

MÉTODOS DE ESTUDIO Y DIAGNÓSTICO VIRAL

María Daniela Sandin

I. INTRODUCCION

Los métodos utilizados para reconocer las infecciones por virus humanos pueden clasificarse en DIRECTOS e INDIRECTOS, según persigan demostrar la presencia del virus o de alguno de sus constituyentes (antígeno o genoma viral) o bien la respuesta de anticuerpos específicos por parte del huésped en el curso de la infección.

Gran parte de las técnicas utilizadas en el diagnóstico clínico se basan en pruebas serológicas que identifican anticuerpos específicos frente a diversas proteínas antigénicas. Sin embargo, existen circunstancias en las cuales son necesarias pruebas que detecten precozmente la infección viral (tratamientos específicos, medidas profilácticas, etc.).

En algunas infecciones virales es posible detectar la presencia de antígenos virales previamente al desarrollo de la seroconversión, siendo esta prueba la única evidencia de la exposición al virus cuando no existe aumento de los niveles de anticuerpos circulantes (pacientes inmunodeprimidos).

Igualmente la detección del genoma viral puede favorecer la precocidad del diagnóstico viral y su confirmación. En la última década se han desarrollado una serie de técnicas para el diagnóstico viral basadas en la detección de ácidos nucleicos. De ellas la Reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada.

En el momento actual, la tendencia en el diagnóstico virológico consiste en emplear nuevas y más sensibles tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos con el propósito de lograr un diagnóstico viral más rápido. El desarrollo de quimioterapia antiviral efectiva es responsable de esta tendencia que hace de la identificación rápida, sensible y específica de los virus, una necesidad.

II. RECOLECCION, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Un elemento crucial para realizar el diagnóstico de laboratorio de un virus, cualquiera sea el método empleado, es la toma y el procesamiento de una muestra clínica adecuada.

El diagnóstico clínico orientará hacia la prueba apropiada a realizar, pero además de aquel, se requiere información epidemiológica, identificación correcta del paciente, edad de aquel y la fecha de obtención de la muestra. También resulta útil averiguar si el paciente ha recibido vacunas virales o terapéutica antiviral en una fecha reciente. Dado que los antibióticos no tienen efecto sobre los agentes virales se puede obtener una muestra para cultivo aún cuando la terapéutica contra las bacterias ya hubiere comenzado.

CUADRO 1 - MUESTRAS SUGERIDAS PARA SER UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO VIRAL

MUESTRA	CULTIVO CELULAR	EXÁMEN DIRECTO
RESPIRATORIAS		
Secreciones nasofaríngeas	Si	Inmunotinción (IF)
Secreciones endotraqueales	Si	Virus sinicial respiratorio
Lavaje bronquioalveolar	Si	Adenovirus, Parainfluenza, influenza
Biopsia de pulmón	Si	Sarampión
Hisopado faríngeo	Unico método disponible	
GASTROINTESTINALES		
Sólo diarrea		Microscopia electrónica
Heces	No ayuda	Rotavirus
		Adenovirus, Coronavirus, Coronavirus
		Virus similares al Norwalk
		Astrovirus, Calicivirus
		Inmunoensayo enzimático y aglutinación con látex sólo para rotavirus
Enfermedad sistémica (otros síntomas además de diarrea)	Método de elección	
Heces (preferentemente)		
Hisopado rectal (menos adecuado)		
CUTÁNEAS		
Vesículas	Si	Inmunotinción
Pústulas	Si	HSV
Biopsia	Si	VZV
		Vaccina
OCULARES		
Lagrímas	Si	Inmunotinción
Tejido	Si	HSV
		VZV
		Adenovirus
SANGUÍNEAS		
Anticoagulada con citrato	Unico método para la mayor parte de los virus	Uso experimental de hibridación in situ de ácidos nucleicos para CMV, EBV y detección de antígeno para HIV
GENITOURINARIAS		
Orina	Si	Uso experimental de hibridación de ácidos nucleicos in situ para CMV
Secreción cervical/vaginal/uretral	Si	Inmunoensayos para HSV
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL LCR	Si	Detección experimental de antígenos para HSV hibridación de cDNA/RNA para enterovirus
TEJIDO ENCEFÁLICO	Indispensable: la inoculación de animales puede ser esencial para virus coxsackie A, MLC y algunos arbovirus	Inmunotinción para HSV o rabia

HSV: virus herpes simple - VZV: virus varicela zoster - CMV: citomegalovirus - EBV: virus Epstein-Barr - HIV: virus de la inmunodeficiencia humana LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria. Extraído de (8).

Las mejores muestras por lo general son las que se obtienen en un estadio temprano de la enfermedad (dentro de las primeras 72hs), cuando el virus se excreta en concentraciones relativamente elevadas y todavía no se ha unido con anticuerpos. Después de transcurridos 7 días habitualmente no vale la pena realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmunocompetentes. No obstante en huéspedes inmunocomprometidos y en las infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede estar presente durante períodos prolongados.

Las muestras deben obtenerse de forma aséptica si se va a intentar el aislamiento del virus. El volumen de la muestra debe ser suficiente como para permitir la realización de los ensayos apropiados y la conservación, por ejemplo: en caso de tener que repetir el ensayo en pruebas adicionales, como PCR.

Las muestras pueden obtenerse a partir de :

Hisopados: Conjuntivales
 Genitales
 Rectales
 Mucosa oral
 Lesiones cutáneas

Sangre

Aspirado nasofaríngeo

Lavado bronquioalveolar

Expectoración

Orina

Líquido cefalorraquídeo

Materia fecal

Biopsias

Dado la gran labilidad de los virus, estos deben ser transportados en un medio de transporte que les provea estabilidad. Esto se obtiene agregando proteínas como puede ser la albúmina de bovino o la gelatina. Con el agregado de antibióticos y antifúngicos se logra prevenir el sobredesarrollo de la flora bacteriana y fúngica residente del huésped. Además, las muestras deben transportarse a 4°C (no congelarlas antes del envío, excepto el caso que el traslado implique grandes distancias), en recipientes estériles adecuados y con tapa hermética. Para enviar virus de alta transmisibilidad como virus de la Hepatitis B o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), deberá colocarse el recipiente que contiene la muestra dentro de un contenedor de preferencia metálico con tapa de rosca y rotularse como peligro biológico. Actualmente sistemas de recolección y transporte de muestras virales se pueden obtener comercialmente.

