

**El diagnóstico viral por el laboratorio**

María del Pilar Crespo, Bact., M.Sc.\*

**RESUMEN**

*El diagnóstico de las entidades virales es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual, particularmente en países semejantes a Colombia donde el diagnóstico viral se hace de manera empírica. Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas y mejores herramientas para evidenciar las causas de tipo viral, hace posible que estas entidades se puedan descubrir y estudiar no sólo a nivel de laboratorios especializados, sino también en los comunes. Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y poco costosas para la demostración de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y dispendiosas y esto ha producido una mayor agilidad en la definición del diagnóstico. Por otro parte, descubrir anticuerpos es importante para documentar la prevalencia de una infección en individuos y poblaciones. Además, las pruebas de demostración molecular han mejorado la probabilidad de evidenciar los agentes virales pues se documenta la infección de modo categórico, y se estudian su progresión y seguimiento terapéutico. En Colombia es importante promover el manejo y ejecución adecuados y racionales de las técnicas disponibles, ya sean las tradicionales o las nuevas que mejoren los diagnósticos virales y diferenciales. Este artículo brinda un compendio sobre el tema, revisa las pruebas diagnósticas de mayor aplicabilidad en virología, lo que tiene utilidad como guía rápida, y además ofrece material de consulta tanto para profesionales como para estudiantes del área de la salud.*

Palabras claves: Virus. Diagnóstico. Infección viral.

Conocer cuando una infección es de etiología viral es muy importante porque determina un cambio en la conducta clínica y en el manejo terapéutico del paciente. El diagnóstico viral por el laboratorio es de gran ayuda para confirmar la etiología, así como para el seguimiento clínico de la entidad. Adicionalmente, realizar un diagnóstico adecuado permite conocer la epidemiología de la infección viral y determinar las connotaciones que implica a nivel de salud pública; tal es el caso de infecciones como el dengue y la fiebre amarilla. Por las características estructurales, ecológicas y biológicas de los virus, su demostración *in vitro* es y será uno de los mayores retos a los que se enfrentan los científicos. Al igual que la mayoría de los microorganismos, los virus se pueden descubrir ya sea de

una forma directa o indirecta. Las pruebas directas son las que evidencian al virus o algunos de los antígenos virales que se pueden encontrar presentes en los tejidos o fluidos humanos. Las pruebas indirectas son las que se utilizan con más frecuencia y básicamente demuestran un contacto del huésped con el agente viral mediante la determinación de anticuerpos específicos contra el virus. En muchos casos el diagnóstico de infección viral se hace por el cuadro clínico del paciente y la presencia de anticuerpos contra el agente viral sospechoso; sin embargo, hay algunas técnicas rápidas para demostrar los antígenos virales y también se sabe de técnicas para amplificar su material genético.

No obstante la variedad de pruebas diagnósticas que se han desarrollado,

es necesario tener en cuenta que para un óptimo diagnóstico de las entidades virales, debe haber una adecuada indicación, recolección y transporte de las muestras que se han de analizar para este propósito.

**LATOMADEMUESTRAS**

Un factor determinante y definitivo para el aislamiento viral es la obtención temprana de una muestra adecuada, esto debido a que la excreción del virus tiende a ser por pocos días y la concentración de partículas virales disminuye progresivamente con el tiempo. Además, la aparición de anticuerpos en la fase aguda neutraliza el virus y ayuda a formar complejos inmunes. Tener en cuenta lo anterior es importante, pues si la concentración de virus en la muestra clínica es muy baja, se pierde fácilmente la posibilidad de infectar células vivas

\* Bacterióloga microbióloga, Clínica Fundación Valle del Lili, Cali.

y por tanto demostrarlo en los cultivos celulares. Las muestras se deben tomar en las condiciones de mayor esterilidad posibles, identificadas con el nombre del paciente, lugar de procedencia, el tipo de muestra, la fecha y hora de la toma y un resumen corto de la historia clínica con la solicitud de examen que se desea realizar. Para una muestra clínica adecuada es necesario tener en cuenta factores adicionales que garanticen la conservación de las partículas virales activas, como: el tiempo de transporte de la muestra, la temperatura y el medio de preservación que se utilice para éste (es decir medios de transporte que mantengan la viabilidad viral)<sup>1-4</sup>. Las muestras no se deben dejar a temperatura ambiente o en incubadora, tampoco es recomendable congelar y descongelar las muestras, pues así se podría alterar la estructura del agente viral (Cuadro 1).

Para el aislamiento viral, las muestras clínicas se deben tomar en el momento indicado y rápidamente inocularlas en células vivas (Cuadro 2). En su defecto se guardan en nevera entre 4°C-8°C o en hielo de agua hasta

que sea posible su inoculación. Si el tiempo de inoculación se prolonga más de 4 días, se congelan a -70°C y se utiliza un medio de transporte según sea el tipo de muestra. Se pueden utilizar algunos criopreservantes para mejorar la recuperación de los agentes virales, entre ellos dimetil sulfóxido (DMSO), suero, leche descremada, proteínas, sacarosa, glicerol y sorbitol<sup>5</sup>. Muy pocos agentes virales se pueden mantener por un período relativamente largo o de aun días, cuando se transportan en un medio adecuado y en hielo a 4°C<sup>4</sup>.

A continuación se describen las principales técnicas para diagnóstico viral.

### TÉCNICAS DIRECTAS PARA LA DEMOSTRACIÓN VIRAL

Dentro de las técnicas directas es posible incluir:

- Las que visualizan la partícula viral o su efecto celular específico como las tinciones para microscopía de luz, la microscopía electrónica y el cultivo o aislamiento viral.
- Las pruebas para demostración de antígenos virales: los inmunoensayos

(ELISA, IFA, RIA) y las pruebas de látex.

- Las que evidencian la presencia de material genético viral como: ensayos de amplificación genética (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, por sus siglas en inglés, LCR, etc.) e hibridización (sondas, ADN ramificado, etc.)

#### • Visualización de la partícula viral

*Microscopía de luz.* Se efectúa mediante tinciones especiales, generalmente son coloraciones con Wright o Giemsa en extendidos provenientes de lesiones vesiculares donde se visualizan las inclusiones o los cambios celulares ocasionados por la invasión viral. Un ejemplo de esto lo constituye el estudio de inclusiones producidas por el citomegalovirus (CMV) en sedimento urinario y la prueba de Tzank para observar las células infectadas por herpes (o varicela zóster), para ésta se hace un raspado de la base de las vesículas y después de fijarla con metanol, se hace la tinción y se observan las células, que se tornan agrandadas, con múltiples núcleos y un citoplasma que se tiñe de oscuro además de inclusiones intranucleares eosinofílicas. La sensibilidad de esta técnica depende de su preparación, tinción y la experiencia del observador, generalmente es menor que la de la inmunofluorescencia y el cultivo viral<sup>1,6,7</sup>.

*La microscopía electrónica.* Permite visualizar la partícula viral debido a la gran resolución del microscopio electrónico. Para este fin se utilizan dos tinciones especiales con sales de metales pesados como el uranio o el tungsteno. La primera es la tinción negativa donde el acetato de uranio forma una especie de molde viral que permite detallar la estructura del virus. La segunda tinción es la del sombreado, donde las partículas virales se ponen en un ángulo donde el metal que se utiliza en ella se

**Cuadro 1**  
Principales agentes virales, su transporte y sobrevivencia

Virus	Medio de transporte	Tiempo días/Temperatura °C	% de recuperación
Adenovirus	Bentonita	14/ ambiente	100
Coxsackievirus A9, B5	Bentonita	21/ ambiente	100
CMV	2SP		
	(Medio chlamydia)	21/ 4	4
	Sorbitol 70%	3/ 4	4
	Medio de cultivo viral	3/ 4	1
	SPG	3/ 4	10
Echovirus 11	Bentonita	21/ ambiente	100
HSV	Leche descremada	30 / 4	25
	Medio de Richards	12 / 2	10-50
	SPG	3/ 4	30
Influenza	Bentonita	14/ ambiente	33
Parainfluenza	Bentonita	14/ ambiente	50
Rubeola	Bentonita	14/ ambiente	1
VZV	2 SP	3 / 20	4
	Sorbitol 70%	3 / 4	4

deposita sobre el virus pero no sobre su sombra y sólo se visualiza lo que no se ha cubierto con el metal. Esta técnica no revela las estructuras internas del virus sino su forma y dimensiones. El uso de equipo especializado y costoso, el elevado nivel técnico que requiere, la baja sensibilidad cuando hay un bajo número de partículas virales y el hecho de que en algunos casos la morfología *per se* no es suficiente para un diagnóstico viral definitivo, hacen que este sistema sea poco usado y sólo se emplee a nivel investigativo o académico. La microscopía electrónica se ha utilizado para el diagnóstico del agente Norwalk, adenovirus entéricos, calicivirus, astrovirus y coronavirus en materia fecal así como de otros virus para los cuales no se tiene disponibilidad de otras pruebas diagnósticas comerciales o aquellos que no son cultivables<sup>5,7</sup>.

