

## Diagnóstico de la infección viral

**E**l diagnóstico de la infección viral que afecta a un individuo en un momento dado, puede ser de gran importancia para el manejo clínico del caso (problema individual), pero es mucho más importante prevenir consecuencias graves en la población (problema poblacional).

Desde el punto de vista práctico, si comparamos las infecciones bacterianas o micóticas con las infecciones virales, puede resultar mucho más importante hacer el diagnóstico preciso de las primeras, pues esto determinará el tipo de antibiótico o la quimioterapia que se deba prescribir. En el caso de los virus, donde se adolece de “antibióticos” o de agentes químicos muy eficientes para el tratamiento, el diagnóstico puede resultar un poco superfluo.

Existen, sin embargo, una serie de infecciones virales en el hombre y en los animales donde el establecimiento de un diagnóstico oportuno es de capital importancia para determinar la conducta médica y/o epidemiológica a seguir. Es el caso, por ejemplo, de una enfermedad exantemática durante la gestación; aquí debemos determinar si se trata de rubeola, sarampión, varicela o dengue, pues ello podría determinar la recomendación de interrumpir el embarazo. Esto desde el punto de vista individual, pensando en la madre y el embrión o feto.

Un ejemplo donde el diagnóstico es importante para implementar medidas tendientes a conservar la salud pública, es el caso de una enfermedad diarreica; aquí debemos determinar si se trata de un rotavirus o de un poliovirus y en este último caso, cuál serotipo. Igualmente caen en esta categoría los casos de hepatitis, donde es importante saber si se trata de A, B, Delta o noAnoB; cada uno de estos casos tiene diferentes consecuencias a corto y a largo plazo.

Existen también algunas situaciones especiales donde el diagnóstico es importante para el individuo, como es el caso de los transplantados, especialmente cuando la sintomatología de la infección tiende a confundirse con el rechazo del órgano o con una reacción injerto contra huésped; este es el caso del citomegalovirus en el transplante renal y de médula ósea, respectivamente.

En términos generales e ideales podríamos decir que una infraestructura para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas es la base fundamental para un buen sistema de vigilancia epidemiológica. Tal infraestructura en nuestros países en desarrollo es muy pobre para el caso de las infecciones virales. Recordemos que la multiplicidad de los agentes virales requiere también de una diversidad de sistemas para la manipulación de estos agentes en el laboratorio: son necesarios diferentes tipos de cultivos celulares, diferentes animales de laboratorio, anticuerpos fluorescentes, microscopios de luz ultravioleta, radioisótopos, espectrofotómetros, nitrógeno líquido, técnicos de laboratorio y virólogos, entre otras cosas. Todos estos elementos son escasos en Colombia y por ello el diagnóstico de las infecciones virales está limitado a las grandes ciudades y sólo a algunas infecciones, generalmente aquellas donde los recursos son menos costosos.

Por todas estas consideraciones el principal elemento de diagnóstico en nuestro medio es la clínica; y también por ello la gran mayoría de las infecciones virales permanecen sin un diagnóstico preciso o son diagnosticadas simplemente como "virosis" a posteriori, cuando los antibióticos han demostrado su ineficacia. Esta es la situación actual, justificada en parte por

las circunstancias expuestas pero incompatibles con el futuro próximo, cuando tendremos agentes farmacológicos específicos contra las infecciones virales y cuando la preservación de la salud pública será una prioridad real de nuestro sistema de gobierno.

El diagnóstico de la infección viral se basa en el aislamiento del agente etiológico (diagnóstico virológico), en la determinación de una respuesta inmunológica contra el mismo (diagnóstico serológico) o en la determinación del tipo de daño causado en los tejidos del huésped (diagnóstico patológico). Para el aislamiento, se debe enviar al laboratorio una muestra apropiada con una descripción de la situación clínica y en lo posible un diagnóstico presuntivo. Esto con el fin de determinar los animales de laboratorio o las células que deben inocularse y para adoptar las medidas preventivas por parte del laboratorista, pues no implica el mismo riesgo el trabajo con el herpes simplex que el trabajo con el virus de la rabia. Si llega una muestra de materia fecal al laboratorio con una sospecha de poliomielitis, se procederá a inocular la muestra en células VERO; en caso de que el resultado sea negativo, es decir que no se produjo el efecto esperado del virus, no se puede descartar que se trate de otra infección viral, pues no todos los virus van a crecer en este substrato celular.