A continuación, detallaremos algunos ejemplos de recolección y transporte de muestras clínicas :

Hisopados conjuntivales: Frotar la conjuntiva palpebral con un hisopo estéril humedecido con solución salina estéril. Colocar el hisopo en 3-4ml de medio de transporte.

Hisopados de lesiones y vesículas cutáneas: Recolectar la muestra dentro de los 3 días de la erupción de la

vesícula. Primero, se lava suavemente la superficie de la vesícula o la lesión con 70% de etanol, luego se aspira el fluido vesicular con una jeringa de tuberculina y se coloca el fluido aspirado en 3-4ml de medio de transporte. Frotar las lesiones cutáneas o vesículas abiertas con un hisopo y colocarlo en 3-4ml de medio de transporte. El hisopado de las vesículas puede ser colocado en el medio de transporte que ya tiene el fluido vesicular.

Aspirado nasofaríngeo: Es la muestra de elección para virus respiratorios. Se introduce una sonda nasogástrica (SNG) por las fosas nasales hasta la rinofaringe y se aspira el mucus en un tubo colector especial. El contenido de la SNG se lava con medio de transporte para virus, que se recoge en el tubo colector.

Hisopados nasales: Introducir un hisopo de algodón, seco, suavemente en la nariz. Dejar el hisopo en la nariz durante algunos segundos para que las secreciones sean absorbidas. Colocar el hisopo dentro de 3-4ml de medio de transporte.

Hisopados faríngeos : Frotar las amígdalas y faringe con un hisopo de algodón seco. Colocar el hisopo en 3-4ml de medio de transporte.

Hisopados rectales: Introducir un hisopo de algodón humedecido 2-3cm dentro del canal anal realizando movimientos rotatorios. Colocar el hisopo dentro de 3-4ml de medio de transporte.

Heces: Recolectar 2-4g de la muestra en un recipiente estéril.

Orina: Recolectar un total de 10-15ml de orina recientemente emitida en un recipiente estéril y enviarla directamente al laboratorio.

Líquido cefalorraquídeo (LCR): Recolectar al menos 0,1ml de LCR (2-3ml preferentemente). Transportarlo al laboratorio inmediatamente.

Sangre con anticoagulante (para cultivo viral o inmunofluorescencia): Recolectar sangre entera en un tubo que contenga heparina, citrato o EDTA. Enviar la sangre directamente al laboratorio. La rápida entrega (2-6hs) al laboratorio es esencial.

Suero (para pruebas serológicas): Recolectar la muestra de sangre en un tubo estéril que no contenga anticoagulantes. Enviar la muestra al laboratorio (no congelar).

De acuerdo al origen de la muestra, esta requerirá diferentes tratamientos previos a ser inoculada. Si lo que se quiere es inocular la muestra en cultivos celulares lo que se recomienda es hacerlo inmediatamente después de obtenida.

Si el método de estudio a aplicar es una inmunofluorescencia, se confeccionan frotis y se fijan al portaobjeto con acetona, luego pueden ser conservados a -20° o -70° hasta su tinción.

En el cuadro 1 se exponen las muestras sugeridas para ser utilizadas en el diagnóstico viral.

III. PRINCIPALES TECNICAS

IIIa. METODOS DIRECTOS

Son aquellos que detectan:

1. El virus como agente infeccioso (aislamiento viral).
2. La presencia de antígenos virales (técnicas inmunológicas): Inmunofluorescencia (IF), Enzimoimmunoanálisis (EIA), Test de Aglutinación.
3. La presencia de ácidos nucleicos virales (PCR, etc.).
4. El virus como partícula viral (microscopía electrónica).

1. Aislamiento Viral - Cultivos Celulares

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento del virus era la técnica standard de oro sobre la cual se medían todas las otras pruebas de diagnóstico viral, pero hoy en día con el desarrollo de las nuevas técnicas de Biología Molecular ya no es la más sensible. De igual forma el aislamiento de virus tiene una sensibilidad y una especificidad muy alta. Debido a que sólo se amplifica el virus, se aumenta la sensibilidad sin disminuir la especificidad. Sin embargo, existen algunas desventajas en el aislamiento del virus: El proceso suele ser lento, ya que demanda días a semanas para la identificación, y en consecuencia puede no estar disponible a tiempo para influir en la atención del paciente. Además, es un proceso laborioso y caro. Por otra parte requiere el uso de sistemas de cultivos adecuados, por ejemplo, se necesitan varias líneas celulares para la detección óptima de virus.

Los cultivos celulares son, pues, los biosubstratos más corrientemente empleados para la propagación de los virus.

Un cultivo celular es obtenido, de explantes de órganos o de embriones de animales.

Estas células obtenidas asepticamente se disocian tratándolas con una enzima (tripsina) que rompe el cemento intercelular. La suspensión de células libres así obtenidas se coloca en la superficie plana de un recipiente de vidrio o plástico en donde las células se adhieren y multiplican formando una fina capa de células que se llama MONOCAPA CELULAR.

Esta monocapa de células crece en un medio de cultivo complejo que contiene albúmina, vitaminas, sales, glucosa, etc., en un sistema buffer. Se previene la contaminación bacteriana adicionándole al medio antibióticos adecuados.

Los cultivos celulares en monocapa son los más usados, aunque hay otros sistemas (cultivos en suspensión, explantos, cultivos de órganos, cultivos en microcarriers, etc.).

Los cultivos celulares se dividen en:

Cultivos Primarios: Se obtienen a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo y pueden subcultivarse una o dos veces.

Líneas Celulares Diploides: Son aquellas que crecen en pasajes sucesivos hasta aproximadamente 50 subcultivos y que conservan por lo menos en un 75% el cariotipo correspondiente a la especie de que provienen.

