

ARTICULO ORIGINAL

Enterovirus no polio de casos con parálisis residual, Colombia, 1992-1995

Dioselina Peláez¹, Steven Oberste², Betty Brown³, Mark Pallansch⁴, Jorge Boshell⁵

Resumen

Las parálisis flácidas agudas (PFA) tienen una amplia variedad de orígenes y de agentes causales: físicos, fisiopatológicos, tóxicos e infecciosos. Entre estos últimos, el virus salvaje (silvestre) de la poliomielitis y el enterovirus 71 (EV71), parecen ser los agentes virales más frecuentes. Habiendo eliminado el poliovirus salvaje autóctono como agente causal de enfermedad paralítica en Colombia desde junio de 1991 y teniendo aislamientos de virus no polio en el 20,8% del total de casos de PFA notificados anualmente, quisimos conocer el papel que juegan los enterovirus en la incidencia de parálisis flácida aguda y la dinámica de circulación y distribución de los mismos en Colombia. Se revisó la base de datos de los casos notificados al Programa de Erradicación de la Poliomielitis en Colombia entre el 1° de enero de 1992 y el 31 de diciembre de 1995, al cual se notificaron 856 casos sospechosos de niños menores de 15 años, y se escogieron 69 casos para el estudio pero se recuperaron 57 aislamientos virales por reinoculación en células RD y Hep-2C. Estos se identificaron mediante neutralización con mezclas de antisueros de Lim & Benyesh-Melnick (LBM). Todos ellos fueron sometidos a caracterización molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa -PCR-, utilizando iniciadores complementarios a la región VP1 del genoma viral, seguida del análisis de secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados por PCR. La identificación final del serotipo se realizó por comparación de nucleótidos en *auto assembler* y el análisis descriptivo de los datos. No se estableció circulación mayor de ningún serotipo específico en región geográfica alguna del país. Tampoco hubo asociación causal a ninguna patología característica con ninguno de los enterovirus aislados. Se describe el hallazgo de EV71 en un caso de PFA con diagnóstico clínico de síndrome de Guillain-Barré. La descripción de 22 serotipos diferentes de enterovirus no polio que circulan en Colombia (19 serotipos identificados por métodos moleculares y 3 por seroneutralización), coincide con los serotipos más frecuentemente descritos en otros estudios. Los serotipos Coxsackievirus B5, B1, B3, Echovirus 6, 7, 13, 20, 30, Coxsackievirus A2, A10, A14, A16, A18, A21, fueron los serotipos de enterovirus más frecuentes en Colombia durante el período 1992-1995.

Palabras clave: parálisis flácida aguda, parálisis residual, enterovirus no polio, enterovirus 71.

¹ Bacterióloga, Sección de Virología, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

² Biólogo molecular, Sección de Enterovirus, CDC, Atlanta, GA, USA.

³ Biólogo molecular, Sección de Enterovirus, CDC, Atlanta, GA, USA.

⁴ Jefe, Sección de Enterovirus, CDC, Atlanta, GA, USA.

⁵ Jefe, Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

Recibido junio 11 de 1999, aceptado junio 24 de 1999

Non-polio enterovirus from residual paralysis cases, Colombia, 1992-1995

Abstract

Acute flaccid paralysis (AFP) has a wide variety of primary sources and causal agents: physical, physiopathological, toxic and infectious agents. Amongst the latter, Wild Poliovirus and Enterovirus 71 (EV71) are the most frequently isolated agents. After the elimination of native wild poliovirus in Colombia in June, 1991 as the major cause of paralytic illness and having a collection of non-polio enterovirus isolates from 20.8% of the total AFP cases annually notified, there was the need to define non-polio enterovirus role in AFP incidence and the dynamics of their circulation and distribution in Colombia. During 1992-1995, the Epidemiological Surveillance System for Flaccid Paralysis notified 856 cases in children less than 15 years old, of which 69 cases were the object of the present study. 57 isolates were recovered from RD and Hep-2 C cells. Serotype identification was made by neutralisation tests using LBM mixtures (antisera A to H) and molecular characterisation by Polymerase Chain Reaction (PCR) using complementary primers (viral genome VP1 region) followed by amplified fragment sequencing. Data analysis was done by means of descriptive analysis. No association of old circulation for a specific serotype within a determined geographical region was established, nor was there any causal association with a specific pathology. The presence of an EV 71 isolate in a Guillain-Barré Syndrome case is described. The description of 22 different serotypes of non-polio enteroviruses circulating in Colombia (19 serotypes were identified by molecular methods and 3 by seroneutralisation test) agree with the most frequently found serotypes as described in other studies. The Coxsackievirus B5, B1, B3, Echovirus 6, 7, 13, 20, 30 and Coxsackievirus A2, A10, A14, A16, A18, A21 serotypes were the most frequently found in Colombia during 1992-1995.

Key words: Acute flaccid paralysis, residual paralysis, non-polio enterovirus, Enterovirus 71.

Introducción

Los enterovirus son causa de variados cuadros clínicos en el humano que van desde los casos asintomáticos hasta aquellos muy graves. Son responsables de poliomielitis parálítica y polioencefalitis, meningitis y encefalitis asépticas, miositis, miocarditis, pleurodinia, herpangina, aftosa en humanos, enfermedad respiratoria, conjuntivitis, enfermedades crónicas como síndrome de fatiga crónica, miocarditis y cardiomiopatía dilatada (1-4).

Entre las entidades clínicas asociadas a los enterovirus, las parálisis flácidas probablemente son las más significativas, pues algunas veces dejan dramáticas lesiones permanentes del sistema nervioso central o terminan con muerte del paciente. Los poliovirus 1, 2 y 3 (cepas salvajes) son los más conocidos, quizás los más

neurovirulentos y los agentes etiológicos de la poliomielitis. Cuando se presenta parálisis debido al virus de la polio, ésta es flácida, generalmente precedida de síntomas de enfermedad leve y sin pérdida de la sensibilidad, los MMII se ven más comúnmente afectados que los MMSS y los grandes grupos musculares de la mano corren más riesgo que los pequeños. La parálisis es generalmente asimétrica, y aunque puede haberla en cualquier combinación de extremidades, la modalidad más común es la parálisis de una pierna. En las formas parálíticas, la probabilidad de morir oscila entre el 2 y el 20%, pero en las formas con compromiso bulbar o respiratorio, la letalidad se estima en cerca del 40 % (1, 4, 5-9).

A raíz de la Campaña de Erradicación de la Poliomielitis liderada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), hoy la parálisis infantil debida a la infección por poliovirus salvaje

autóctono no ocurre en la región de las Américas desde agosto de 1991, fecha en la cual se detectó el último caso en Junín, Perú. El Laboratorio de Enterovirus y Polio del Instituto Nacional de Salud de Colombia, INS, ha apoyado esta campaña desde sus inicios en 1985 hasta la fecha, cuando la OPS seleccionó al INS como laboratorio regional de referencia. El INS está encargado del procesamiento de las muestras de heces de todos los casos de PFA notificados al Programa de Vigilancia colombiano y ecuatoriano, es decir, aísla los virus y realiza su identificación y determina si se trata de cepas salvajes o cepas derivadas de vacuna (1,4,8,9).