*Aislamiento viral en cultivo.* Los virus son microorganismos intracelulares y para evidenciarlos, se deben utilizar sistemas basados en líneas celulares que permitan su desarrollo. La invasión viral se evidencia a través de un cambio celular o efecto citopático (EC) y mediante pruebas complementarias. Los sistemas de cultivo más utilizados son:

- a) *Cultivos primarios.* Se caracterizan por tener varios tipos de células. La mayoría son de crecimiento limitado *in vitro*, generalmente resisten 5 a 10 subcultivos y son permisivas a un amplio rango de virus; p. e., células de riñón embrionario humano (REH).
- b) *Cepas de células diploides.* Derivadas de tejidos normales, se utilizan en la producción de vacunas, aislamiento viral y como sustratos para probar materiales tóxicos. Están constituidas por un tipo de células que retienen su número cromosómico

diploide original; p.e., los fibroblastos de pulmón.

- c) *Líneas celulares.* Son células inmortalizadas en el laboratorio, resisten (n) número de pases y se caracterizan por derivarse de tejidos normales o de tumores malignos y se han pasado por los menos 70 veces *in vitro*; p.e., células Vero (riñón de mono verde africano), LLC-MK2 (riñón mono rhesus) y BSC-1 (también de tejido normal de riñón de mono) y HeLa y Hep-2 derivadas de células humanas malignas. Éstas generalmente tienen un número variable de cromosomas y a veces también son denominadas líneas celulares heteroploides. Otras líneas celulares existentes son A9 (fibroblastos subcutáneos de ratón), BHK21 (fibroblastos de hámster), BRL3A (epitelio de hígado de rata), GHI, GH3 (epitelio de rata), L929, LS, S180 (fibroblastos de ratón), L1210, L5178Y, P388D1 (linfocitos de ratón), MCF7 (epitelio humano), 3T3-L1 (fibroblastos de ratón suizo), 3T3-A31 (fibroblastos de ratón BALB/c) y NRK49F (fibroblastos de riñón de rata).

Para los cultivos virales se utilizan monocapas celulares adheridas al lecho de un tubo, que requieren de sustratos esenciales para su mantenimiento, una solución amortiguadora y un pH adecuado, además se deben suplementar con suero fetal bovino, que contiene múltiples factores promotores de crecimiento celular<sup>7,9,10</sup>. Una vez que la monocapa se inocula con una muestra pretratada que proviene de un individuo infectado, el virus se puede descubrir por el desarrollo de un efecto celular EC morfológico degenerativo visible o éste puede aparecer después de 3 ó 4 días. El tipo de EC que se observa es a menudo la clave para identificar el virus infectante, el EC puede ser de varios

tipos: la formación de sincicios, o de vesículas o inclusiones o el redondeamiento y desprendimiento de la monocapa celular. Hay diversas líneas celulares que se pueden utilizar en el laboratorio de virología, lo que depende del virus que se quiera evidenciar. Las que se emplean con más frecuencia son las células Hep-2, HeLa y Vero, en cuanto a células diploides las más utilizadas son las líneas de fibroblastos de pulmón (MRC5) que se usan para el aislamiento de citomegalovirus (CMV). El cultivo primario más utilizado es el riñón humano embrionario (RHE) que es permisible a los virus de circulación frecuente como el herpes (HSV), adenovirus (ADV), enterovirus, virus sincicial respiratorio (RSV) etc. (Cuadro 3. Líneas celulares y EC producidos). Aunque el aislamiento viral es una buena técnica para el diagnóstico de infecciones virales asintomáticas, crónicas y recurrentes, su eficacia depende del momento en que se tome la muestra, del transporte óptimo y rápido de las muestras; además que se debe escoger el tipo de células que sean permisivas para el virus que se va a demostrar.

Existen otros métodos para descubrir y caracterizar un virus en cultivo celular cuando todavía no se produce el EC, o éste no es evidente o en los casos en que el virus se debe reconocer por otras propiedades o características en cultivo. Dentro de las técnicas que ayudan a identificar estas propiedades virales están:

*La hemadsorción.* Consiste en que cuando el virus infectante incorpora proteínas virales con propiedad de hemaglutininas en la membrana celular, las células infectadas se pueden descubrir por la adsorción de eritrocitos de ciertas especies animales, que se puede observar al microscopio de luz<sup>5,8</sup>. Es el caso de los ortomixovirus y parami-

**Cuadro 2**  
**Indicaciones de toma de muestra, técnica diagnóstica y transporte**  
**en las principales entidades virales**

Entidad	Tipo de muestra y técnica diagnóstica	Transporte
1. Infección respiratoria  Pneumonía (RSV, CMV,	<b>a. Cultivo viral e identificación de antígeno</b> Aspirado nasofaríngeo Aspirado nasal influenza, parainfluenza)  Lavado broncoalveolar	En medio de cultivo EMEM o solución de Hanks con Lavado faríngeo 0.5% suero bovino, refrigerado hasta el momento de la inoculación
	<b>b. Identificación de anticuerpos</b> Sangre (suero)	Tubo seco para serología. (inhibición de la hemaglutinación)
2. Sistema nervioso meningitis (enterovirus)  (Herpes)	<b>a. Cultivo viral</b> Líquido cefalorraquídeo Materia fecal Escobillón rectal Biopsia cerebral si es para HSV	Frasco estéril refrigerado  Culturette Medio de cultivo EMEM (Eagle minimal essential medium)
	<b>b. Identificación de anticuerpos</b> Sangre (suero)	Tubo seco (ELISA)
3. Miocarditis	<b>Cultivo viral</b> Materia fecal Líquido pericárdico	Frasco estéril refrigerado
4. Exantema (sarampión)	<b>a. Cultivo viral</b> Escobillón faríngeo	Culturette o Virocult (sistemas de combinación escobillón y medio de transporte) o tubo estéril con solución salina
	<b>b. Identificación de anticuerpos</b> Sangre (suero)	Tubo seco (neutralización ELISA)
5. Erupciones vesiculares (Herpesvirus: varicela, herpes)	<b>a. Cultivo viral</b> Líquido vesicular  Raspado de las lesiones	Debe tomarse el líquido en jeringuilla y enviarse refrigerado Tomar con escobillón en culturette.
	<b>b. Identificación de anticuerpos</b> Sangre (suero)	Tubo seco (ELISA)
6. Infecciones por CMV Inmunosuprimidos (neonatos, adultos)	<b>Cultivo viral y demostración de antígeno</b> Orina	Frasco estéril refrigerado a 4° C
	Sangre (capa gruesa de blancos)	Muestra con anticoagulante refrigerada a 4° C
7. Dengue	Sangre	Tubo seco para serología
8. Rubéola	Suero agudo ( primeros 5 días)	(ELISA) para dengue y rubéola. Neutralización
9. Polio	Suero convaleciente (8-15 días)	para polio

xovirus que se pueden reconocer por la hemadsorción de eritrocitos de cobayo a las células; la identificación se confirma con la inmunofluorescencia directa mediante anticuerpos específicos (Figura 1).

• **Pruebas para la demostración directa del antígeno**

Mediante esta técnica se pueden descubrir antígenos virales circulantes o los que se encuentran en los tejidos del huésped. La sensibilidad de estas pruebas depende de la cantidad de antígeno presente y su especificidad depende de la calidad de los antisueros disponibles para este efecto. Estas pruebas permiten una demostración rápida y son muy prácticas para el diagnóstico, pues los cultivos virales requieren de una infraestructura adecuada y personal entrenado y sólo se pueden realizar en centros de docencia o de investigación. Además, los resultados del cultivo viral requieren por lo menos hasta 8 días. Las técnicas más utilizadas para el descubrimiento directo de antígeno son:

*Aglutinación de látex.* Las partículas de látex son esferas de poliestireno que se unen fácilmente al fragmento cristizable (Fc) de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM), esta última es mucho más eficiente en aglutinar partículas naturales. Los fragmentos de unión del anticuerpo (FAB) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra. Cuando los antígenos tienen varios epítopes (o estructuras antigénicas repetitivas), los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples partículas de látex se unen al antígeno y se produce un entramado de las partículas de látex que dan como resultado una aglutinación visible. Esta técnica se aplica ampliamente en el laboratorio de microbiología, porque es fácil de realizar, requiere sólo unos minutos y no necesita equipo, pues se

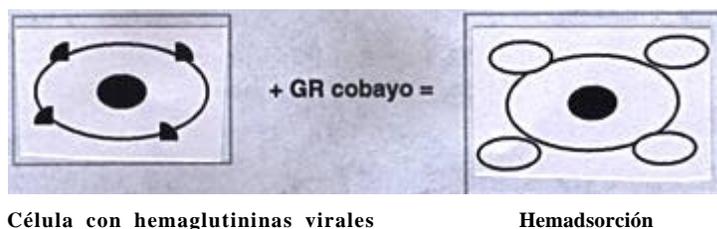


Figura 1. Técnica de hemadsorción

lee a simple vista. Sin embargo, ofrece como desventaja la presencia de reacciones cruzadas sobre todo con otros antígenos en la muestra y también ocurren interferencias por el fenómeno de prozona, en el que un exceso de anticuerpos no permite la formación del entramado. Esta técnica se usa común-

mente para la demostración de antígenos de rotavirus en materias fecales<sup>11,12</sup>.