Líneas Celulares Continuas: Permite un número finito

de subcultivos y son heteroploides. Para considerar que se ha logrado establecer una línea continua, esta debe de haber sido subcultivada por lo menos 70 veces.

Las líneas celulares continuas ofrecen las siguientes ventajas:

- Disponibilidad para todos los investigadores de stocks de células idénticas, ya sea congeladas en ampollas o en monocapa de botella de cultivos, con la posibilidad de reconstituirlas cuando sea necesario.
- Facilidad relativa del pasaje y mantenimiento en todos los laboratorios.
- Libre de contaminación con agentes extraños.

Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica huésped-virus, y es en función de los datos clínicos y del tipo de muestra que se elige el cultivo para inocular el material. Así por ejemplo la línea celular HEP-2, son células heteroploides humanas derivadas de carcinoma laríngeo y se recomiendan para virus respiratorio sincicial (VRS) y Adenovirus.

La MRC5, es una línea diploide fibroblástica de pulmón embrionario humano, que se utiliza para el aislamiento de Citomegalovirus (CMV), VRS, Herpes, Echo virus, etc. La MDCK, es una línea celular diploide de riñón canino que se recomienda para el aislamiento del virus Influenza

Luego de inoculado el cultivo celular, se incuba a 35-37° C por un período de hasta 14 días promedio, esperando la aparición de efecto citopático, toxicidad o degeneración celular, observando el cultivo al microscopio a las 24, 48, 72hs y luego 2 veces por semana. Se usan cultivos celulares no inoculados para control y comparación con cualquier cambio morfológico observado en los cultivos inoculados. El efecto citopático es la visualización de cambios morfológicos más o menos característicos en las células inoculadas producidas por la acción del virus sobre el cultivo celular. Así, por ejemplo, el VRS forma sincicios o células gigantes en HEP-2. Los Adenovirus, células redondeadas en HEP-2, con formación de racimos dejando áreas sin células.

Cuando los virus no producen efecto citopático, se puede recurrir a técnicas que ponen en evidencia la presencia de aquel en el cultivo. Las más usadas son: hemadsorción, hemaglutinación y tinciones con anticuerpos monoclonales. (Ver 2)

Hemadsorción: Hay virus que durante su multiplicación intracelular, expresan en la membrana de la célula huésped elementos estructurales virales llamados hemaglutininas, glicoproteínas capaces de unirse a receptores específicos en la membrana de glóbulos rojos de diferentes especies animales. De modo que si se agregan glóbulos rojos a un cultivo inoculado, se puede poner en evidencia la infección de esas células a través de la unión de los glóbulos rojos a la superficie celular.

Hemaglutinación: Las hemaglutininas pueden ponerse en evidencia en el sobrenadante de los cultivos utilizando el mismo fundamento que para la hemadsorción.

2. Detección de Antígenos - Técnicas Inmunológicas

Las técnicas inmunológicas que desarrollaremos a continuación, pueden utilizarse tanto para la detección de antígenos (métodos directos), como de anticuerpos (métodos indirectos).

En el caso de detección de antígenos, se utiliza un anticuerpo específico antiviral (por lo general IgG) a cuya fracción Fc se ha conjugado una molécula marcada, que puede ser isotiocianato de fluoresceína (Inmunofluorescencia), un isótopo radioactivo ¹²⁵I o ¹³¹I (RIA), o una enzima: peroxidasa, fosfatasa alcalina, o biotina-avidina (EIA), para objetivar la reacción.

Para el procedimiento indirecto (detección de anticuerpos), se emplea un anti-anticuerpo marcado y la reacción se realiza sobre un cultivo celular infectado por el virus en estudio.

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (ID)

Es una de las técnicas más antiguas y de uso más difundido en el laboratorio clínico. El principio básico de la inmunofluorescencia directa se ilustra en la figura 1. Muestras clínicas apropiadas son recolectadas y colocadas sobre portaobjetos donde se dejan secar y fijar. Luego se agregan anticuerpos específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína que difunden a través de la membrana celular y se combinan con los antígenos víricos en el interior de las células. La reacción antígeno anticuerpo se visualiza con el microscopio de fluorescencia, por la aparición de fluorescencia de color verde manzana.

Esta técnica se puede utilizar para una identificación rápida del virus directamente sobre la muestra (por ejemplo: células eluidas de un lavado nasal, o de un hisopado nasofaríngeo), o se la puede emplear para la confirmación del efecto citopático observado en cultivos celulares.

Además con el uso de anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos tempranos inmediatos del Citomegalovirus (CMV) es posible determinar la presencia del CMV en cultivos celulares días antes del reconocimiento del efecto citopático. Sin embargo la realización de la reacción es laboriosa, depende mucho de la calidad de los reactivos, requiere un microscopio de fluorescencia y de una persona con experiencia para llegar a un diagnóstico certero, así como una recolección y preparación de la muestra adecuada.

Aun así, el método, en manos de una persona con experiencia resulta útil para la identificación rápida de ciertos virus como los virus respiratorios, ya que nos proporciona un diagnóstico etiológico en el curso de una jornada de trabajo. Además puede estudiar varias muestras simultáneamente.

El advenimiento de los anticuerpos monoclonales, ha incrementado la especificidad y en algunos casos la

sensibilidad de estos ensayos. Los anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína pueden utilizarse para identificar el virus Respiratorio Sincicial (VRS), Influenza A y B, Parainfluenza 1,2 y 3 y Adenovirus entre otros, así como para subtipificar especies virales como, por ejemplo, virus Herpes Simple (HSV) de tipo 1 y 2. Esta técnica requiere sólo 2-4hs, y se ha reportado una sensibilidad del 70-80 % comparada con cultivos celulares para la identificación de virus Herpes Simple, 80-95% para VRS y 71% para Influenza A.