Desde el punto de vista clínico, el Programa de Erradicación de la Poliomiélitis se dirige a los casos de parálisis flácida aguda (PFA) en menores de 15 años. Se excluyen aquí las PFA por traumas, tumores y enfermedades degenerativas de la motoneurona (1,7,10). En Colombia cada año se notifican al Programa de Vigilancia Epidemiológica para la Erradicación de la Poliomiélitis un promedio de 214 casos de PFA, de los cuales el 40% presenta parálisis residual. El 20,8% de éstos tiene aislamiento de virus no polio.

Con la eliminación del poliovirus salvaje nativo en Colombia a partir de mayo de 1991, fecha en la que se detectó el último caso colombiano de poliomiélitis por poliovirus salvaje en Arjona, Bolívar, quisimos conocer el papel que juegan los enterovirus no polio (ENP) en la incidencia de las parálisis flácidas agudas en menores de 15 años de edad, como también la dinámica de circulación y distribución de los diferentes serotipos de enterovirus en el país. Se conocen varios serotipos de ENP con habilidad para causar cuadros paralíticos similares al producido por el virus polio, como son: Coxsackie A7(CA7), Coxsackie A16, enterovirus 70 (EV70), Echo 7(EC7), pero el más frecuentemente asociado a estos ha sido el enterovirus 71 (EV71) (1,2,4,11-15).

Este trabajo propuso la búsqueda de EV 71 en casos de PFA con parálisis residual y la identificación de otros serotipos que casual o causalmente estuvieran asociados a la enfermedad paralítica, como también la

descripción de los diferentes serotipos de enterovirus circulantes en el territorio colombiano durante el período comprendido entre 1992 y 1995.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio epidemiológico retrospectivo en el cual se revisaron 856 historias clínicas de casos con parálisis flácida aguda de niños menores de 15 años de edad notificados al Programa de Erradicación de la Poliomiélitis entre el 1º de enero de 1992 y el 31 de diciembre de 1995.

Se seleccionaron 69 casos de parálisis residual con aislamiento de virus no polio y diagnóstico diferente a poliomiélitis paralítica realizado por el Comité de Análisis de las PFA del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) del Ministerio de Salud.

La identificación de los serotipos de enterovirus se realizó utilizando dos técnicas: neutralización con mezclas Lim & Benyesh Melnick de antisueros y caracterización molecular de los mismos mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR, utilizando iniciadores complementarios a la región VP1 del genoma viral seguida de secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR (16,17). La identificación final del serotipo se realizó por comparación de la secuencia de nucleótidos en "auto assembler".

Recuperación viral por cultivos celulares. Se recuperaron 57 aislamientos en cultivo de líneas celulares. Las suspensiones virales permanecían conservadas en el banco de virus de la Sección de Virología del INS. Se utilizaron las líneas celulares RD (células de Rhabdomyosarcoma embrionario humano) y Hep-2 C (células de carcinoma epidermoide de laringe humano). Las células fueron crecidas en medio de *minimum essential* (MEM- SIGMA) enriquecido con 10 % de suero bovino fetal de SIGMA adicionado de solución de bicarbonato de sodio al 7,5% y solución de antibióticos penicilina/estreptomina 1000 U/ml y 1000 (g/ml, respectivamente (SIGMA). Los tubos de las monocapas se infectaron con 0,2 ml de suspensión viral y fueron mantenidas con MEM con 2% de suero bovino

fetal. La incubación de los cultivos se llevó a cabo a 35°C con atmósfera de CO₂ al 5%.

Titulación viral. Una vez replicados y recuperados, los 57 aislamientos fueron congelados y descongelados tres veces para asegurar la liberación de las partículas virales. Se determinó el título (TCID₅₀) de 36/57 virus preparando diluciones del virus desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹ y utilizando la misma línea celular en que se efectuó el aislamiento. La titulación se realizó en microplaca de 96 pozos de fondo plano, incubando a 35°C en atmósfera de CO₂ al 5% y siguiendo el manual de procedimiento. La lectura se hizo a los seis días de incubación y el título viral se obtuvo aplicando la fórmula de Reed y Muench (18).

Identificación de enterovirus por neutralización con mezclas de antisueros LIM & BENYESH-MELNICK. Se intentó la serotipificación de 36 de las 57 cepas virales mediante neutralización con mezclas de antisueros anti-enterovirus de Lim & Benyesh-Melnick (LBM) preparadas en 1973 por J. Melnick (16,18). Las mezclas tipificadoras fueron compradas al Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca, y se siguieron las instrucciones del inserto para su uso. Se utilizaron microplacas de 96 cavidades de fondo plano, enfrentando 50 µl de suspensión viral con un título de 100 TCID₅₀ a cada una de las mezclas LBM. La observación del efecto citopático (ECP) se realizó diariamente y la lectura final fue registrada el día séptimo.

Estudios moleculares. Antes de iniciar los ensayos moleculares se realizaron nuevamente pases en las líneas celulares RD (pase No.225) y Hep-2 C (pase No. 274) en el Laboratorio de Enterovirus del CDC. Se reinocularon monocapas de 36 horas de crecidas en medio MEM (GIBCO BRL), enriquecido con suero bovino fetal al 10% (HYCLONE) y adicionado de glutamina 2mM (GIBCO BRL), solución de bicarbonato de sodio al 7,5% (GIBCO BRL), Buffer HEPES 1M, (GIBCO BRL) y solución de antibióticos penicilina/estreptomina (GIBCO BRL). La cantidad de inóculo fue de 0,1 ml de suspensión viral. Se utilizó el medio de MEM enriquecido con suero bovino fetal al 2% (HYCLONE) como medio de

mantenimiento celular luego de la inoculación. El efecto citopático (ECP) apareció a partir del día primero y hasta el día séptimo de incubación a 35°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Sólo se cosecharon aquellas muestras que presentaron ECP+3 (75% de la monocapa con ECP). Los tubos cosechados fueron conservados a -20°C.

Extracción de ARN viral. El método utilizado fue el desarrollado por Chomczynski y Sacchi (19) que utiliza una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (reactivo TRIZOL L-S). Los 57 reaislamientos virales que se habían recolectado, se descongelaron para permitir la lisis celular; luego se centrifugaron a 1000 g por 5 minutos a 4°C y en un tubo estéril de microcentrífuga con capacidad de 1,5 ml libre de ARNasas se mezclaron 250 µl suspensión de virus más 750 µl de reactivo de TRIZOL L-S. Se agitó vigorosamente en Vortex por 10 segundos y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó nuevamente durante 10 segundos. Se dejó en incubación a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 1 µl de glicogen (20 µg/µl) y se mezcló brevemente. Se adicionaron 500 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C, se decantó el líquido sobrenadante y se añadieron 200 µl de etanol al 70%. Finalmente se centrifugó a 2.000g por 5 minutos a 4°C, se decantó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar el botón de ARN a temperatura ambiente. El ARN extraído se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNasas y se conservó a -20°C.