*Inmunofluorescencia directa (IFA).* La demostración de antígeno se hace mediante la utilización de un anticuerpo marcado con un fluorocromo (conjugado) que es específico para el antígeno que se ha de descubrir. Este proceso implica la preparación de un extendido en placa de la muestra, del tejido o de una monocapa celular inoculada con la muestra, luego se fija, se coloca el conjugado con fluoresceína y después de una incubación y un lavado, la placa se observa en el microscopio de fluorescencia. La IFA ha tenido gran aplicación y se usa con frecuencia para el diagnóstico de infecciones virales del tracto respiratorio en niños. La muestra, que puede ser un aspirado nasal, se concentra mediante centrifugación y se hacen placas que se fijan y se prueban con el antisero para el virus por descubrir<sup>1,8,13</sup>. Esta técnica se sigue para el diagnóstico del virus de influenza, el RSV, paperas, sarampión, coronavirus, ADV, HSV y CMV<sup>1,5,6</sup>. Particularmente para RSV y sarampión tiene una sensibilidad mayor que el cultivo viral. La IFA también es útil para confirmar los hallazgos de cultivo viral y la combinación de estos dos métodos mejora el diagnóstico<sup>7</sup>. Este método es fácilmente aplicable en tejidos que se pueden colocar sobre una placa a manera de huella y a partir de ésta aplicar la técnica; un ejemplo es el caso de biopsias de cerebro para el diagnóstico de encefalitis por herpes simplex y para rabia en cerebros de animales. Esta técnica se ha desarrollado para el diagnóstico de CMV (Shell vial)<sup>7,9</sup> que se basa en el cultivo viral combinado con tinción de anticuerpos por IFA donde la positividad al segundo día es de 52% mientras que con el cultivo solamente es 2%; al octavo día con el método combinado la positividad aumenta a 85% comparada

Cuadro 3  
Principales cultivos celulares, virus aislados y efecto citopático producido

Tipo de células	Fuente y tipo	Virus aislados	Efecto citopático
Riñón embrionario humano	Riñón humano primario	Adenovirus Enterovirus Herpes  Influenza Parainfluenza	Redondeamiento desprendimiento, formación de agregados celulares granulaciones citoplásmicas refráctiles, abombamiento, degeneración lítica
Hela	Humano  Continua	Virus sincitial respiratorio Herpes Adenovirus	Formación de sincitio  Formación agregados Redondeamiento celular
Hep 2	Humano  Continua	Virus sincitial respiratorio Adenovirus	
Riñón de mono verde africano	Riñón mono primario	Rubéola	No presenta ECP
MDCK	Riñón perro continua	Influenza Herpes Parainfluenza	
LLC-MK2	Riñón mono continua	Parainfluenza Enterovirus	No presenta ECP Hinchazón y redondeamiento celular
Fibroblastos de pulmón	Humano diploide	Citomegalovirus  Rhinovirus Virus sincitial respiratorio Enterovirus Varicela Zoster	Redondeamiento, hinchamiento, gránulos café refráctiles Similar a enterovirus  Similar a CMV sin gránulos refráctiles
Linfocitos sangre periférica	Humano primario	VIH	

con el cultivo donde sólo alcanza 27%. Este aumento de la positividad se atribuye a la IFA; su eficiencia evidente amerita su empleo<sup>14-16</sup>.

**Inmunoensayos: Ensayos de captura del antígeno (sandwich), inmunocromatografía.** Son inmunoensayos en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos para el virus en la superficie de una matriz, tubo o microplaca y luego se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno que se quiere demostrar; una vez ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado, que depende de la marcación del anticuerpo. La prueba se denomina radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA o EIA) dependiendo del trazador que se utilice para evidenciar la reacción. Se denomina RIA cuando el anticuerpo se marca con un isótopo radioactivo, el más utilizado es el yodo-<sup>125</sup>, el anticuerpo que reacciona a manera de sandwich, se pega a los epítopes del antígeno que han quedado expuestos; después de varios lavados, se mide o cuantifica la radioactividad mediante un contador de centelleo. El número de destellos por minuto es directamente proporcional a la concentración del antígeno que reacciona y de acuerdo con una serie de estándares de concentración conocida, se realiza una curva y se extrapolan los valores de la muestra. En la técnica ELISA el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la fosfatasa alcalina (FA) o la peroxidasa de rábano (PR) y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado. En el caso de la FA el sustrato es el paranitrofenilfosfato y para la PR es el peróxido de hidrógeno en una solución de ortofenilendiamina (OPD) que hace visible la reacción. Para la cuantificación se mide la absor-

bancia en una longitud de onda determinada en un espectrofotómetro. La absorbancia será directamente proporcional a la cantidad de antígeno descubierto. Estas técnicas se utilizan ampliamente en el diagnóstico de hepatitis A y B, rotavirus, el agente Norwalk, ADV, el RSV, parainfluenza, influenza A y B<sup>1,5,7</sup>. Para la hepatitis B la demostración de antígeno de superficie diagnóstica la infección activa y en VIH la demostración del antígeno p 24 es útil en el diagnóstico de la infección en niños y en pacientes que se encuentran en ventana inmunológica, además es de gran utilidad en el pronóstico y la progresión de la infección así como en el control de la terapia antirretroviral.

• **Técnicas de diagnóstico molecular.** Comprenden las técnicas que evidencian o descubren el material genético específico viral conservado y replicable ya sea que se encuentre en un fluido, en una célula o tejido, ya sea activo o latente. Estas técnicas, que son más rápidas que las tradicionales, permiten hacer estudios en tejidos almacenados y se pueden clasificar en dos categorías:

- Ensayos de hibridización.
- Técnicas para la amplificación del ácido nucleico<sup>17,18</sup>.

**Ensayos de hibridización:**

**Hibridización con sondas.** Los recientes avances en el campo de la biología molecular y el conocimiento cada vez mayor de los virus que causan infecciones importantes en la comunidad, han hecho posible que en el momento se disponga de fragmentos de ADN del material genómico específico y altamente conservado de un determinado virus que se utiliza como sonda. Ésta frente a sus secuencias complementarias se hibridiza para formar una molécula dúplex. Esta técnica se puede aplicar ya sea para confirmar la identificación de un virus en cultivo o descubrirlo directamente en una muestra. Se pueden utilizar células o tejidos fijados con sustancias que conserven la morfología celular y la integridad del ADN o ARN. Para estudios de ARN se requieren tejidos frescos congelados rápidamente con nitrógeno líquido y para estudios de ADN se pueden emplear tanto tejidos fijados como congelados. Las sondas preparadas a partir del ADN o ARN específico se pueden purificar por clonación o copia en un plásmido del ADN o del ADNc (complementario) obtenido de transcripciones de ARN. Utilizando el plásmido como vector y bacterias como huéspedes, es posible

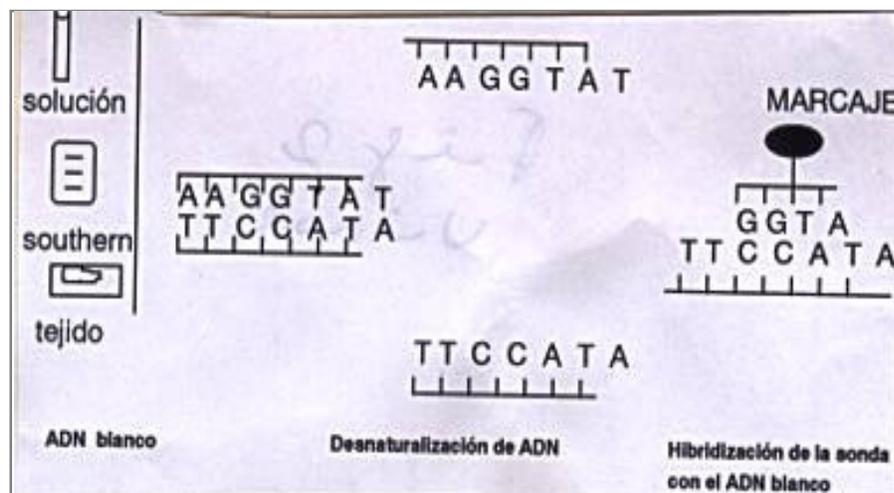


Figura 2. Hibridización con sondas

producir sondas genéticas en grandes cantidades. Los fragmentos de ADN o ARN (sondas) se someten a un análisis de hibridización (o apareamiento con el complementario que se encuentra en el material que se va a probar); éste se puede hacer ya sea con ADN o ARN tisular en solución, directamente en tejidos o células por hibridización *in situ*, o se puede efectuar sobre ADN o ARN transferidos en membranas de nitrocelulosa a partir de una electroforesis en gel de agarosa. Las sondas se pueden marcar con radioisótopos ( $P_{32}$ ,  $I_{125}$ ,  $S_{35}$ ), enzimas, avidina o moléculas quimioluminiscentes para que la formación de las moléculas dúplex sea descubierta. Las sondas radioactivas requieren el empleo de autorradiografía para su descubrimiento mientras que las sondas marcadas con enzimas se demuestran por métodos colorimétricos (Figura 2). La sensibilidad de las sondas depende de la cantidad de material genético para la hibridización y su especificidad depende de la calidad de la sonda. Una de las principales limitaciones de esta técnica se ve cuando existe una baja cantidad de ADN o ARN y éste no se descubre. Muchas de estas pruebas tienen una sensibilidad que les permite descubrir  $10^5$ - $10^6$  moléculas o aun  $10^3$ - $10^4$  moléculas; sin embargo, esto

puede ser insuficiente en muchas situaciones clínicas.