La tinción con inmunoperoxidasa es similar a la de la inmunofluorescencia y es la técnica de elección en algunos laboratorios. El procedimiento implica unos pocos pasos adicionales ya que en este caso el anticuerpo monoclonal esta marcado con una enzima que requiere la adición de un substrato para evidenciar la reacción por un cambio de color que es visible micro y macroscópicamente.

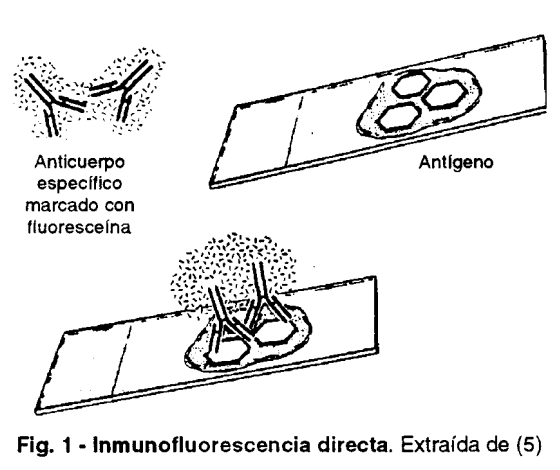


Fig. 1 - Inmunofluorescencia directa. Extraída de (5)

TEST DE AGLUTINACION

El test de aglutinación es un método simple, de un solo paso, que a veces se usa para la detección de antígenos virales en muestras clínicas. Los ensayos de aglutinación, dependen de la fijación inicial de anticuerpos antivirales específicos sobre eritrocitos o partículas de látex. Luego este reactivo se incuba con la muestra clínica en la cual se investiga el antígeno y las partículas se aglutinan si el antígeno adecuado se encuentra presente. Estas pruebas en general se complementan o se confirman por medio de otros ensayos debido al elevado porcentaje de reacciones inespecíficas.

El test de aglutinación ha sido usado para detectar antígeno de Rotavirus en heces (el más importante) mostrando una buena sensibilidad cuando se lo compara con el EIA para Rotavirus. Además es una técnica rápida y barata. También se la ha usado para detectar antígenos de Adenovirus.

RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Fue originalmente aplicado para identificar el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) y el anticuerpo

anti-HBsAg. Estos ensayos tienen una buena sensibilidad y especificidad, pero la aparición de un método como el ensayo inmunoenzimático (EIA) con su mayor tiempo de conservación de los reactivos, su costo relativamente más bajo y la ausencia de residuos radioactivos, ha reemplazado las técnicas de RIA en la mayor parte de los casos de detección de antígeno viral.

ENZIMOINMUNOANALISIS (EIA)

Los EIA para la detección de antígeno se basan habitualmente en la captura del antígeno por anticuerpos específicos unidos a una fase sólida, en general el pocillo de una microplaca o una pequeña esfera de plástico. El antígeno viral presente en la muestra clínica se combina con el anticuerpo fijado a la fase sólida y el antígeno viral se detecta mediante la adición de otro anticuerpo específico conjugado a una enzima. La enzima conjugada suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. El sustrato para esas enzimas varía. En la reacción con la peroxidasa el sustrato es un peróxido capaz de oxidar un compuesto químico incoloro que en su forma oxidada tiene un color característico.

En el caso de la fosfatasa la desfosforilización es la responsable directa de la aparición del color.

Por esta técnica se puede procesar gran número de muestras en forma rápida y automatizada, no requiriendo de un observador experimentado para leer los resultados, ya que estos se leen por medio de espectrofotómetros especialmente diseñados, siendo entonces una técnica más objetiva. Fig. 2.

3. Técnicas de Biología Molecular

Investigación de ácidos nucleicos virales

Las técnicas de estudio y diagnóstico que a continuación se presentan, constituyen una herramienta ingeniosa

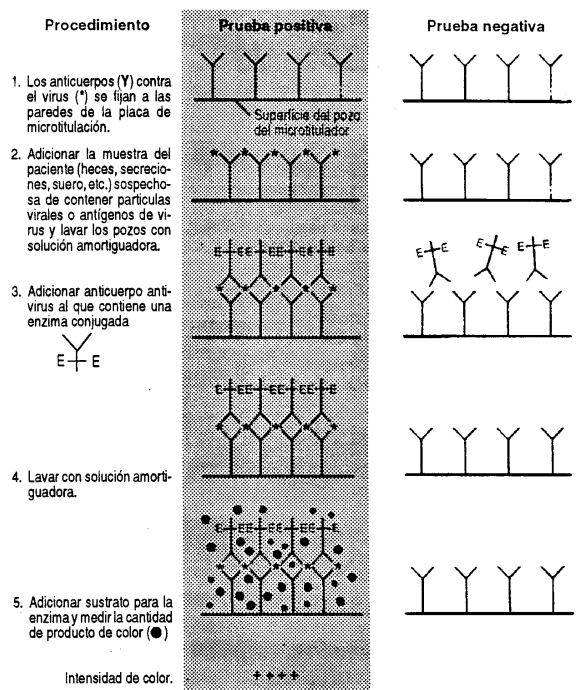


Fig. 2 - Detección de virus mediante prueba ELISA directa. Extraída de (1)

desarrolladas a partir de los estudios de la Biología Molecular.

SONDAS DE ACIDOS NUCLEICOS

Actualmente es posible extraer secuencias específicas de un fragmento de ADN por medio de las endonucleasas de restricción. Luego estas secuencias extraídas, se pueden desnaturalizar y marcar ya sea con una enzima o con un isótopo radioactivo. A estas cadenas marcadas y que tienen una secuencia conocida se llaman sondas de ácidos nucleicos. Hoy en día se están produciendo sondas de ácidos nucleicos sintéticas, con lo que se obtiene sondas de oligonucleótidos de muy alta especificidad que están disponibles comercialmente y son las más usadas en los laboratorios.

DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS VIRALES POR SONDA SINTETICA

Es un ensayo de hibridación molecular con una sonda marcada. Las hibridaciones pueden ser: DNA-DNA, RNA-RNA y RNA-DNA.