Preparación de ADN complementario (ADNc). La preparación de ADN complementario al ARN viral de las 57 muestras se realizó mediante transcripción reversa del ARN viral, mezclando en un tubo estéril de microcentrífuga de 0,5 ml, libre de ARNasas, 5 µl de ARN extraído y 1 µl de iniciador antisentido 10 mM, (algunas reacciones se realizaron utilizando el iniciador N6 25 mM Random hexamer primer de Boehringer Mannheim. La mezcla se calentó a 65°C por 2 minutos en baño de agua y se enfrió luego a

temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó a 3.000g por 1 minuto y se añadieron 14 μ l de la mezcla de reacción que contenía solución buffer 10X, MgCl₂ 25mM, DTT 0,1M, dNTPs 10mM y transcriptasa reversa. Se incubó a 42° C por 1 hora y el ADN copia se conservó a -20°C.

Identificación de subgrupos y serotipos de enterovirus. El método utilizado para la identificación de serotipos y/o grupos de serotipos de enterovirus fue el PCR seguido del análisis de secuencia parcial de nucleótidos de la región VP1 del genoma viral (cuadro 1). Se utilizaron diferentes pares de iniciadores (cuadro 2) preparados por el grupo de enterovirus del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, GA. Estos iniciadores reconocen secuencias altamente conservadas dentro del grupo enterovirus y específicamente están dirigidos al reconocimiento de fragmentos de dos regiones del genoma viral: región 5' no codificante y región VP1.

La primera de las reacciones de PCR utilizando el par de iniciadores panEV: (EV-PCR2 y EV-PCR1), permite identificar los aislamientos correspondientes al grupo enterovirus. La segunda reacción de PCR selecciona los aislamientos de poliovirus utilizando el par pan polio (PV-PCR2 y PV-PCR1), que reconoce los tres serotipos de poliovirus. La tercera de las reacciones detecta los serotipos de polio vacunal o Sabin (20-22). La siguiente reacción reconoce el único serotipo hasta ahora identificado de enterovirus 71 (EV71), utilizando el par 159-160 y 159-162. Las subsecuentes reacciones identifican serotipos de los subgrupos Echo y Coxsackie (23). Los iniciadores 011-012 y 011-040 reconocen la mayoría de los serotipos de los subgrupos Echo y Coxsackie A y B. Todas las reacciones de RT, RT-PCR y PCR incluyeron controles positivos (se utilizaron cepas de virus prototipo conservadas en el banco de virus de la Sección de Enterovirus del CDC), negativos (células RD sin inocular) y de reactivos (sólo reactivos).

Luego de la amplificación de fragmentos del genoma viral por las diferentes reacciones de PCR, se realizó secuenciación del ADNc viral

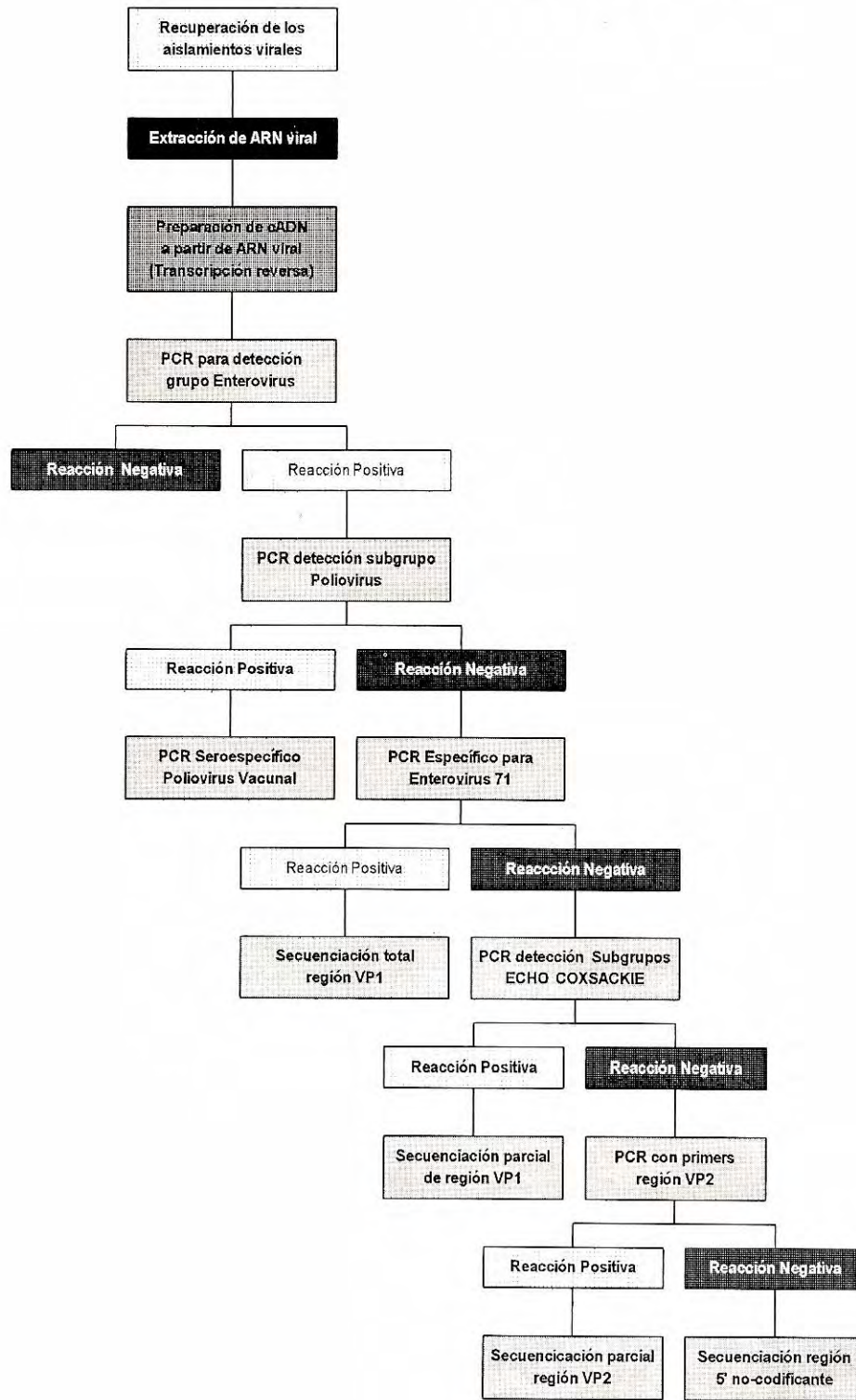
utilizando el kit de reacción ABI PRISM Taq-Polymerase Big Dye Deoxy Terminator Sequencing en un secuenciador ABI PRISM 377. El último de los pasos requeridos para la identificación molecular de los distintos serotipos de enterovirus fue el análisis de las secuencias genéticas mediante comparación de las mismas en el programa auto assembler con cepas de referencia. El porcentaje de similitud entre las secuencias determinó el subgrupo y serotipo del enterovirus.