Actualmente se hacen esfuerzos para mejorar la especificidad de las sondas y la cinética de las reacciones de hibridización con el fin de reducir el tiempo para generar resultados. Esta técnica se sigue con éxito para evidenciar la presencia de papilomavirus en biopsias o raspados cervicales, en la demostración *in situ* de cantidades pequeñas de virus de la hepatitis B, virus Epstein Barr (EBV), HSV tipo I, CMV, ADV y rotavirus. Se dispone de estuches comerciales de sondas para el descubrimiento de CMV, HSV y ADV<sup>5,17,18</sup>. También se utilizan para identificar las secuencias complementarias del virus de hepatitis E, identificar el parvovirus B 19 en suero, en leucocitos, en secreciones respiratorias, en orina y tejidos; para los virus de hepatitis A, B y C también hay sondas disponibles. La hibridización con sondas para descubrir gérmenes patógenos incluso se ha automatizado para realizar análisis de tejidos fijos en placa, pero estas técnicas todavía no se encuentran disponibles en Cali.

*Técnicas de amplificación del ácido nucleico:*

*Reacción en cadena de la polimerasa.* Conocida como PCR (si-

glas en inglés de polymerase chain reaction) mediante esta técnica se pueden encontrar cantidades mínimas de un agente infeccioso en una muestra clínica gracias a la amplificación selectiva y repetitiva de una secuencia de nucleótidos de un microorganismo determinado que hace un proceso de síntesis de ADN. La PCR consta de tres pasos: a) La desnaturalización del ADN en la muestra, lo que se logra al someterlo a altas temperaturas (95°C) para lograr la separación de las cadenas, b) La hibridización de los cebadores (a 55°C) que son unos fragmentos cortos de ADN complementarios a los extremos 5' y 3' de las secuencias por amplificar y a partir de los cuales se inicia la síntesis, éstos son específicos de la secuencia del microorganismo que ha de descubrir y c) La extensión de estos cebadores por la enzima ADN polimerasa (a 72°C) termoestable (la taq polimerasa extraída de la bacteria **Thermus aquaticus**) que produce dos bandas de ADN que son idénticas a la banda blanco original. Estas reacciones se llevan a cabo de una forma automatizada en un equipo denominado termociclador. Así, en cada ciclo de estos tres pasos, se duplica el material genético en un factor de  $2^n$  (donde n es el número de ciclos) hasta que éste se evidencia fácilmente en un gel de agarosa y se confronta con una sonda específica para confirmar la identificación final del material encontrado (Figura 3). De esta manera, después de 30 ciclos, se puede demostrar una copia del VIH aunque se encuentre en una de cada millón de células T. La PCR se utiliza para descubrir VIH, CMV, virus de la hepatitis B, papilomavirus, hantavirus, herpes 6 y 8, así como una gran variedad de patógenos (bacterias, parásitos, etc.)<sup>19-22</sup>. Esta prueba se puede hacer directamente en muestras de enfermos con un proceso previo de extracción de

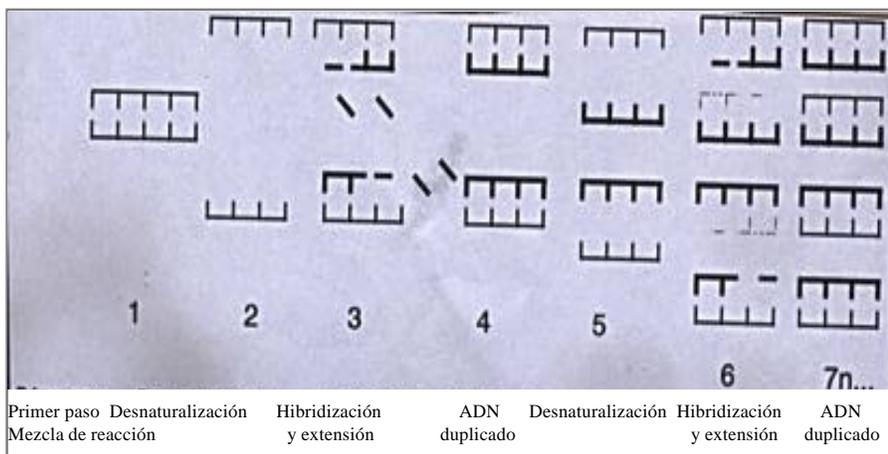


Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa

ADN; también se puede realizar a partir de cultivos del microorganismo que se quiere descubrir, es relativamente rápida (demora entre 6 y 8 horas) y se puede automatizar. La PCR presenta una sensibilidad y especificidad altas, pero varían según el ensayo para el que se ha diseñado<sup>5,17,18</sup>. Es una alternativa cuando otras pruebas no ofrecen mayor sensibilidad y en entidades en las que no hay mayor disponibilidad de pruebas diagnósticas. Sin embargo, posee algunas limitaciones, como la necesidad de cebadores específicos para encontrar determinado microorganismo y por ello hay la posibilidad de falsos positivos, lo que implica un conocimiento adecuado de la secuencia de nucleótidos del agente. Además, la prueba se debe efectuar en condiciones adecuadas de astringencia, es decir, una temperatura, pH y concentración de cebadores y nucleótidos apropiados. Si hay fallas, pueden ocurrir amplificaciones inespecíficas, y contaminaciones con ADN extraño. Esto dificulta la aplicación de esta técnica de rutina en el laboratorio clínico porque exige infraestructura y entrenamiento adecuados. Es importante tener en cuenta que una PCR positiva no siempre indica infección activa, pues demuestra material genético y se puede tratar de una infección latente o presencia de material genético de un agente no infectivo; por tanto su interpretación se hace en el contexto clínico de la persona. Un ejemplo de su utilidad en la clínica es la evaluación de HSV en el LCR en encefalitis, donde la PCR tiene una sensibilidad mayor de 95% en el momento de la presentación clínica y una especificidad de 100%<sup>23,24</sup>. La PCR ha sido de valor diagnóstico considerable en descubrir portadores del virus de hepatitis B; mediante esta técnica se demuestra la presencia del genoma del virus en secreciones lacrimales de 50% de los

portadores incluso los asintomáticos, lo que es importante frente al auge de los trasplantes de tejidos oculares. Además, es de utilidad en el diagnóstico de virus mutantes de la hepatitis B que no expresan antígeno e (HBe) asociado con ADN viral circulante y que son causa frecuente de hepatitis aguda y mortal. En la hepatitis C se dice que los resultados obtenidos con PCR (RT-PCR transcripción previa del ARN a ADN) son superiores a la prueba serológica de demostración de anticuerpos. En el caso de infección por CMV es importante para encontrar infecciones subclínicas o que no han sido descubiertas por otros métodos, lo que es de interés en el caso de trasplantes y en individuos VIH positivos en los que se debe iniciar la profilaxis antes que la infección comience. Para infecciones por enterovirus la PCR fue la técnica más sensible en el diagnóstico de estas entidades en niños<sup>5,17,18</sup>.

Una de las mayores ventajas de la PCR, es que puede evidenciar una infección aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica, lo que permite disminuir la transmisión de estas infecciones, en el caso del virus de hepatitis B reduce la demostración a 11 días postinfección y en la hepatitis C la reduce de 59 a 25 días.

A partir de esta técnica de PCR hay varias modificaciones empleadas para dar mayor sensibilidad, entre ellas el sistema para demostración colorimétrica de ADN amplificado que se sigue para demostrar CMV. Este sistema emplea un cebador biotinilado para amplificar la secuencia blanco, una sonda ARN específica no marcada y una microplaca con estreptavidina que une una gran cantidad de anticuerpos antihíbridos ARN-ADN y (de la sonda y el amplificado); luego se desarrolla colorimétricamente la reacción enzimática. La sensibilidad de esta técnica es de 100%

comparada con la tradicional que utiliza la electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio que tenía una sensibilidad de 79.5%; la especificidad fue igual en ambas (100%), de esta forma esta variación colorimétrica de la técnica es rápida (4 horas), objetiva, estandarizada, sensible y específica para la demostración del producto amplificado en la PCR<sup>10</sup>.