Primero se trata a muestras con reactivos que solubilizan y desnaturalizan los ácidos nucleicos. Posteriormente se añade un DNA marcado, complementario del DNA del virus y se incuba en condiciones para que se produzca la hibridación. La muestra se pasa entonces por una columna que contiene un gel que separa la sonda ligada al DNA viral hibridado de la no hibridada.

Dependiendo de como este marcada la sonda, se detecta la hibridación: Si está marcada con un isótopo radiactivo se puede hacer una lectura en un contador gamma de manera que la cantidad de radiación medida en la columna es directamente proporcional a la cantidad de DNA viral presente en el suero problema o también se puede realizar la electroforesis del DNA hibridado con la sonda marcada en gel de poliacrilamida y detectar la radioactividad emitida por la sonda mediante la aplicación de una placa de rayos X (Autoradiografía). Si esta marcada con una enzima se detecta por una simple evaluación colorimétrica.

Citomegalovirus, Papilomavirus y Epstein-Barr virus han sido identificados usando sondas de ácidos nucleicos. Fig. 3.

AMPLIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS VIRALES MEDIANTE UNA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una nueva técnica, llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue desarrollada por Saiki et al., para incrementar el número de moléculas de DNA blanco en las muestras. Tiene una sensibilidad tan alta que puede amplificar una única molécula de DNA y una sola copia de genes puede ser extraída, de mezclas complejas de secuencias genómicas y visualizada como bandas diferentes en geles de agarosa.

La PCR es, por tanto, una amplificación de secuencias específicas del DNA. Se basa en la utilización de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos llamados

primers o cebadores, que se hibridan de forma específica con cada una de las cadenas de DNA, previamente desnaturalizadas, llamadas moldes o templados. Para que la reacción tenga lugar se usa una enzima, Taq pol (ADN Polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*) y deoxinucleótidos trifosfatos. La función natural de la DNA polimerasa consiste en reparar y replicar el DNA. Los deoxinucleótidos trifosfatos se necesitan como ladrillos para la construcción. El nucleótido al cual se une la polimerasa será complementario de la base en la posición correspondiente de la cadena templado. Se sintetiza así una cadena simple de DNA, complementaria y alineada a cada "primer".

Se realiza una serie repetida de ciclos cada uno compuesto por 3 pasos básicos:

- Desnaturalización del ADN doble cadena por la elevada temperatura (95°C).
- Acoplamiento de los primers, desciende la temperatura (entre 55°C-72°C).
- Elongación del primers, aquí se eleva la temperatura a 72°C permitiendo la incorporación de los deoxinucleótidos.

Mientras tanto se van deplecionando los primers y los deoxinucleótidos, y se van sintetizando nuevas cadenas de DNA. Al final se consiguen miles de copias de DNA del fragmento de DNA limitado por los "primers". Los fragmentos de DNA así obtenidos se pueden identificar por varias técnicas: visualización en geles de agarosa o poliacrilamida mediante tinción con bromuro de etidio y examen con luz ultravioleta, o hibridación con una sonda marcada. La combinación de la PCR y las sondas de ácidos nucleicos marcadas promete ser el método más sensible para la detección e identificación de los virus. Fig. 4.

4. Microscopía Electrónica

Mediante el microscopio electrónico es posible observar la morfología de los viriones presentes en muestras clínicas. La limitación del método además del costo del microscopio, es que necesita de una alta concentración de viriones (aproximadamente 10⁹ partículas virales/ml,

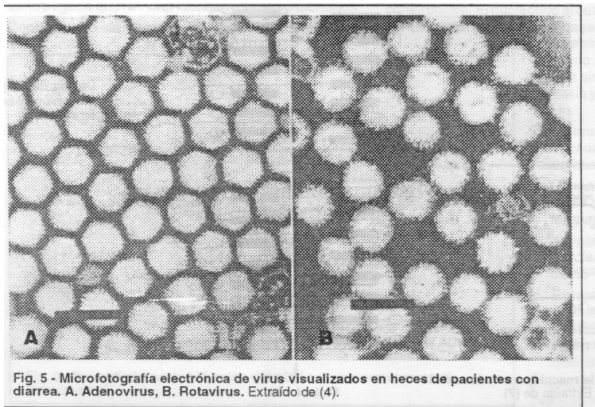


Fig. 5 - Microfotografía electrónica de virus visualizados en heces de pacientes con diarrea. A. Adenovirus, B. Rotavirus. Extraído de (4).