El diagnóstico mediante el aislamiento del agente viral es el método más fidedigno pero tiene la desventaja de ser costoso, ya que es necesario tener toda una batería de posibilidades para satisfacer los requerimientos de cada agente. Por otro lado, el aislamiento de los virus puede tomar varios días y aun varias semanas, por lo cual el resultado suele llegar tarde. Por lo anterior, desde hace muchos años el desarrollo de técnicas rápidas, específicas, sensibles y baratas, ha sido una prioridad en la investigación virológica (generalmente tantas cualidades no vienen juntas). En la actualidad podemos mencionar algunas técnicas que se acercan a esas características ideales: la inmunofluorescencia, la fijación del complemento, pruebas inmunoenzimáticas y pruebas a base de ácidos nucleicos, etc., de las cuales hablaremos posteriormente.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos contra un antígeno viral determinado y, en ese sentido, sólo nos sirve para hacer un diagnóstico retrospectivo. Si, ante un caso de una enfermedad febril aguda, queremos determinar si se trata, por ejemplo, de encefalitis equina venezolana, debemos tomar una muestra de suero del paciente en la fase aguda de la enfermedad y otra dos semanas más tarde (en la fase convaleciente). Si al comparar los dos sueros se detecta que el suero convaleciente tiene un título de anticuerpos contra el virus de la encefalitis

equina venezolana, significativamente mayor que el suero agudo (por lo menos cuatro veces mayor), podemos decir que éste es el virus responsable de la sintomatología descrita.

Si el paciente del caso descrito anteriormente, no tiene anticuerpos contra el virus en ninguna de las dos muestras, diremos que esta persona nunca ha tenido contacto con el virus. Si por el contrario, el paciente tiene títulos altos de anticuerpos en la muestra del suero agudo e igualmente altos en la muestra convaleciente, diremos que el paciente sufrió la infección con este virus en algún momento de su vida, pero no está asociado con la enfermedad motivo de la investigación.

Para determinar la presencia de anticuerpos en una muestra de suero se mezclan el virus y el suero en diferentes diluciones, luego el virus así tratado se inocula en animales de laboratorio o en células (sistema indicador). Se espera que los anticuerpos neutralicen la patogenicidad del virus (a mayor concentración de anticuerpos en el suero, mayor será el índice de neutralización). Para medir la neutralización utilizamos las mismas medidas utilizadas para la cuantificación viral: Dosis Letal 50% (DL50), Dosis Infecciosa 50% (DI50) y Unidades Formadoras de Placa (UFP), principalmente. Todo se basa en la comparación de los títulos del virus en presencia y en ausencia del suero; por ejemplo, si en ausencia de suero el título del virus es  $10^8$  y en presencia del mismo el título es  $10^4$ , esto quiere decir que ese suero tiene anticuerpos específicos contra el virus.

También podemos hacer una especie de neutralización con aquellos virus que tienen capacidad hemaglutinante. La técnica se llama inhibición de la hemaglutinación (IHA) y consiste en mezclar virus más suero para luego agregar glóbulos rojos: se verá entonces que si la muestra de suero tiene anticuerpos contra el virus, no se presentará la aglutinación como sí ocurre cuando el suero está ausente.

La prueba de fijación de complemento es todavía de utilidad en algunos casos: aquí se trata de saber, por ejemplo, si una muestra contiene o no un virus determinado. Tomamos la muestra sospechosa, le agregamos anticuerpos específicos contra el virus y luego agregamos complemento. Si el virus está presente, los anticuerpos se le unen y el complemento se consume; esto último puede ser evidenciado agregando glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos específicos contra glóbulos rojos (hemolisina). Si se consumió el complemento en la primera reacción, no habrá complemento disponible para lisar los glóbulos rojos y viceversa. Esta prueba se puede utilizar igualmente para determinar si una muestra de suero tiene anticuerpos contra

un virus determinado. La fijación de complemento es relativamente barata, muy específica y rápida, pero la sensibilidad no es mucha, principalmente por el hecho de que no todas las clases de anticuerpos tienen la capacidad de fijar el complemento.

