a</sup> ↓ del número de lulas en 2da división y del índice mitótico <sup>a</sup>	Signos de estrés oxidativo <sup>ab</sup>	Pérdida de la memoria a los 10 min <sup>ab</sup> . Se agrava después de la inoculación <sup>a</sup>

La Tabla resume los resultados obtenidos en los análisis realizados a los monos inoculados con los aislamientos virales IG-28/93 o IG-32/93 en el experimento recogido en la Tabla 2.

<sup>a</sup>Hallazgos similares a los encontrados en pacientes con NE (4).

<sup>b</sup>Resultados observados también en los monos con déficit vitamínico antes de la inoculación con los virus.

Postulado 2: el virus se multiplicó *in vitro* y se caracterizó parcialmente.

1. Los resultados recogidos en la Tabla 1 sustentan esta aseveración.

Postulado 3: resultados preliminares sustentan la posibilidad de que en monos verdes inoculados con los aislamientos IG-28/93 e IG-32/93 se reproduzcan algunos de los hallazgos hechos en pacientes con NE.

1. Los experimentos en monos verdes (*Cercopithecus aethiops*) se diseñaron buscando un modelo experimental que reprodujera en lo posible las condiciones que según nuestra hipótesis inciden de manera predominante en el desarrollo de la enfermedad: déficit vitamínico del complejo B (Vit), estrés y presencia del agente infeccioso (V<sup>r</sup>).

Los monos se sometieron a una dieta deficiente en tiamina y una vez comprobada la depleción de vitamina B1, se inocularon con los aislamientos virales IG-28/93 o IG-32/93 o con solución salina para el caso de los controles (V), y se sometieron, según se muestra en la Tabla 2 (cuadrículas sombreadas), a los análisis de presencia del virus en el LCR varios días después de la inoculación (dpi), anatomopatológicos, genéticos, bioquímicos y de memoria a los 10 min, entre otros (manuscrito en preparación).

Estos análisis arrojaron como resultados preliminares los recogidos en la Tabla 3 y permiten abordar un nuevo experimento que demuestre fehacientemente estos hallazgos.

Postulado 4: el virus se reaisló de monos verdes africanos infectados con el aislamiento IG-26/93.

En monos verdes africanos infectados por vía intratecal con 10<sup>5</sup> DICT<sub>50</sub> partículas virales infectivas del aislamiento IG-26/93 se reaisló el virus de sangre, 72 h después de la infección (12). En los experimentos descritos en las tablas 2 y 3 no se hicieron análisis de reaislamiento del virus a partir de sangre.

### La hipótesis patogénica

Nuestra hipótesis emplea dos elementos fundamentales:

1. Participación del estrés por déficit vitamínico y otras causas. El estrés puede aumentar la susceptibilidad a enfermedades incluyendo aquellas provocadas por infecciones virales (13).
2. Papel del virus en el daño neurológico. Como se muestra en la Tabla 4, el virus parece compartir determinantes antigénicos con componentes del sistema nervioso que pudieran propiciar una reacción autoinmune (algo similar a lo postulado por algunos para la esclerosis múltiple (14, 15)).

Estos primeros resultados nos permiten diseñar nuevos experimentos que profundicen en los mecanismos etiopatogénicos de la NE.

10. Falcón Y, Reyes J, Ancheta O, Rodríguez P, Baranosky N et al. Study by transmission electron microscopy of virus strains isolated from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Biocología Aplicada* 1994;11:151-159.

11. Riego E, Marrero M, Calvo E, Bringas R, Álvarez M, Mune M et al. Sequence analysis of coxsackie A9 viruses isolated during 1990-1994 in Cuba from patients with meningitis, myocarditis and epidemic neuropathy. *Biocología Aplicada* 1994;11:145-150.

12. Castro FO, Berlanga J, Alfonso Sabatier C, Rodríguez P, Hechevarría M, Hayes O et al. Evaluation in animal models of the neurovirulence of isolates from patients with epidemic neuropathy. *Biocología Aplicada* 1994;11:138-144.

13. Lidino J, Gold FW, Wong Ma-Li. A molecular mechanism for stress-induced alterations in susceptibility to disease. *The Lancet* 1995;346:104-106.

14. Rodríguez M. Multiple sclerosis: basic concepts and hypothesis. *Mayo Clin Proc* 1989;64:570-576.

15. Cohen AD, Shoenfeld Y. The viral-autoimmunity relationship. *Viral Immunology* 1995;8:1-9.

16. Berlanga J, Infante J, Capó V, de la Fuente J, Castro FO. Characterization of transgenic mice lineages. I. Overexpression of hGH causes the formation of liver intranuclear pseudoinclusion bodies and renal and hepatic injury. *Acta Biotechnol* 1993;13 (4):361-371.

Tabla 4. Caracterización de la reacción cruzada entre los virus y estructuras del sistema nervioso.

Suero	Muestra			
	Nervio sural de adulto sano	Nervio sural de adulto con NE	Nervio sural de feto	Tejidos de ratones inoculados con IG/28 o IG/32 (10)
Anti-C-47/IPK	+	+	-	+
Anti-IG-32/93	+	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Pacientes de NE	+	+	-	+
Individuos sanos	-	-	-	-

Antisueros policlonales obtenidos en conejo contra los aislamientos virales C-47/IPK e IG-32/93 y sueros procedentes de pacientes con NE y controles sanos fueron enfrentados en experimentos de inmunohistoquímica a cortes de nervio sural humano de adultos sanos y con NE y de fetos y de tejidos de ratones inoculados con los aislamientos virales IG-28/93 o IG-32/93 (12). El revelado se realizó empleando la técnica de proteína A-oro coloidal (16).

## Conclusiones

Las evidencias acumuladas hasta el presente sugieren con fuerza la participación de un agente infeccioso dentro del cuadro de la NE, el cual juega posiblemente el papel fundamental en el daño neurológico. Se puede proponer un mecanismo mediante el cual el virus desencadene una

reacción del tipo autoinmune dirigida a estructuras del sistema nervioso.

Las líneas de trabajo que de inmediato nos pueden llevar a una conclusión definitiva están encaminadas al estudio molecular del agente infeccioso, el desarrollo de un nuevo experimento en el modelo animal descrito y a un mayor completamiento de la hipótesis patogénica.

---

*Recibido en julio de 1996. Aceptado en enero de 1997.*