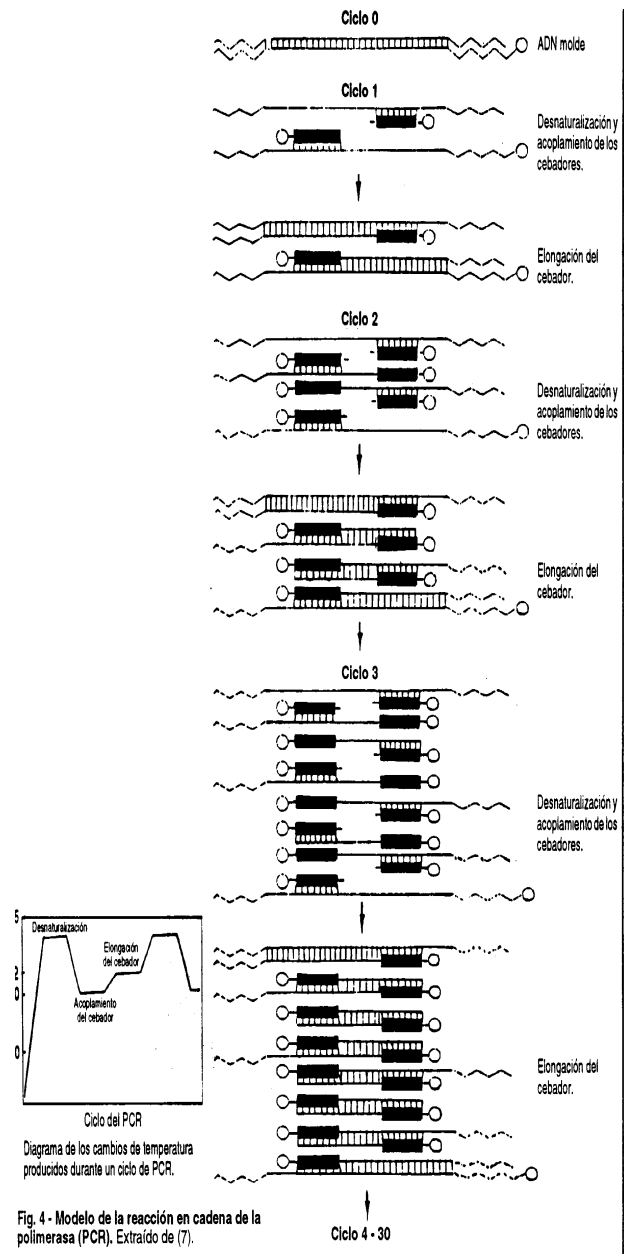


Fig. 4 - Modelo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Extraído de (7).

dependiendo del virus) presentes en la muestra, por ello es poco sensible. Esto hace que sea una técnica poco utilizada, más aún con el desarrollo de técnicas alternativas de utilidad similar.

El microscopio electrónico nos permite, por ejemplo, obtener resultados positivos rápidos de muestras de materias fecales de pacientes con diarrea, ya que tanto los Rotavirus, como los Adenovirus, Coronavirus y Calcivirus pueden ser visualizados e identificados como causantes de enfermedad. Por ejemplo, los Rotavirus poseen una forma característica en doble rueda y un tamaño distintivo, 70nm de diámetro, y se los encuentra en concentraciones de hasta 10¹¹ partículas virales por gramo de heces. También en otras muestras, como líquido vesicular, biopsia de tejidos, verrugas, orina o suero es posible obtener resultados positivos, mediante coloración negativa. Si la concentración de virus en la muestra clínica es baja, y por tanto no visible

directamente por microscopio electrónico, se pueden utilizar técnicas que aumenten la visualización, por ejemplo, la inmunoelectromicroscopía, que consiste en el agregado de anticuerpos específicos antivirales y la formación de agregados de partículas que son más fácilmente visibles que las partículas solas. Fig. 5.

II.b METODOS INDIRECTOS

Son aquellos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) por parte del huésped:

- Detección de anticuerpos específicos antivirales por técnicas inmunológicas (EIA, IFI, WB, etc.).

- Producción de anticuerpos *in vitro*.

En el curso de una infección varían las poblaciones de anticuerpos frente al agente infectante. En una primera fase la clase predominante suele ser IgM, mientras que con el transcurso del tiempo las IgM disminuyen hasta desaparecer o quedar a baja concentración residual y, en cambio, aumentan las IgG. La búsqueda de anticuerpos clase IgM es de utilidad para hacer diagnóstico de infección reciente en una sola muestra de suero extraída en el período agudo de la enfermedad. Este método se emplea para el diagnóstico de enfermedades como: Rubéola, Citomegalovirus, Hepatitis A virus, etc.

La búsqueda de anticuerpos clase IgG en una sola muestra se utiliza como técnica de tamizaje, por ejemplo, para el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Posteriormente los hallazgos positivos son confirmados en la misma muestra de suero por otra metodología.

La seroconversión es el aumento del título de anticuerpos cuatro veces o más observado en dos muestras pareadas de suero. La primera muestra se obtendrá en el período agudo de la enfermedad y la segunda, 15 a 21 días después de la primera, en el período de convalecencia.

La seroconversión es útil para establecer el diagnóstico retrospectivo, pero no para el diagnóstico temprano de una infección, puesto que debemos esperar al período de convalecencia para obtener la segunda muestra del suero. Este tipo de diagnóstico es útil para estudios epidemiológicos.

Las diferencias de títulos deben ser mayores de cuatro veces para tener valor estadístico y se debería estudiar ambas muestras simultáneamente.

Las determinaciones serológicas también nos pueden informar sobre el estado inmune del paciente frente a muchas infecciones virales, como paperas, sarampión y rubéola, donde la presencia de anticuerpos específicos indica que el individuo ha estado expuesto previamente al virus y que es inmune para una nueva infección.

A veces el diagnóstico serológico tiene dificultades, por ejemplo: cuando se realiza en recién nacidos para identificar la causa de una infección congénita. La evaluación de los resultados en este caso es difícil porque los ensayos serológicos detectan ante todo IgG, y mucha de la IgG presente en el suero del niño proviene de

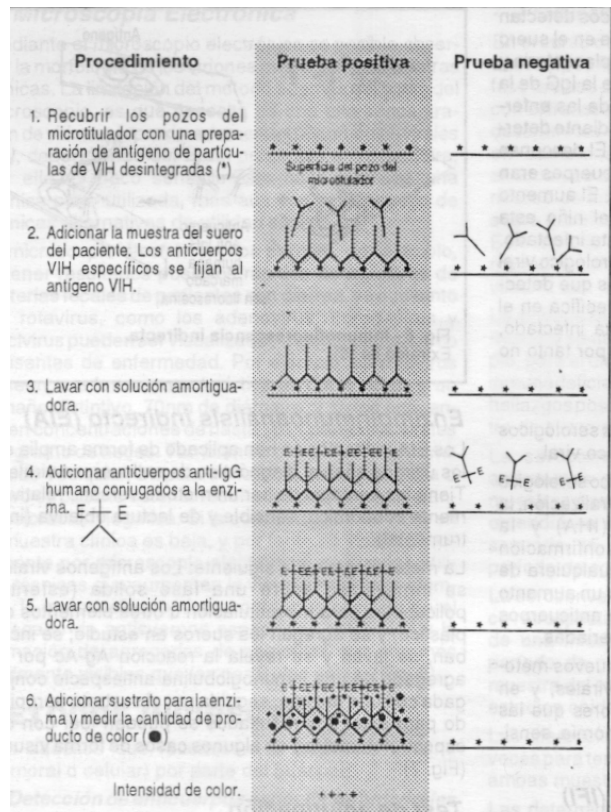


Fig. 7 - Prueba ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Extraída de (1)