Detección del género enterovirus. Se realizó PCR a 57 muestras virales utilizando el par de iniciadores EV-PCR2 y EV-PCR1 (451nt-477nt y 565-539nt), los cuales reconocen y amplifican secuencias de la región 5' no codificante altamente conservadas dentro del género. En esta reacción se reconocen todos los enterovirus excepto Echo 22 y Echo23, que han mostrado diferencias genéticas con el grupo. La reacción produce un fragmento de 114 pares de base (pb), que sólo fue secuenciado cuando la identificación de algunos serotipos mediante análisis parcial de VP1 no fue posible.

Detección de poliovirus. Una vez confirmados los aislamientos de enterovirus, se realizó PCR a 57 virus para detectar cepas de poliovirus que pudieron haber escapado a la neutralización con antiseros anti-polio específicos. Las secuencias blanco de este segundo par de iniciadores PV-PCR2 y PV-PCR (2875nt-2894nt y 2954nt-2935nt), son nucleótidos de la región VP1 comunes a todos los poliovirus. El producto de PCR obtenido en 6/57 muestras procesadas con estos iniciadores, correspondió a un fragmento de 79 pb. Los productos de PCR fueron detectados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Caracterización genotípica de poliovirus. Para la confirmación de virus vacunal se utilizaron iniciadores Sabin específicos. Las secuencias reconocidas por estos iniciadores (Sabin 1: PCR2-PCR1 (2482nt-2502nt y 2575nt-2551nt), Sabin 2: PCR2-PCR1 (2484nt-2509nt y 2577nt-2551nt), Sabin 3: PCR2-PCR1 (2477nt-2514nt y 2566nt-2540nt), son nucleótidos encontrados al final de la región VP3 y principio de la VP1, específicos

Cuadro 1. Flujograma de reacciones de PCR para la identificación de subgrupos y algunos serotipos de enterovirus



Cuadro 2. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados en cada reacción de RT-PCR

Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
Pan enterovirus		
EV-PCR2	5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'	114
EV-PCR1	5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3'	
Pan polio: (*)		
PV-PCR2	5'-CITAITCIMGITTYGAYATG-3'	79
PV-PCR1	5'-TTIAIIGCRTGICCRTRTT-3'	
Sabin específico		
S1-PCR2	5'-AGGTCAGATGCTTGAAAGC-3'	97
S1-PCR1	5'-TCCACTGGCTTCAGTGTT-3'	
S2-PCR2	5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'	71
S2-PCR1B	5'-CGGCTTTGTGTCCAGGC-3'	
S3-PCR2	5'-AGGGCGCCCTAACTTTG-3'	53
S3-PCR1	5'-AGTATCAGGTAAGCTATCC-3'	
Enterovirus 71 (EV71)		
159	5'-TGGTACTTTGACACGTTTC-3'	110
160	5'-CCTCTGTCACACTCA-TCTCG-3'	
162	5'-CAACGCA CATGGGGATG-3'	484
Echo y Coxsackievirus(*)		
011(**)	5'-GCICCGAYTGITGICCRAA-3'	446
012(**)	5'-ATGTAYGTICCCICGIGG-3'	415
040(***)	5'-ATGTAYRTICCMICGIGG-3'	

(*):Iniciadores degenerados: I= Iosina M= Adenina o Citosina R= Adenina o Guanina Y= Citosina o Timina

(**):Secuencias obtenidas del serotipo CB1

(***): Secuencias obtenidas del serotipo CA16

de cepas vacunales. Los fragmentos obtenidos son secuencias cortas que varían en tamaño dependiendo del serotipo: Sabin 1 tiene un tamaño de 97pb, Sabin 2 de 71pb y Sabin 3 de 53pb. Los productos de PCR fueron detectados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Detección de EV71. Se procesaron 51 muestras de virus utilizando dos pares de iniciadores 159-160 (2388nt-2405nt y 2492nt-2478nt) y 159-162 (2388nt-2405nt y 2869nt-2852nt), que reconocen secuencias de la región VP1 altamente conservadas por el EV71. El fragmento amplificado por los iniciadores 159-162 tiene un tamaño de 484 pb. Se realizó una reacción de PCR adicional sólo a las muestras positivas, utilizando los iniciadores 197 y 199 (2830-2850nt y 3280-3261nt, respectivamente); esto con el fin de obtener copia de toda la región VP1 (891pb) y poder secuenciarla. Los productos de PCR detectados en 1/51 muestras procesadas fueron

detectados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Detección de enterovirus de los subgrupos Echo y Coxsackie. Se procesaron 50 muestras virales utilizando dos juegos de iniciadores 011-012 (3311nt-3292nt y 2875nt-2894nt) y 011-040 (3311nt-3392nt y 2905nt-2924nt), que reconocen secuencias complementarias a la región VP1(23). En realidad 011-012 y 011-040 reconocen los mismos sitios en VP1, pero las secuencias en estos sitios varían dentro de los diferentes serotipos, de ahí la necesidad de utilizar dos diferentes secuencias de iniciadores. El fragmento amplificado varía entre 415 a 446 pb. Un tercer par de iniciadores 006-007 (1205nt-11871nt y 453nt-470nt), cuyas secuencias blanco son nucleótidos de la región VP2 del genoma viral, fue utilizado para tratar de identificar 11/50 muestras que no reaccionaron con los iniciadores 011-040 y 011-012. El fragmento obtenido en 3/

11 casos de 752 pb fue detectado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Purificación de productos de PCR. Antes de realizar la reacción de secuenciación de los fragmentos de genoma viral obtenidos por RT-PCR se purificaron los productos amplificados, liberándolos de excesos de iniciador, nucleótidos, enzimas y sales. Se utilizó el kit QIAquick PCR Purification (250), (QIAGEN) y se siguieron las instrucciones del inserto. La elución del ADN se realizó adicionando 40µl de agua doblemente destilada estéril y se conservó a -20°C.

Cuantificación de ADN. Las reacciones de secuenciación utilizan cantidades de ADN que varían según el kit de reacción utilizado. El kit "Big Dye" requiere cantidades que van desde 30 a 90 ng/3µl. Se utilizaron dos técnicas diferentes para cuantificar ADN: espectrofotometría a 260λ o 280λ y electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de masa de ADN (Low DNA Mass Ladder, GIBCO BRL).

Secuenciación de genomas virales. La identificación de las muestras virales se realizó mediante secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR, utilizando el kit «Big Dye» (dRhodamine Terminator Chain Cycle Sequencing Reaction, de Perkin Elmer) en un secuenciador de ADN ABI PRISM 377. Se prepararon reacciones por separado de cada una de las cadenas de ADN utilizando los mismos iniciadores de amplificación para PCR. La preparación de las muestras, preparación del gel, lavado y montaje de los platos en el cassette del secuenciador, condiciones de corrido electroforético y entrada de los datos en el programa del computador, fueron realizadas de acuerdo al manual de secuenciación automatizada ABI (ABI Automated Sequencer Manual) para secuenciador de ADN ABI PRISM 377.