Una de las modificaciones de la PCR permite encontrar ARN con un paso previo de síntesis de una copia de ADN o cADN a partir del ARN blanco, mediante la enzima transcriptasa reversa. Así se puede hallar menos de una copia del material genético del virus<sup>5</sup>.

Otra modificación de la PCR es la PCR *nested* o doble PCR o PCR anidada, en la que se hacen dos amplificaciones sucesivas a partir del producto inicial obtenido. En otra variación de la PCR, denominada PCR múltiple, se utilizan una o más secuencias blanco de ADN que se amplifican simultáneamente. Esto se usa sobre todo como control interno de la prueba.

Otros ensayos de amplificación son:

*Reacción en cadena de la ligasa o LCR*. Se basa en fases secuenciales de una ligación de dos sondas de oligonucleótidos dependientes de un patrón. El producto de la LCR es el resultado de la ligación de los cebadores yuxtapuestos, en este caso se utilizan 4 cebadores para lograr una amplificación exponencial, esta técnica se puede automatizar (IMX de los laboratorios Abbott) y su mayor empleo ha sido para el diagnóstico de **Mycobacterium tuberculosis**, **Borrelia burgdorferi**, **Neisseria gonorrhoeae** y **N. meningitidis**<sup>5,18</sup>.

*Sistema QB replicasa*. La QB replicasa es una ARN polimerasa que replica el ARN que tiene la estructura genómica del ARN del bacteriófago QB. Una pequeña secuencia blanco in-

sertada se puede incluir en el ARN genómico y esto permite su hibridización con una secuencia blanco específica. La QB replicasa, amplificará la sonda mil millones de veces, para que luego sea descubierta. Este método es rápido, altamente sensible y cuantitativo; sin embargo, todavía presenta problemas de inespecificidad.

*ADN ramificado (branched) o bADN.* Es un sistema de amplificación, donde lo que se amplifica es la señal en lugar del blanco de ácido nucleico, esto se hace mediante pasos sucesivos de hibridización. El ácido nucleico viral se captura por hibridización, con un oligonucleótido unido a una fase sólida y una segunda sonda específica para el virus que contiene a su vez una sonda para el bADN amplificador. Este bADN tiene múltiples cadenas ramificadas a manera de árbol y cada una de estas ramas es un sitio de hibridización con una sonda marcada con una enzima,

que reacciona con un sustrato que permite la demostración colorimétrica o quimioluminiscente. Esta prueba se ha aplicado para el diagnóstico de HCV, VIH, CMV y hepatitis. También sirve para monitorear los niveles de ARN de HCV y VIH durante y después del tratamiento<sup>5</sup>.

Otras técnicas de amplificación descritas son el 3 SR y el SDA. Sin embargo su empleo es sólo a nivel investigativo<sup>17</sup>.

*Ensayo de transcriptasa reversa.* Es una prueba aplicada a los retrovirus que pueden ser descubiertos por la actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN que se halla en los cultivos de linfocitos. Además, los ensayos de transcripción de ARN a ADN se utilizan en combinación con la PCR en el caso de virus con ARN y son denominados RT-PCR. Ejemplo, para demostrar el genoma de virus como el VIH, VHC<sup>5</sup>.

**TÉCNICAS INDIRECTAS PARA EL DESCUBRIMIENTO VIRAL**

Estas son las técnicas serológicas tradicionales para descubrir anticuerpos contra determinado agente viral, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos. Estos ensayos se pueden clasificar en tres grupos con base en la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo.

- a. Los que dependen de la capacidad del anticuerpo que se une al antígeno para ejercer alguna función no relacionada con el virus, por ejemplo: la fijación del complemento (FC), hemaglutinación indirecta (HI), aglutinación por látex.
- b. Los que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica como la neutralización, la inhibición de la hemaglutinación (IH), la inhibición de la neuraminidasa (que mide la capacidad de los anticuerpos para bloquear la infectividad viral), la hemaglutinación viral y la actividad de neuraminidasa.
- c. Los que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo como por ejemplo: la IFA indirecta, el RIA, ELISA y el Western blot<sup>1,5</sup>.

**• Técnicas indirectas tipo a:**

*Fijación de complemento.* La FC es un proceso de dos pasos, esta técnica emplea el complemento para lisar los eritrocitos que, a su vez, funcionan como indicadores. Durante el primer paso, el antígeno reacciona con el anticuerpo que se encuentra en la muestra de suero del paciente, en presencia de complemento (casi siempre de suero de conejo) titulado previamente. Si el antígeno y el anticuerpo reaccionan, se activa la vía clásica del complemento, luego se añade el indicador constituido

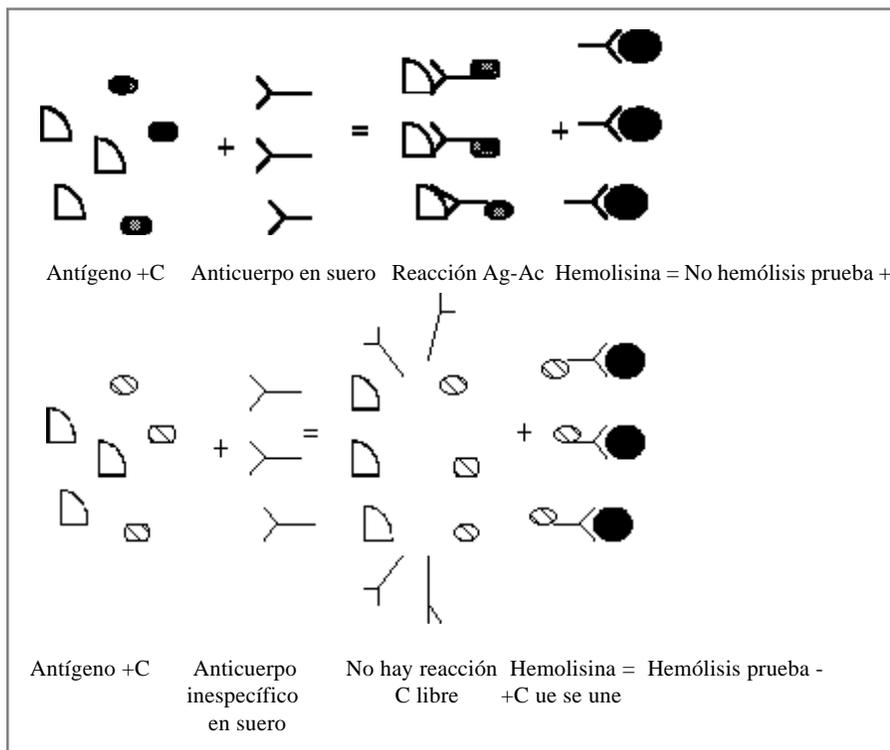


Figura 4. Fijación de complemento

por eritrocitos cubiertos con anticuerpos y de esta forma, si el complemento se fija y se activa por el complejo antígeno viral-anticuerpos del paciente, los eritrocitos no se lisarán. Si durante la primera fase no hay unión antígeno-anticuerpo el complemento permanece libre y se une al complejo indicador y produce la lisis de eritrocitos. Este es un sistema semicuantitativo y es una de las pruebas serológicas tradicionales utilizada como estándar de comparación («gold standard») para las nuevas pruebas comerciales<sup>5,12,25</sup>. Una de sus aplicaciones es determinar anticuerpos contra agentes de baja prevalencia como los virus Coxsackie. Los anticuerpos que fijan el complemento aparecen tardíamente comparados con los descubiertos por otras pruebas y tienen una vida corta, lo que puede ser útil para determinar la actividad de ciertas infecciones, como por ejemplo la rubéola (Figura 4).

**Hemaglutinación indirecta.** Los eritrocitos se pueden sensibilizar con diversos antígenos y se pueden utilizar como sistema indicador. Así, si se descubren los anticuerpos, la reacción se revelará como una hemoaglutinación que se puede advertir fácilmente a simple vista. Existe una amplia variedad de antígenos que se pueden unir a los glóbulos rojos, entre ellos los carbohidratos que se adhieren con rapidez, en el caso de las proteínas se requiere un proceso de pretratamiento con ácido tánico o con cloruro de cromo. Este sistema se usa para demostrar anticuerpos contra toxinas como la de la difteria o del tétanos. También para descubrir anticuerpos contra el virus de fiebre amarilla, VZV, influenza, parainfluenza y dengue<sup>1,5,12,26</sup>.

**Aglutinación de látex.** Es similar a la técnica de látex ya descrita sólo que en este caso el antígeno se encuentra fijo a la partícula de látex y, por tanto, se

espera descubrir los anticuerpos que se encuentran en la muestra. Estos ensayos generalmente son pruebas de filtro (tamizaje) pues sólo determinan la presencia o no de anticuerpos. Los resultados se pueden interpretar como «inmune» (si es positivo) o «susceptible» (si es negativo), como en el caso de determinar el estado inmune para el virus de la rubéola. La información que suministra corresponde a exposición al agente o infección pasada y aunque, como se ha afirmado, la IgM es una aglutinina muy buena, generalmente las pruebas de látex no son específicas para ésta. En virología se utiliza con más frecuencia la técnica de aglutinación de látex directa<sup>27,28</sup>.