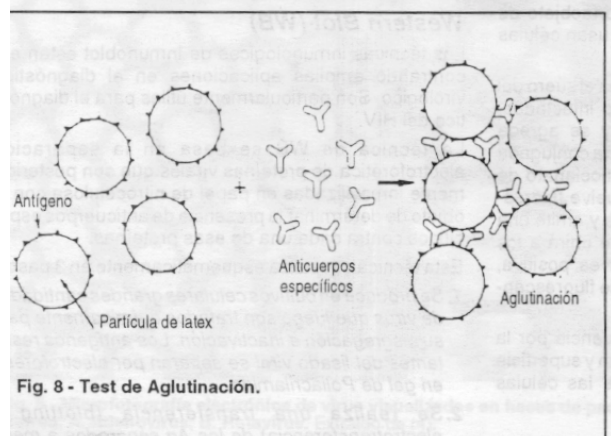


Fig. 8 - Test de Aglutinación.

la madre por vía transplacentaria y no es posible diferenciar la IgG del niño de la IgG de la madre. Tradicionalmente, el diagnóstico de las enfermedades virales congénitas se realiza mediante determinaciones seriadas de IgG en el suero. El descenso del título de anticuerpos indica que los anticuerpos eran maternos y que el niño no está infectado. El aumento en el título de anticuerpos indica que el niño está produciendo anticuerpos y por lo tanto está infectado. Sin embargo, hoy en día el diagnóstico serológico viral se ha simplificado con las nuevas técnicas que detectan IgM, ya que la detección de IgM específica en el suero del niño confirma que el niño está infectado, porque la IgM no atraviesa la placenta y por tanto no puede ser de origen materno.

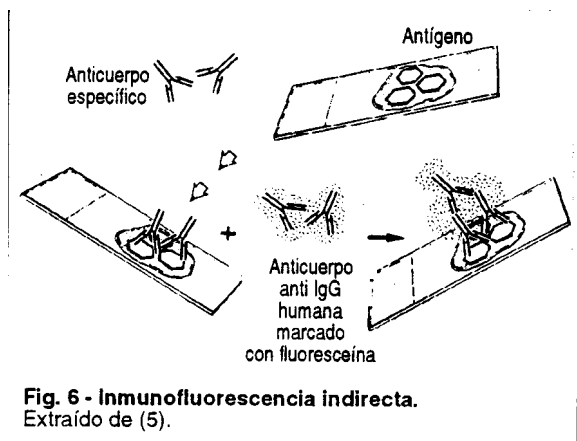


Fig. 6 - Inmunofluorescencia indirecta.
Extraído de (5).

A continuación, se describirán los métodos serológicos más comúnmente usados en el diagnóstico viral.

Los métodos tradicionales para el diagnóstico serológico de las infecciones virales incluyen: la neutralización, la inhibición de la hemaglutinación (IHA) y la hemaglutinación indirecta (HAI). La confirmación serológica de una infección aguda por cualquiera de estas técnicas tradicionales esta dada por un aumento de cuatro veces o mayor en el título de anticuerpos cuando se emplean diluciones al doble seriadas.

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para la detección de anticuerpos virales, y en muchos casos han demostrado ser mejores que las pruebas tradicionales en términos de economía, sensibilidad, especificidad y rapidez.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

La IFI, es un método rápido y confiable para la determinación de anticuerpos antivirales en el suero del paciente. El principio de la técnica se ilustra en la figura.....

Se basa en la unión de anticuerpos antivirales presentes en el suero del paciente a los antígenos virales expresados en la superficie y citoplasma de células infectadas, que han sido fijadas a un portaobjeto de vidrio. Como control de especificidad se usan células no infectadas.

El procedimiento es el que sigue: Se incuba el suero del paciente con las células infectadas y no infectadas. Luego se realiza un lavado con PBS y se agrega posteriormente anticuerpo anti IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína. El isotiocianato de fluoresceína es una sustancia que se vuelve fluorescente a la exposición de la luz ultravioleta y emite una luz verde característica.

El conjugado se unirá a los anticuerpos del paciente si la reacción es positiva, leyéndose la prueba en un microscopio de fluorescencia.

La presencia de Ac se evidencia por la aparición de fluorescencia en el citoplasma y superficie de las células infectadas, mientras que las células control no fluorescen.

ENZIMOINMUNOANALISIS INDIRECTO (EIA)

Los EIA indirectos se han aplicado de forma amplia en los últimos años al diagnóstico de anticuerpos virales. Tiene las ventajas de ser un método versátil, relativamente económico, sensible y de lectura objetiva (instrumental).

La metodología es la siguiente: Los antígenos virales se inmovilizan sobre una fase sólida (esferita, policubetas para microtitulación u otros elementos de plástico) y se agregan los sueros en estudio; se incuban, se lavan y se revela la reacción Ag-Ac por el agregado de una inmunoglobulina antiespecie conjugada con una enzima, seguida por el substrato apropiado para esta. Los resultados se pueden leer con un espectrofotómetro y en algunos casos de forma visual.

TEST DE AGLUTINACION

El fundamento y el procedimiento de esta técnica ya fue descrito para el estudio de Ag viral (método directo). Ahora lo que buscamos es detectar anticuerpos antivirales, por eso se usan partículas de látex recubiertas con Ag viral. Fig. 8.

WESTERN BLOT (WB)

Las técnicas inmunológicas de Inmunoblot están encontrando amplias aplicaciones en el diagnóstico virológico. Son particularmente útiles para el diagnóstico del HIV.