Análisis de secuencias genéticas. Antes del análisis y comparación de las secuencias de nucleótidos, ambas cadenas de la molécula de ADNc fueron revisadas y analizadas para corregir errores en la lectura. La identificación de los serotipos se logró por comparación con secuencias organizadas en un programa de

computador que determinó el porcentaje de homología de las secuencias problema con una cepa de referencia predeterminada. Los porcentajes de homología de las cepas en estudio con las cepas de referencia prototipo, estuvieron entre 78 a 93,7%, excepto para un aislamiento de Echoll que presentó el porcentaje más bajo, 74,2%. El porcentaje más alto (93,7%) correspondió al único serotipo de EV 71. La construcción del dendograma se realizó en el programa PILEUP y muestra las distancias genéticas entre los diferentes subgrupos de enterovirus y algunos de los serotipos de enterovirus identificados.

Resultados

Durante los cuatro años comprendidos entre 1992 y 1995 se registraron en Colombia 856 casos de PFA, de los cuales 346 (40,42%) presentaron parálisis residual. De éstos, 243 (28,3% del total de casos notificados) presentaron síndrome de Guillain-Barré y 98 casos (11,4%) presentaron otras patologías. Estos casos fueron analizados en un comité especial del Grupo de Control de Patologías del Ministerio de Salud, PAI y OPS/OMS (cuadro 3). De los 346 casos, 331 (95,6%) tuvieron muestras de heces para estudio virológico en el laboratorio. 90/331 (27,1% del total de casos con muestras en el laboratorio) presentaron aislamiento viral. 69/90 aislamientos se identificaron como virus no polio y 21/90 como poliovirus vacunal.

Recuperación de virus por cultivos celulares. Se recuperaron 57 aislamientos (92%), que fueron el objeto de este estudio. Cuarenta y cuatro (44) se recuperaron en células RD únicamente, 10 en

Cuadro 3. Programa de Erradicación de la Poliomielitosis en Colombia. Distribución de Casos de PFA con parálisis residual y aislamiento viral, Colombia, 1992-1995

Año	Casos asociados a vacuna	PR* y aislamiento ENP**	PR y aislamiento de Sabin
1992	1***	23	0
1993	1	8	4
1994	2	23	18
Total	5	69	16

* PR Parálisis residual

** Enterovirus no polio

*** No identificado en el laboratorio, se confirmó por clínica.

células Hep-2 C únicamente y 3 en ambas líneas celulares. El ECP fue más claro y más rápido en células RD que en células Hep-2. El tiempo de aparición del ECP fue variable y osciló entre 1 y 6 días. Algunos virus tuvieron un crecimiento muy lento y fue necesario realizar un nuevo pase. Los aislamientos cosechados se congelaron a -20° C hasta el momento de su titulación.

Identificación de enterovirus no polio por neutralización con mezclas de antisueros LIM & BENYESH-MELNICK. Los títulos virales determinados en 36/57 muestras estuvieron entre 1X103 y 1X107.8 TCID50. Los títulos mayores de 1X105 fueron obtenidos en células RD, mientras que en las células Hep-2 C no se encontraron títulos superiores a 1X105.5. Las células RD mostraron ECP claros y rápidos. El envejecimiento celular apareció luego del séptimo día, mientras que las células Hep-2 no se conservaron bien luego del 4º a 5º día de incubación. Se identificaron 23/36 cepas de enterovirus mediante la prueba de neutralización con mezclas LBM de antisueros anti-enterovirus. De éstos, 18 correspondieron a ENP y 5 a poliovirus (cuadro 4). Tres de estos enterovirus no polio no pudieron ser confirmados por secuenciación. 12/23 muestras mostraron concordancia con los resultados obtenidos mediante análisis de las secuencias genómicas. La identificación de las 36 cepas virales no fue posible en su totalidad ya que algunas mezclas de antisueros resultaron tóxicas para las células, especialmente las mezclas A, B, y F. El factor tóxico se trató de

diluir entre 10 y 100 veces, pero en las primeras la toxicidad continuó presentándose y en las últimas se perdió potencia de los antisueros. Por otro lado, los aislamientos virales con títulos muy bajos (1X103 a 1X104.5 TCID50) presentaron ECP tardíos que se confundieron con degeneramiento celular. En algunas ocasiones se presentó neutralización con más de tres combinaciones de mezclas de antisuero y en otras, aún con títulos virales óptimos para la prueba (100TCID50), no se presentó neutralización del virus con ninguna de las mezclas (24). La seroneutralización con los antisueros LBM presenta ciertas dificultades. La disponibilidad comercial es muy limitada y las mezclas de la A a la H, contienen sólo 42 antisueros anti-enterovirus (9,15,18). Por otro lado, las cepas utilizadas en la preparación de estos antisueros eran las que circulaban hace 30-40 años en los Estados Unidos, pudiendo no ser representativas de las que circulaban en otras partes del mundo o de las que circulan actualmente. Los virus ARN acumulan mutaciones genéticas que pueden alterar los sitios de neutralización.

Identificación molecular de enterovirus. Los 57 aislamientos resultaron positivos por PCR al género enterovirus, pero sólo 39 se identificaron hasta su serotipo (figura 1). Entre éstos se detectaron 6 casos de poliovirus (figura 2), de los cuales 4 casos se caracterizaron como Sabin-1 y 2 como Sabin-3. 35 muestras reaccionaron positivamente para subgrupos Echo y Coxsackie,

Cuadro 4. Comparación de los resultados de identificación de enterovirus con dos técnicas diferentes: seroneutralización y molecular

Concordancia	Discordancia		Indeterminado	
	Molecular	Serología	Molecular	Serología
3 Polio 1	1 Cox B5	1 Cox B3	1ENP	1 Echo 25
2 Polio 3	1 Cox B5	1 Echo 11	1 Subgrupo Cox	1 Cox A 16
2 Echo 6	1 Cox B5	1 Echo 19	1ENP	1 Echo 6
1 Echo 7	1 Cox B5	1 Echo 33		
1 Echo 11	1 Cox B1	1 Echo 25		
1 Echo 30	1 SubgrupoCox B	1 Echo 30		
2 Cox B5	1 Echo 30	1 Cox B5		
	1 Subgrupo Echo	1Cox B4		
Total 12	Total 8	Total 8	Total 2	Total 3