• **Técnicas indirectas tipo b**

**Neutralización viral.** Demuestra anticuerpos por su efecto inhibitorio en la infectividad viral. Este ensayo mide funciones virales específicas, por lo que es bastante selectivo, de esta forma la neutralización viral sólo mide

anticuerpos para antígenos específicos sobre la superficie viral. Si los anticuerpos se encuentran en el suero del paciente que se pone a incubar con una suspensión del virus, los anticuerpos reaccionarán con los antígenos virales, y cuando la suspensión se ponga en presencia de las células permisivas al virus (en cultivo celular) el resultado será la neutralización de la invasión celular y la no evidencia del EC. En caso de no existir anticuerpos en el suero de paciente, se producirá la invasión celular y como consecuencia se hará evidente el EC característico. Para realizar esta prueba se debe disponer de líneas celulares adecuadas y por lo general se hace en laboratorios donde se tiene toda la infraestructura para los cultivos celulares. Esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico de las infecciones por dengue<sup>26</sup>.

**Neutralización viral**

Resultado positivo (Figura 5A). Resultado negativo (Figura 5B)

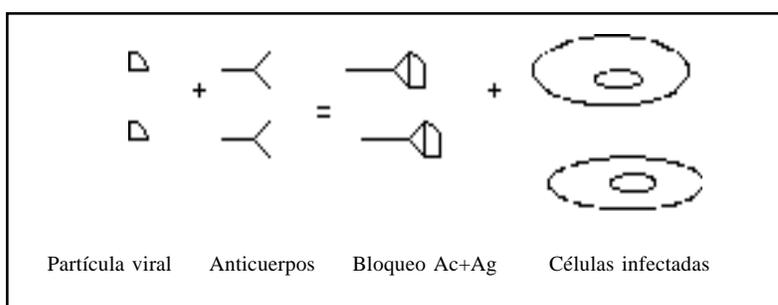


Figura 5A

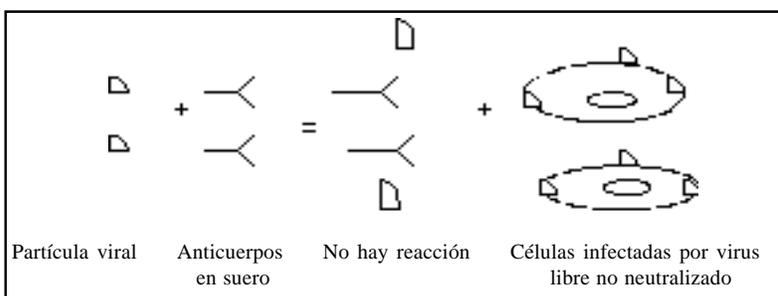


Figura 5B

Figura 5. Prueba de la neutralización

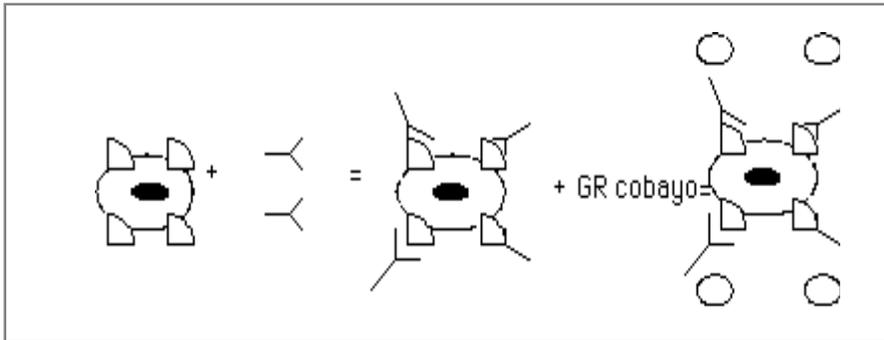


Figura 6. Inhibición de la hemaglutinación

*Inhibición de la hemaglutinación (IH).* Algunos antígenos virales tienen capacidad para aglutinar eritrocitos de diversas especies, sin embargo la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente evitan la aglutinación de los eritrocitos por tales antígenos; cuando esto ocurre se evidencia la presencia de anticuerpos. Para cuantificarlos se hacen diversas diluciones del suero con el fin de hacer una titulación y determinar el nivel de anticuerpos del paciente. Esta prueba al principio se utilizó para demostrar anticuerpos contra rubéola y dengue, pero se ha reemplazado por ELISA, pues la IH no puede diferenciar entre anticuerpos tipo IgM (infección aguda) o IgG (infección antigua), sin embargo aún se utiliza para influenza y para otros virus menos abundantes que poseen actividad hemaglutinante como los arbovirus (p.e., virus de la fiebre amarilla), reovirus y algunos enterovirus (Figura 6)<sup>1,12</sup>.

• **Técnicas indirectas tipo c**

*IFA indirecta.* En una placa se ponen las células infectadas con un virus determinado, que tienen antígenos de éste en su membrana, y se fijan; luego se agrega el suero del paciente y después de una incubación, si hay anticuerpos en el suero, se forma un complejo antígeno-anticuerpo, que se revela por medio de un conjugado fluorescente. Cuando existen los anticuerpos

en el suero problema y se añade el conjugado fluorescente (anti IgG, IgA, IgM) ocurre una segunda reacción antígeno-anticuerpo, que origina un patrón específico de fluorescencia según los anticuerpos que reaccionen con el sustrato. Este patrón sólo se podrá observar en un microscopio de fluorescencia. Las características del patrón dependen de los antígenos reconocidos por el anticuerpo ya sea intracitoplasmáticos o intranucleares. Este conjugado reacciona con anticuerpos del tipo IgM, IgG e IgA, pero cuando se necesita descubrir la fase aguda de la infección, el conjugado debe ser específico para las cadenas pesadas de la IgM. No obstante, es posible que haya falsos positivos debido a diversos factores, entre otros la presencia del factor reumatoide y de anticuerpos heterotípicos entre virus de la familia Herpes-viridae, pues pacientes infectados con EBV o el virus varicela-zóster pueden mostrar anticuerpos IgM para CMV sin que haya infección por este virus. Las pruebas para IgM también puede tener falsos negativos, si la IgG inhibe o compite con la IgM por los sitios de unión al antígeno. Aunque la especificidad de la inmunofluorescencia es muy buena y depende del sustrato utilizado, la sensibilidad depende del nivel de fluorescencia demostrable por el ojo humano. Esta técnica se ha utilizado para

descubrir anticuerpos contra rubéola, VIH, CMV y HSV<sup>1,6,12,19,26,29</sup>. Sin embargo, recientemente ELISA la ha desplazado porque ofrece una especificidad similar y se puede leer mediante equipos automatizados lo que elimina la subjetividad inherente al observador en IFA y la necesidad del microscopio de fluorescencia.

*ELISA.* La prueba ELISA indirecta tiene un principio semejante al de la ELISA directa, sólo que en este caso, un antígeno específico está unido a una fase sólida que puede ser un tubo, microplaca o perlas de vidrio; luego se añade el suero del paciente que posee los anticuerpos y después se adiciona el conjugado constituido por un anti-anticuerpo IgG o IgM unido a una enzima; posteriormente se adiciona el sustrato específico para la enzima, que lo va a modificar y produce un compuesto coloreado, cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpo en el suero del paciente. Esta prueba se utiliza ampliamente; más aún, con el advenimiento y la disponibilidad de los sistemas automatizados se puede efectuar en un período de 1 a 2 horas. Mediante esta técnica se pueden señalar niveles de IgM e IgG con ensayos por separado para evitar los falsos positivos y negativos. Su utilidad en virología es básicamente para determinar anticuerpos contra antígenos específicos del dengue, HSV, VIH, RSV, CMV, rubéola, hepatitis A, B y C principalmente, y en infecciones por EBV se usa para demostrar marcadores serológicos tempranos de la infección, que se pueden utilizar en el manejo de huéspedes inmunocomprometidos<sup>1,5,12,18,19,30</sup>. Su especificidad depende del antígeno que se utilice en la fase sólida; de acuerdo con esto la prueba puede ser:

- a. De primera generación que son pruebas incipientes donde se utilizan antígenos crudos sin mayores pro-