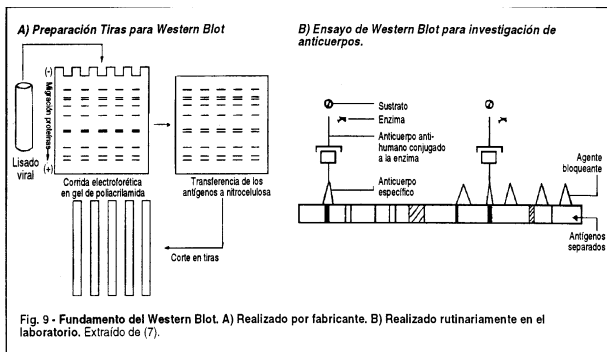
La técnica de WB se basa en la separación electroforética de proteínas virales que son posteriormente inmovilizadas en papel de nitrocelulosa con el objeto de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra cada una de esas proteínas.

Esta técnica se realiza esquemáticamente en 3 pasos:

1. Se produce en cultivos celulares grandes cantidades de virus que luego son tratados químicamente para su disgregación e inactivación. Los antígenos resultantes del lisado viral se separan por electroforesis en gel de Poliacrilamida.
2. Se realiza una transferencia (blotting o electrotransferencia) de los Ag separados a membranas de nitrocelulosa.
3. Se coloca el suero del paciente sobre la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana unida a una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) y, por último, se agrega el substrato enzimático para la visualización de las bandas reactivas con un producto final coloreado.

La técnica es muy similar a un EIA, menos sensible pero más específica que esta.

En la práctica sólo el 3er paso es el que se realiza en los laboratorios de diagnóstico, ya que los equipos



comerciales proveen de las tirillas con los antígenos. (Esto facilita la estandarización de las determinaciones).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS *IN VITRO*

Se trata de una técnica nueva que ha sido aplicada para el diagnóstico de la infección perinatal. Este procedimiento revela la presencia de anticuerpos antivirales producidos *in vitro* a partir de los linfocitos B extraídos de sangre total, lo que indicaría que el sistema inmune del paciente ha sido estimulado por el virus.

La producción de Ac antivirales *in vitro* promete ser de gran valor en el diagnóstico temprano de niños infectados por VIH.

IV. LA ELECCION DE UNA PRUEBA DIAGNOSTICA

En la valoración de los diferentes procedimientos de diagnóstico descriptos, se pueden considerar tres parámetros de importancia fundamental: SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD y VALOR PREDICTIVO. Se define cada uno de ellos de la siguiente manera:

SENSIBILIDAD: Proporción de personas con la infección que reaccionan positivamente en la prueba diagnóstica realizada. Por ejemplo: Una prueba diagnóstica será más sensible, cuando detecte un mayor número de personas infectadas o enfermas.

Se calcula de esta forma:

$$\frac{\text{Reactivos positivos} \times 100}{\text{Reactivos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

ESPECIFICIDAD: Es la proporción de personas sin la infección o enfermedad que reaccionan como negativos. Por ejemplo: Una prueba es más específica cuando tiene menos reacciones positivas entre las muestras de personas que no tienen la enfermedad.

Se calcula:

$$\frac{\text{No Reactivos} \times 100}{\text{No Reactivos} + \text{Falsos positivos}}$$

VALOR PREDICTIVO: Es la probabilidad de tener la enfermedad dado el resultado del test.

Hay dos tipos:

Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado del test es positivo.

Se calcula:

$$\frac{\text{Reactivos positivos} \times 100}{\text{Reactivos positivos} + \text{Falsos positivos}}$$

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado del test es negativo.

Se calcula:

$$\frac{\text{No Reactivos} \times 100}{\text{No Reactivos} + \text{Falsos negativos}}$$

Los valores predictivos de los test lo determinan la sensibilidad, la especificidad y la prevalencia de la enfermedad en la población a la que se le aplique el test. Un test de alto valor predictivo negativo será aquel que tenga una alta especificidad y no necesariamente una alta sensibilidad. Por el contrario, un test de alto valor predictivo positivo tendrá que tener una gran especificidad ya que debe acertar la positividad de las muestras realmente positivas.

Un test ideal sería aquel que detectara el 100% de las personas con la enfermedad y excluyera el 100% de las personas sin la enfermedad, no dando nunca resultados falsos positivos o falsos negativos. Desafortunadamente, esto no ocurre con las técnicas disponibles actualmente.

En la elección del método diagnóstico además de la sensibilidad y especificidad se debe considerar aspectos operativos en las técnicas a ser usadas, como ser: costos, complejidad técnica del ensayo, volumen necesario y preparación de la muestra, tiempo que requiere el proceso, disponibilidad comercial de los kit de calidad reconocida. Además se debe considerar el nivel de complejidad del laboratorio y la disponibilidad tecnológica y de recursos que requiere cada técnica.

REFERENCIAS

1. Brock, D. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. Biología de Microorganismos. Prentice Hall, 1988. New Jersey. 13: 488-489.
2. Carballal, G.; Oubiña, J. Diagnóstico Viroológico. Virología Médica. El Ateneo, 1994. Bs As, Argentina. 6: 73-100.
3. Chans, G. Aplicaciones de las Nuevas Técnicas de Biología Molecular al estudio de Bacterias y Virus. Etiopatogenia Microbiológica. Vol. 2. Librería Medica Editorial. 19:289-301.
4. Drew, L. Laboratory Methods in Basic Virology. In Bailey Scott's. Diagnostic Microbiology. 8th ed. The C.V. Mosby Company, 1990, 42:652-653.
5. Leland, D.S. Concepts of Clinical Diagnostic Virology. In Lennette EH (ed). Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 1992, 1:3-43.
6. Somma, R.; Di Lorenzo, S.; Chiparelli, H., Cánepa, E. Diagnóstico de **Chlamydias**,

Rickettsias, Mycoplasmas y Virus.
Etiopatogenia Microbiológica. Vol. 2. Librería
Médica Editorial. 17:237.271.

7. Ruchansky, D. Diagnóstico de la Infección Perinatal por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Bioquímica en Profundidad. Licenciatura en Bioquímica. Orientadores: Dr. J.C Russi, Dr. J.R. Arbiza.
8. Zinsser (ed.). Diagnóstico Viral Rápido. Microbiología. 20ed. Editorial Médica Panamericana. 1994; 62: 1249-1260.