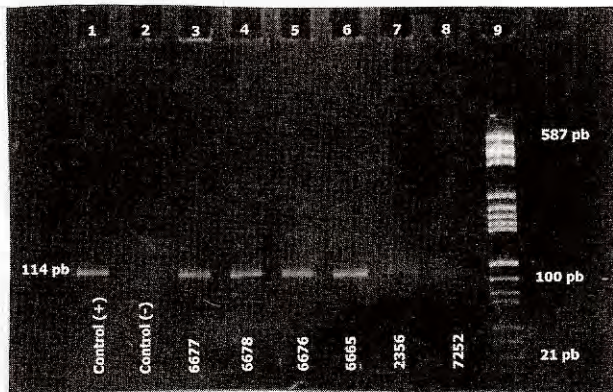


Figura 1. Reacción de PCR para grupo enterovirus, utilizando los iniciadores EV1- EV2 que reconocen secuencias de la región 5' no codificante, muy conservadas dentro del género. El marcador de peso molecular (derecha) muestra bandas de ADN entre 21pb y 587pb. Los fragmentos amplificados de 114pb correspondientes a las muestras virales nos. 6677, 6678, 6676, 6665, 2356 y 7252 se observan a partir de la tercera columna de izquierda a derecha y a nivel de las bandas 10 y 11 de arriba a abajo del gel. El control positivo se encuentra a la izquierda del gel, seguido por el control negativo de la reacción.

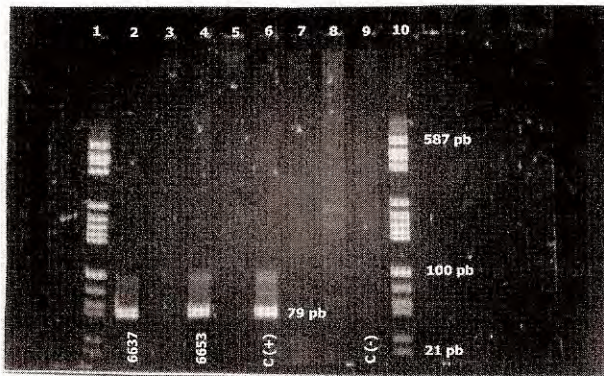


Figura 2. Reacción de PCR para poliovirus que reconocen secuencias de la región VP1 específicas del subgrupo. El marcador de peso molecular (izquierda y derecha) muestra bandas de ADN entre 21pb y 587 pb. Los fragmentos amplificados de 79pb correspondientes a las muestras 6637 y 6653 se observan en la segunda y cuarta columna de izquierda a derecha y a nivel de las bandas 13 y 14 de arriba a abajo del gel. El control positivo se encuentra en la sexta columna de izquierda a derecha y los controles negativos están intercalando las muestras.

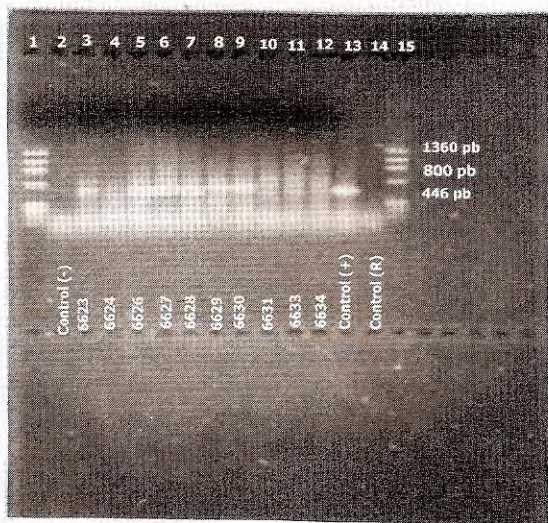


Figura 3. Reacción de PCR para detección de miembros de los subgrupos Echo y Coxsackie, utilizando los iniciadores 011-012 y 011-040, que reconocen secuencias de la región VP1 comunes a casi todos los miembros de estos subgrupos. Este gel corresponde a un corrido electroforético de productos de PCR utilizando los iniciadores 011-012. Los fragmentos amplificados de las muestras 6623, 6626, 6627, 6628, 6629, 6630 (aproximadamente 446 pb), se observan a partir de la tercera columna de izquierda a derecha y a nivel de las bandas 4 y 5 de arriba a abajo del marcador de peso molecular del gel superior. Las muestras de los pozos 2, 4, 10, 11 y 12 no presentaron reacción positiva con este par de iniciadores. El control positivo corresponde a la columna No. 13 seguido por el control negativo de la reacción.



Figura 4. Reacción de PCR para enterovirus 71 utilizando los iniciadores 159-162. El marcador molecular (derecha del segundo gel) muestra bandas de ADN desde 281pb hasta 1300pb. El fragmento amplificado de 484pb correspondiente a la muestra 6658 se observa en la columna 18 del primer gel. También aparece una banda fuerte en la columna 19, que resultó ser contaminación cruzada entre las muestras 6658 y 6659. El fragmento se observa a nivel de las bandas 4 y 5 de arriba a abajo del gel. El control positivo se observa en el segundo gel, seguido del control negativo de la reacción.

pero sólo 32 se identificaron mediante el análisis de secuencias (figura 3). Se encontró EV71 únicamente en un caso de PFA de 1994 con diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré (Caso EPI. No.94-157), procedente de Norte de Santander (figura 4).

Once (11/57) aislamientos no reaccionaron con los iniciadores para ECHO/COXSACKIE, EV71 y panPolio. Sólo 3 de éstos, reaccionaron con los iniciadores 007-006 de la región VP2. Los fragmentos amplificados con los iniciadores para grupo panEV (región 5' no codificante) y los pares 007-006 (región VP2) son fragmentos muy conservados dentro de los enterovirus, por tanto, el análisis de estas secuencias no aportó datos para la identificación de serotipos (cuadro 5).

La caracterización molecular del genotipo del EV71 por secuenciación de toda la región VP1 (891 pb), lo clasificó como genotipo B. Hasta la fecha se han identificado tres genotipos: A, B y C

(B.A. Brown, comunicación personal) y el genotipo B parece ser el más frecuente y conservado desde 1977 en Estados Unidos. La identidad en la secuencia de nucleótidos fue del 93,7% con la cepa de referencia 7423 de EV71 aislado en 1987 en Mississippi, EE.UU., de un paciente de 18 meses con enfermedad paralítica. El análisis de secuencias genéticas no identificó el serotipo de Coxsackie A16 detectado por seroneutralización con las mezclas LBM. Se presentaron bandas inespecíficas imposibles de eliminar a pesar de que la purificación de los productos de PCR obtenidos se intentó varias veces antes de las reacciones de secuenciación. Sin embargo, el aislamiento viral correspondiente a este serotipo, fue claramente positivo por PCR con los iniciadores del subgrupo Coxsackie.