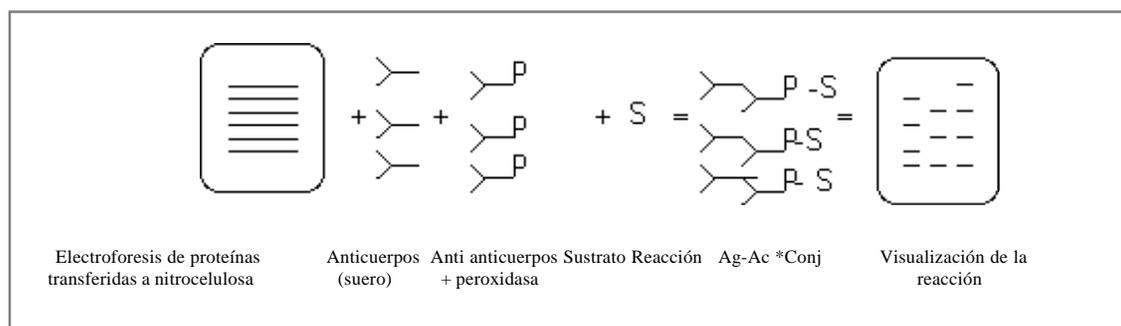


Figura 7. Western blot o inmunoblot

- cesos de purificación, como p.e., el virus completo inactivado, es el caso de las primeras técnicas de ELISA para VIH. Sin embargo, estos ensayos presentaban como resultado muchas reacciones inespecíficas;
- b. De segunda generación, en este caso los antígenos son proteínas recombinantes, que se producen mediante ingeniería genética en bacterias y son sometidas a procesos de purificación lo que da más especificidad a la prueba pues se descubren anticuerpos particulares contra las proteínas consideradas más inmunogénicas;
- c. De tercera generación, que son las más utilizadas actualmente y las más específicas, donde se emplean péptidos sintéticos (fabricados en un sintetizador en el laboratorio) con secuencias más específicas del virus: tal es el caso de las pruebas diseñadas para determinar sólo anticuerpos contra VIH2 y VIH1.

En otra modalidad de ELISA se usa el sistema biotina/avidina-estreptavidina, método que se fundamenta en sistemas con distintos marcadores unidos a la biotina y demostrados por reacciones enzimáticas, de color o quimioluminiscentes que portan la avidina, la estreptavidina o la biotina. La biotina ligada a un anticuerpo, nucleótidos, proteína o lecitina, se une a una molécula blanca que puede ser anticuerpo (in-

directa) o antígeno (directa), la avidina o estreptavidina se marcan con una molécula demostrable como una enzima, una sustancia fluorescente o un metal. La avidina o la estreptavidina marcada se unen a la biotina y de esta forma se descubre la molécula blanco<sup>11</sup>.

Hay otras modalidades de ELISA, que son pruebas rápidas que se pueden observar visualmente y se utilizan en laboratorios rurales o de primer nivel; son las ELISA de cartucho donde los antígenos se encuentran inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa en un cartucho, se adiciona el suero y se filtra a través de una membrana, se hace un lavado y se usa un anticuerpo marcado específico para la inmunoglobulina que se quiere demostrar; después de un lavado se aplica el sustrato. Un resultado positivo se observa porque se produce un compuesto coloreado a manera de mancha (dot blot) donde se encuentra el antígeno inmovilizado. Esta prueba se puede hacer en 10 minutos y se utiliza sobre todo para determinar anticuerpos contra VIH. Sin embargo, ante resultados de difícil interpretación se recurre a la ELISA de tercera generación y a las pruebas confirmatorias.

**Inmunoblot o Western blot.** A partir de un extracto viral se hace una electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida, lo que permite la separación de las proteínas virales de acuerdo

con su peso molecular, y mediante un sistema de transferencia, se fijan a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana que luce un mapa de proteínas, se corta en tiras delgadas verticales y cada una de ellas quedará con un perfil de proteínas, después se pone a reaccionar el suero del paciente donde se encuentran los anticuerpos específicos para las proteínas virales que se hallan en la membrana y después de un lavado, se aplica el conjugado que es un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano, se incuba, se lava y posteriormente se adiciona el sustrato enzimático. Una reacción de unión antígeno y anticuerpo se observará como una banda de color café que hace evidente la unión de los anticuerpos que reaccionaron con la proteína que migró en ese sitio. Al comparar con un control se ubica y se determina el tipo de proteína para la cual hay antígenos específicos; de esta forma se puede definir exactamente contra cuáles proteínas están dirigidos los anticuerpos del paciente y asimismo determinar la fase de la infección en que se encuentra. Esta prueba es muy específica y se utiliza como suplementaria y confirmatoria en infección por el VIH o HTLV-I cuando ELISA da resultados contradictorios o difíciles de interpretar. También se utiliza para diferenciar entre infección por VIH1 y VIH2. En estos momentos se emplea en muchos labo-

**Cuadro 4**  
**Pruebas para el diagnóstico viral**

Características	Examen directo	Cultivo viral	F. de complemento	Hemaglutinación	Neutralización
•Tiempo de realización	1-2 horas	4-8 días o semanas	1 día	Varias horas	Varias horas
•Grado de complejidad	Bajo	Alto	Alto	Medio	Medio
•¿Qué encuentra?	Es una tinción			No automatizada	No automatizada
	Efectos celulares producidos por el virus	El virus permisible al cultivo celular	Anticuerpos contra el virus	Anticuerpos contra el virus	Anticuerpos contra el virus
•Sensibilidad tinción y el observador	Depende de la preparación	Buena, relativa a la muestra	Buena	Buena	Buena
•Especificidad	Puede ser baja				
•Limitaciones	Relativa Subjetiva	Excelente Necesita cultivos celulares entrenamiento, infraestructura	Buena Es dispendiosa, requiere muchos controles de reactivos	Buena No diferencia tipos de anticuerpos IgM e IgG	Buena No diferencia IgM de IgG. Requiere cultivo celular
Características	Inhibición de la hemaglutinación	Agglutinación de látex	Inmunofluorescencia	ELISA- RIA	Western blot
•Tiempo de realización	Varias horas	Unos minutos	2-6 horas	1-4 horas	1 día
•Grado de complejidad	Medio No automatizado	Bajo. No necesita equipo ni entrenamiento especial	Medio	Bajo Automatizada Permite manejo de	Medio No automatizada
•¿Qué encuentra?	Anticuerpos contra virus	Antígenos o anticuerpos	gran volumen de muestras Antígenos o anticuerpos	Antígenos o anticuerpos	Antígenos específicos
•Sensibilidad	Buena	Buena.	Buena. Es alta cuando se combina con el cultivo (IF directa)	Muy buena	Buena
•Especificidad	Buena	Buena	Excelente Se visualiza el sustrato	Muy buena, depende del tipo de generación del ELISA.	Excelente
•Limitaciones	No diferencia IgM e IgG	Reacciones cruzadas y fenómeno prozona microscopio de inmuno-	Subjetiva, produce fatiga ocular, necesita disminuir la sensibilidad. fluorescencia. Falsos + por factor reumatoideo	ELISA directa: la baja concentración de antígeno inconcluyentes RIA: uso de isótopos radioactivos.	Puede dar resultados cuando el título de anticuerpos es bajo
Características	Hibridación con sondas	Hibridación in situ	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)		
•Tiempo de realización	2- 4 horas	Varios días	4-8 horas		
•Grado de complejidad	Alto	Alto	Media automatizada		
•¿Qué encuentra?	ADN- ARN viral	Puede automatizarse ADN-ARN viral	Requiere entrenamiento adecuado ADN-ARN viral		
•Sensibilidad	Buena-relativa	Buena	Excelente		
•Especificidad	Excelente	Excelente	Excelente-relativa		
•Limitaciones	La sensibilidad depende de la concentración de ADN o ARN presente en la muestra. Los costos son altos	Alto costo	La sensibilidad y especificidad varía según el caso y depende del apareamiento de los cebadores Necesita condiciones estrictas de astringencia. Alto costo		

ratorios clínicos y de referencia<sup>27,30,31</sup> (Figura 7).

### PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD VIRAL

El desarrollo de resistencia clínica a los agentes antivirales, se ha documentado en varios virus de importancia clínica, que incluyen el virus de influenza, HSV, VZV, CMV y VIH. Una de las principales causas para esto es el uso diseminado y cada vez más frecuente y rutinario de los antivirales. Por tanto, los datos acerca de los perfiles de susceptibilidad viral son importantes y útiles, tanto por razones clínicas como epidemiológicas. Una de las mayores aplicaciones o en los casos donde es más evidente y necesario esto, es en la infección por el VIH donde el perfil de sensibilidad del virus es importante en el seguimiento y en el enfoque del manejo terapéutico de la enfermedad.

Es claro que para efectuar pruebas de susceptibilidad es necesario obtener primero un aislamiento viral; a partir de éste se pueden hacer métodos diferentes para este propósito, a saber: medir la replicación viral en presencia de concentraciones variables de antivirales, que incluyen la reducción de la formación de placa, hibridización de ADN o ARN, inmunofluorescencia y ensayos con colorantes. Además existe la posibilidad de descubrir mutaciones por PCR que son responsables de la resistencia a ciertos agentes antivirales, un ejemplo de ello es el gen de la transcriptasa reversa del VIH asociado con resistencia a zidovudina, la timidina quinasa o la ADN polimerasa asociadas con la resistencia al aciclovir o el gen M2 del virus de influenza que se asocia con resistencia a amantadina y rimantadina.