Discusión

Varias enfermedades pueden presentar síndromes similares a la poliomielitis (1,2,13,14,24). El síndrome de Guillain-Barré, la mielitis transversa y, ocasionalmente, las encefalitis y meningoencefalitis de diversa índole, son los principales diagnósticos diferenciales (2,4,6,25,26). La eficiencia del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de las Parálisis Flácidas Agudas está medida por cuatro indicadores claves para la erradicación de la transmisión autóctona del poliovirus salvaje; ellos son: investigación del caso sospechoso dentro de las 48 horas siguientes a la presencia de la parálisis flácida, recolección de muestras fecales oportunamente, es decir, dentro de las dos semanas siguientes al inicio de la parálisis, cumplimiento de la notificación semanal negativa (notificar la no presencia de casos de parálisis flácida), por parte de las unidades regionales de epidemiología y la notificación de por lo menos 1 caso por 100.000 habitantes menores de 15 años (en proceso de publicación "Informe Nacional para la Certificación de la Erradicación de la Poliomielitis en Colombia, julio de 1994").

Con la eliminación del poliovirus salvaje, gracias a la inundación del ambiente con poliovirus vacunal, se hace necesario conocer el papel de otros enterovirus no polio como agentes causales de enfermedad paralítica.

Cuadro 5. Caracterización molecular y diagnóstico clínico de las 57 cepas de enterovirus recuperadas por cultivo aisladas de casos de parálisis residual, Colombia, 1992-1995

Virus identificado	No. de casos	Diagnóstico clínico
Sabin 1	3	Síndrome de Guillain-Barré (SGB)
Sabin 1	1	Encefalitis viral
Sabin 3	1	Neuropatía periférica
Sabin 3	1	Encefalitis viral
Enterovirus 71	1	SGB
Coxsackie B5	3	Neuropatía periférica
Coxsackie B5	1	Encefalitis viral
oxsackie B5	1	Hemiplejía Infantil
Coxsackie B5	1	SGB
oxsackie B5	1	Polimiositis
Coxsackie B1	3	SGB
Echovirus 13	3	SGB
Echovirus 13	1	Desconocido
Echovirus 30	3	SGB
Echovirus 6	1	SGB
Echovirus 6	1	Accidente cerebrovascular
chovirus 11	1	SGB
Echovirus 11	1	Dermatomiositis
Echovirus 12	1	SGB
chovirus 12	1	Neuropatía periférica
Coxsackie A18	2	SGB
Coxsackie B3	2	SGB
chovirus 3	1	SGB
chovirus 7	1	SGB
chovirus 14	1	SGB
Echovirus 20	1	SGB
Echovirus 29	1	SGB
Coxsackie A2	1	Mielopatía
oxsackie A10	1	SGB
oxsackie A14	1	SGB
Coxsackie A21	1	SGB
ubgrupo Echo	1	SGB
Subgrupo CB	1	Neuropatía periférica
Subgrupo CA	1	SGB
Sin identificar	11	SGB; Neuropatía periférica

La detección de un enterovirus en un enfermo no es indicación de causalidad, ya que los enterovirus se distribuyen ampliamente en la naturaleza, y siendo habitantes del tracto digestivo del hombre, su detección a partir de muestras fecales es relativamente fácil. Sin embargo, la presencia de virus como el EV71, agente causal de enfermedad paralítica indistinguible de la causada por poliovirus, resulta un hecho interesante en este momento de la vigilancia de la erradicación de la poliomiélitis por poliovirus salvaje, ya que podría introducir elementos de confusión. El enterovirus 71 detectado en este estudio ocurrió en

un paciente de 6 años de edad, procedente de Ocaña (Norte de Santander), quién había recibido esquema de vacunación completo y tenía además tres dosis de refuerzo de vacuna antipoliomielítica. El niño inició parálisis el 27 de septiembre de 1994 con progresión ascendente e instalación de la misma en 24 horas. Como prodromos presentó fiebre al inicio de la parálisis, dolor muscular y signos digestivos, paresia de miembros inferiores con localización distal y sensibilidad disminuida. No presentó compromiso de otros músculos ni pares craneanos o signos meníngeos. Las muestras de heces fueron recolectadas dentro

de las 24 horas siguientes al inicio de la parálisis y remitidas al Laboratorio de Virología del INS. El diagnóstico final de síndrome de Guillain-Barré fue establecido mediante valoraciones neurológicas a los 60 y 90 días, los cuales mostraron, además, parálisis residual. Aunque el síndrome de Guillain-Barré no tiene hasta el momento una causa u origen únicos, se sabe que las infecciones virales pueden ser etiología de esta condición, pues diferentes virus se han aislado de líquido cefalorraquídeo de pacientes con SGB (2, 13, 24, 27).

La capacidad del EV71 para producir enfermedad paralítica clínicamente indistinguible de la causada por poliovirus salvaje ha sido bien documentada: las epidemias de 1975 en Bulgaria y de 1978 en Hungría. En la primera, murieron 44 casos y el agente encontrado fue el EV71; en la segunda se presentó enfermedad neurológica con 892 casos, de los cuales 13 presentaron

parálisis flácida y 45 murieron. La detección de anticuerpos por seroneutralización resultó positiva para EV71 y negativa para poliovirus (1, 2, 14).

El aislamiento de EV71 es técnicamente difícil porque crece con dificultad en las células RD y Hep-2C (1, 4, 13, 14). Probablemente ésta sea una de las razones que explican haber encontrado solamente una cepa de este virus dentro del pool de muestras procesadas durante los años 1992 a 1995. Por otro lado, la selección de casos de manera tan estricta (solamente aquellos con parálisis residual), limitó el número de muestras en estudio, disminuyendo la posibilidad de identificar más cepas de EV71. La detección de EV71 es sin duda el aporte más importante de este trabajo, no solamente por ser un agente potencial como causa de enfermedad paralítica, sino por estar asociado a muchos y variados cuadros clínicos. Además, no se había informado anteriormente sobre la transmisión de este virus

Cuadro 6. Distribución de 63 casos con parálisis residual por departamento y aislamientos de enterovirus no polio*.

Departamento	Número de casos	Serotipos identificados
Antioquia	11	EC11, CB5, CB1, CB3,
Atlántico	1	ENP**
Bogotá	8	Subgrupo CB, Subgrupo EC, 4ENP**
Bolívar	4	CB5, ENP**
Caldas	1	EC30
Cali	2	EC14, CA2
Cauca	2	EC13, CB3
Boyacá	4	EC13, CA10, EC6
Chocó	2	CB5,
Cesar	1	EC30
Córdoba	2	E12, CB5
Guajira	1	EC6
Huila	1	CA21
Meta	3	CB5, EC13
Nariño	1	EC12
Norte de Santander	3	EV71, ENP**
Putumayo	1	1EC13
Risaralda	2	1EC29, 1
Santander	4	CB1, EC30
Sucre	3	(CA16 –Subgrupo CA), CA14, Echo 20
Tolima	3	ENP**
Valle	3	1CB3, 1EC7
Desconocido	1	ENP**

* Se excluyeron del cuadro los 6 casos con aislamiento e identificación de poliovirus vacunal durante el presente estudio, pero se incluyeron todos los casos aislamiento de ENP.

**ENP: Enterovirus No-polio EC: Echovirus CA: Coxsackie A CB: Coxsackie B

en el país y, siendo un patógeno potencialmente agresivo, debe estudiarse bien su epidemiología.

La descripción de 22 serotipos diferentes que circulan en Colombia (19 serotipos identificados por métodos moleculares y 3 por seroneutralización), coincide con los serotipos más frecuentemente hallados y descritos en otros estudios -informes de la Organización Mundial de la Salud, publicado en 1978, y del Centro para el Control de Enfermedades, realizado de 1965 a 1983 (1, 4, 26), que probablemente corresponden a serotipos virales que crecen mucho más fácil en los cultivos celulares o tienen mayor distribución en la naturaleza.

La circulación de los diversos enterovirus se detectó en todas las regiones del país, aunque el número de aislamientos por departamento depende del número de habitantes de la región. En 23/33 departamentos de Colombia se identificaron casos con parálisis residual y aislamiento de ENP (cuadro 6). La distribución de casos con parálisis residual y aislamiento de ENP por meses durante este período, no fue estadísticamente significativa; otros estudios descriptivos han observado que las infecciones por estos virus aumentan en épocas cálidas cuando hay mayor contacto entre los humanos.

Se sabe muy poco sobre otras causas virales de PFA diferentes a polio. Este estudio quiso caracterizar agrupaciones de serotipos de ENP en PR sin anticiparse a una respuesta específica: ¿habrá serotipos que puedan asociarse a PFA? ¿Existe asociación geográfica o estacional? La PFA es sólo un tipo de problema neurológico, un signo clínico muy específico, pero los ENP pueden estar asociados a otras patologías como encefalitis, meningitis, etc. Sin embargo, asociación vs. enfermedad con ENP es muy difícil y diferente de lo que ocurre con otros agentes virales. Este estudio no resuelve la etiología de los casos estudiados, pero abre el interrogante: ¿pueden ser los ENP candidatos como agentes causales de parálisis residual?

Disponiendo de los iniciadores adecuados, la detección de enterovirus mediante la reacción de PCR resulta ser un método directo, rápido y muy

útil en el diagnóstico clínico, ya que puede ayudar a la identificación temprana de la infección viral.

El hallazgo de enterovirus 71 en un grupo de pacientes con patología muy específica del sistema nervioso (parálisis residual), y examinando un sólo tipo de muestra (heces), genera la necesidad de realizar un estudio completo que describa la epidemiología de este agente y su patología geográfica en el país; por lo tanto, el Laboratorio de Virología debe implementar la metodología, utilizando iniciadores específicos que permitan la detección directa de virus en diferentes muestras clínicas.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Salud por el apoyo económico y el tiempo otorgado como Comisión de Estudios que hicieron posible mi desplazamiento a la ciudad de Atlanta, GA., y la estadía en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). A la Sección de Enterovirus del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, CDC, por el apoyo económico, técnico y científico que me brindó durante la realización del presente estudio. A todo el Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud por su apoyo.

Referencias

1. **Fields B, Knipe D.** Picornavirus y enterovirus. *Virology*, Vol. 1, Capítulos 21 y 22. Lippincott-Raven 1995; 605-712.
2. **Gear J H.** Non-polio causes of polio-like paralytic syndromes. *Rev Infect Dis* 1984; 6: Supl 2: S379-S84.
3. **Rice S, Hienl R, Thornton L.** Clinical characteristics, management strategies, and cost implications of a statewide outbreak of enterovirus meningitis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 931-7.
4. **Robart H.** Human enterovirus infections. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995.
5. **Phinheiro F, Kew O, Hatch M, Da Silveira C.** Eradication of wild poliovirus from the Americas: wild poliovirus surveillance - laboratory issues. *J Infect Dis* 1997; 175: Supl 19: S43-S9.
6. **Toro G.** Infecciones virales del sistema nervioso central. Neurología, Fundamentos de Medicina. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, 1991: 332.
7. **Uribe S.** Neuropatías periféricas. En Neurología, Fundamentos de Medicina. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia, 1991: 372.

8. **World Health Organization.** Weekly Epidemiological Record 1997; 72: 26: 189-196.
9. **World Health Organization.** Weekly Epidemiological Record 1997; 72: 33: 245-252.
10. **Kew O, Nottay B.** Molecular epidemiology of polioviruses. Rev Infect Dis 1984; 6 Supl 2: S499-S504.
11. **Brown BA, Pallansch MA.** Complete nucleotide sequence of Enterovirus 71 is distinct from poliovirus. Virus Research 1995; 39: 195-205.
12. **Da Silva E, Fillipis A, Cortes I.** Evidence of Enterovirus 71 infections in Brazil. Memmories Institute Oswaldo Cruz 1990; 85: 1: 131-2.
13. **Grist NR, Bell EJ.** Paralytic poliomyelitis and non-polio enteroviruses: studies in Scotland. Rev Infect Dis 1984; 6: Supl 2: S385-S6.
14. **Melnick J.** Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. Rev Infect Dis 1984; 6: Supl 2: S387-S90.
15. **Wadia NH, Katrak SM, Misra VP.** Polio-like motor paralysis associated with acute hemorrhagic conjunctivitis in an outbreak in 1981 in Bombay, India: clinic and serological studies. J Infect Dis 1983; 147: 4: 660-8.
16. **Melnick J, Rennick V, Hampil B.** Lyophilized combination mixtures of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strain of 42 enteroviruses. Bull WHO 1973; 48: 263-268.
17. **Poyri T, Kinnunen I, Hyypia T, Brown B.** Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. J Gen Virol 1996; 77: 1699-1717.
18. **Lenette E, Schmidt N.** Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Fifth edition, American Public Health Association, 1979.
19. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thocyanate phenol chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987;162: 156-9.
20. **Kilpatrick D, Nottay B, Pallansch M, Kew O.** Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at position of codon degeneracy. J Clin Microbiol 1996; 34 :12: 2990-2996.
21. **Kilpatrick D, Nottay B, Pallansch M, Kew O.** Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at position of codon degeneracy. J Clin Microbiol 1998; 36: 2: 352-7.
22. **Yang Ch, De L, Holloway B, Pallansch MA, Kew O.** Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. Vir Res 1991; 20: 159-79.
23. **Oberste MS, Maher K, Kilpatrick D, Flemister M, Brown B, Pallansch MA.** Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J. Clin Microbiol 1999;37:5:1288-93.
24. **Wallis C, Melnick J.** Virus aggregation as the cause of the non-neutralizable persistent fraction. J Virol 1967; 1: 478-88.
25. **Dietz V, Andrus J, Olive M, Cochi S, De Cuadros C.** Epidemiology and clinical characteristics of acute flaccid paralysis associated with non-poliovirus isolation: the experience in the Americas. Bull WHO 1995; 73: 5: 597-603.
26. **Morens DM, Pallansch MA.** Non-polio enteroviruses surveillance in USA, 1993-1996. MMWR 1997; 46: 748-750.
27. **Rrantala H, James D, Shields D.** Epidemiology of Guillain-Barré syndrome in children: relationship of oral polio vaccine administration to occurrence. J Pediat 1993; 124: 2: 220-3.