En términos generales las pruebas para susceptibilidad viral no se encuen-

tran totalmente estandarizadas salvo para VIH. Los resultados pueden depender de factores múltiples como el tipo de prueba, la línea celular utilizada, el inóculo viral y el laboratorio donde se llevan a cabo las pruebas<sup>5</sup>.

### CONCLUSIONES

Las pruebas de diagnóstico viral se han desarrollado de manera importante en los últimos años, nuevas técnicas más rápidas, simples, poco costosas, sensibles y específicas se ofrecen hoy en día, sin embargo, la evaluación de éstas siempre se debe hacer con base en los «estándares de oro» (como los cultivos y la fijación de complemento, etc.) y de acuerdo con una adecuada correlación clínica. La disponibilidad de estas pruebas se debe acompañar de una óptima realización a nivel técnico, y una adecuada recolección y almacenamiento de la muestra, además de una interpretación acertada. La demostración directa de antígenos tiene valor en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la infección así como en el tratamiento médico y es indicador importante de infección activa. Sin embargo, en algunos casos la concentración del antígeno puede no ser suficiente para su descubrimiento. Por otro lado, la determinación de anticuerpos es útil particularmente cuando no se tiene la posibilidad de realizar una demostración directa de antígeno o en caso de ser negativa a pesar de la sospecha clínica o porque haya pasado la fase aguda de la infección. Estos casos constituyen un complemento para determinar el diagnóstico de una enfermedad. Las pruebas indirectas o de anticuerpos también son importantes para establecer los antecedentes de infección viral en la historia clínica de un paciente y en una comunidad y son claves en definir el modelo de diseminación de un serotipo

determinado. Sin embargo, deben tenerse criterios muy definidos para la interpretación de un título de anticuerpos y esto depende del tipo de la infección, la naturaleza del virus, la clase de anticuerpos y la condición del huésped. Para la interpretación de los títulos de anticuerpos se deben tener en cuenta algunas guías:

- Los cambios en el título de anticuerpos sólo se pueden interpretar cuando se hayan hecho con la misma técnica;
- Debe evitarse en lo posible interpretar un solo título alto de anticuerpos como indicativo de infección activa o aguda;
- La caída de los títulos suministra poca información, sólo que la infección ha ocurrido pero no en qué momento;
- Un aumento significativo en el título de anticuerpos en sueros pareados (agudo y convaleciente) se puede utilizar para el diagnóstico. Un suero agudo se obtiene durante la fase aguda de la enfermedad y se debe comparar con un suero convaleciente que se debe tomar a las dos semanas cuando la fase aguda ya se ha resuelto. Una diferencia de 4 títulos es significativa y puede indicar presencia de infección activa; esto es lo más indicado para el diagnóstico, pues una sola muestra de suero es muy difícil de interpretar<sup>1,3</sup>.

Las pruebas moleculares son una alternativa útil en el diagnóstico viral y su desarrollo es cada vez más amplio, sin embargo son costosas y requieren altos niveles de entrenamiento y estandarización que hacen que su puesta en marcha en el medio nacional se realice en forma progresiva y lenta, no obstante la necesidad de tenerlas disponibles.

Sin embargo, es importante recordar que, a pesar de la escasa disponibi-

lidad de las pruebas más avanzadas de diagnóstico viral, la utilización, realización e interpretación adecuada de los métodos de laboratorio accesibles dentro del contexto clínico del paciente, pueden ofrecer un óptimo diagnóstico o instaurar las medidas profilácticas o terapéuticas necesarias (Cuadro 4).

### SUMMARY

Diagnosis in viral entities is an important challenge due to its difficulties, particularly in developing countries where, in most cases, empirical diagnoses and therapy are usually carried on. However, worldwide improvements and availability of new technologies now permit the study of viruses and viral diseases in many laboratories, not only in specialized research facilities. Traditional tests used many years ago have been replaced by simple, rapid and often relatively inexpensive antigen detection test kits, that have revolutionized both clinical care and laboratory practice. The antibody test is useful to determine prevalence of viral infection and it is important to carry on epidemiological studies in local communities. On the other hand, molecular tests have improved the ability for detecting viral agents and to document an infection, the disease progression and the follow up of the therapy more conclusively. It is important the development of new methodology and the implementation of new tests for a good viral diagnosis, also it is appropriate an adequate use of the available tests, in order to make more accurate diagnoses. The aim of this article is to discuss the new technology for viral diagnosis and how and when to apply it. The review is planned as a guide about the viral diagnostic tools for health-care workers and students.

Key Words: Virus. Diagnosis.  
Viral infection.

### REFERENCIAS

- McIntosh K. Diagnostic virology. In Kpnipe TM, Fields BN, Houlay PM (eds.). *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Raven, 1996. Pp. 401-430.
- Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 120-131.
- Jaramillo C. El laboratorio de virología como auxiliar del clínico y de las autoridades de la salud. En Vélez A, Borrero J, Restrepo J, Rojas W (eds.). *Fundamentos de medicina: Enfermedades infecciosas*. 5ª ed. Medellín: CIB, 1996. Pp. 220-229.
- Rey G, Rojas MC. Toma, conservación y transporte de muestras para el diagnóstico virológico. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 1997; 18: 264-265.
- Atmar R, Englund J. Laboratory methods for the diagnosis of viral diseases. In Evans E, Kaslow R (eds.). *Viral infections of humans*. 4th ed. New York: Plenum Publishing Co., 1997. Pp. 229-251.
- Prevention and control of herpesvirus diseases. Part 1. Clinical and laboratory diagnosis and chemotherapy. *Bull WHO* 1985; 63: 185-201.
- Clarke L. Viruses, Rickettsiae, Chlamydiae and Mycoplasmae. In Isenberg HD (ed.). *Essential procedures for clinical microbiology*. Washington: ASM, 1998. Pp. 533-550.
- Lennette DA. Collection and preparation of specimens for virological examination. In Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 868-875.
- Jones BL. Cell culture systems. In Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 158-165.
- Janda JM, Desmond EP, Abbott S. Animal and animal cell culture systems. In Balows A (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. Washington: ASM, 1991. Pp. 137-145.
- Estrada JJ. Diagnóstico por detección de antígenos. *Acta Med Col* 1990; 15: 111-115.
- Ames K. Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 132-152.
- Drews AL, Atmar RL, Glezen PW, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1421-1429.
- Hodinka RL, Friedman HM. Human cytomegalovirus. In Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 884-894.
- Gershon A, Gold E, Nankervis G. Cytomegalovirus. In Evans AS, Kaslow R (eds.). *A viral infections of humans*. 4th ed. New York: Plenum Publishing Co., 1997. Pp. 59-82.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-554.
- Podzorski RP, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms. In Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 130-157.
- Pfaller MA. Molecular biology: molecular methods for direct detection of microorganisms in clinical specimens. In Isenberg HD (ed.). *Essential procedures for clinical microbiology*. Washington: ASM, 1998. Pp. 581-666.
- Peters JC. Hantavirus pulmonary syndrome in the Americas. In Scheld M, Craig W, Hughes J (eds.). *Emerging infections 2*. Washington: ASM, 1998. Pp. 17-64.
- Braun DK, Domínguez G, Pelletti P. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 521-567.
- Spira T, Jaffe H. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma. In Scheld M, Craig W, Hughes J (eds.). *Emerging infections 2*. Washington: ASM, 1998. Pp. 81-104.
- Khabbaz RH, Chamberland M. From priones to parasites: issues and concerns in blood safety. In Scheld M, Craig W, Hughes J (eds.). *Emerging infections 2*. Washington: ASM, 1998. Pp. 295-309.
- Murakami S, Mutsuhiko M, Nakahiro Y, Doi T, Hato N, Yanagihara H. Bell palsy and herpes simplex virus identification of viral DNA in endoneural fluid and muscle. *Ann Intern Med* 1996; 24: 27-30.
- Whitley RJ, Lakeman F. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: therapeutics and diagnostic considerations. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 414-420.
- Escobar M. Hemolytic assays: complement fixation and anti-streptolysin O. In Balows A (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. Pp. 73-78.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 480-

- 496.
27. Overall JC. Diagnostic virology. In Mc Clatchey KD (ed.). *Clinical laboratory medicine*. Baltimore; William & Wilkins, 1994.
28. Tinghitella TJ, Edberg S. Agglutination tests and *Limulus* assay for the diagnosis of infectious diseases. In Balows A (eds.). *Manual of clinical microbiology*. 5th. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. Pp. 61-72.
29. Rosebrock J. Labeled-antibody techniques fluorescent, radioisotopic, immunochemical. In Balows A (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 5th. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. Pp. 79-86.
30. Conroy JM, Stevens RW, Hechemy K. Enzyme immunoassay. In Balows A (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 5th. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. Pp. 87-92.
31. Janda WM. Immunology. In Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 561-577.