La inmunofluorescencia es una prueba rápida y sensible, pero costosa por el equipo que requiere. Se trata de conjugar anticuerpos con un fluorocromo y luego utilizar este reactivo para determinar la presencia de antígenos virales. El fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína o la rodamina, los más utilizados) tiene la propiedad de fluorescer, es decir, emitir luz de una longitud de onda mayor que la luz incidente (luz ultravioleta). La sensibilidad de la prueba puede aumentarse considerablemente cuando se utiliza el método indirecto que consiste en tratar la muestra con anticuerpos contra el antígeno buscado y luego utilizar anti-anticuerpos marcados con el fluorocromo para hacer la lectura al microscopio; si se detecta el fluorocromo significa que los anticuerpos marcados se han unido a los anticuerpos no marcados, y si éstos están presentes es porque el antígeno se encontraba presente en la muestra. La inmunofluorescencia es un método de diagnóstico importante en la rabia.

Las pruebas inmunoenzimáticas no son tan baratas, pero son rápidas y sensibles. La presencia de un virus se puede evidenciar mediante pruebas de inmunocaptura, que consiste en la utilización de platos plásticos (fase sólida) sensibilizados con anticuerpos específicos para el virus; sobre estos platos se coloca la muestra sospechosa y posteriormente la prueba se revela mediante el uso de anticuerpos contra el virus. Estos últimos anticuerpos se han marcado con una enzima y al agregar el respectivo sustrato ocurrirá un cambio de coloración, cuando el resultado es positivo.

Las pruebas inmunoenzimáticas sirven igualmente para detectar la presencia de anticuerpos contra un agente específico. En este caso el plato estará sensibilizado con antígenos virales (no con anticuerpos). Sobre estos antígenos se coloca la muestra de suero y finalmente la prueba se revela con anticuerpos marcados con la enzima y con el respectivo sustrato. Esta técnica llamada de ELISA, tiene la ventaja de que nos puede determinar separadamente las diferentes clases de anticuerpos, lo cual puede tener importancia en un momento dado para determinar si la infección es reciente o antigua (si todavía existen anticuerpos del tipo de la IgM podemos decir que se trata de una infección reciente).

La inmunodifusión es otra técnica de utilidad para el diagnóstico de algunas infecciones virales. Para que esta prueba funcione es necesario que existan antígenos solubles que puedan difundir a través de agar; así, al colo-

car un antígeno viral en un pozo abierto sobre agar y anticuerpos en un pozo vecino, encontraremos que ambos reactivos difunden hasta encontrarse en cantidades óptimas y allí donde esto ocurre se produce una banda de precipitación que es la indicación de un resultado positivo. Esta técnica es barata, de fácil ejecución y muy específica, pero tiene la desventaja de ser poco sensible y de no dar un resultado cuantitativo.

Existen algunas variaciones de la inmunodifusión como la inmunodifusión radial y la inmunoelectroforesis en cohetes, las cuales tienen la ventaja de ser un poco más sensibles y dar un resultado cuantitativo. La inmunoelectroforesis y la contrainmunoelectroforesis son otras variaciones que aumentan la sensibilidad de la técnica.

Otra técnica de uso en diagnóstico de la infección viral es la inmunofluorescencia anticplemento, la cual utiliza una combinación de los principios de la inmunofluorescencia y de la fijación de complemento; la diferencia consiste en que, en este caso, los anticuerpos marcados con el fluorocromo están dirigidos contra el fragmento C3 que supuestamente se ha fijado al sitio donde ha reaccionado el antígeno con el anticuerpo.

El radioinmunoensayo, que si bien es costoso y muy engorroso por tratarse de la manipulación de materiales radioactivos, es una técnica muy sensible, muy específica y tiene la ventaja adicional de ser una prueba cuantitativa. Mediante el radioinmunoensayo podemos detectar antígenos o anticuerpos. Si se trata de detectar antígenos en una muestra dada, mezclamos la muestra con una cantidad estándar de antígeno previamente marcado con un radioisótopo ( $^{51}\text{Cr}$ , el más utilizado) y luego agregamos una cantidad previamente estandarizada de anticuerpo. Así, lo que logramos es que el antígeno presente en la muestra compita con el antígeno marcado por los anticuerpos disponibles. El resultado lo vamos a obtener en un contador de actividad radioactiva (un contador gamma, para el caso del Cr). Si recuperamos el 100% de la radioactividad, quiere decir que la muestra no tenía el antígeno buscado; mientras que si el antígeno está presente, el porcentaje de radioactividad recuperado será proporcionalmente menor a la cantidad de antígeno presente en la muestra problema.

Una de las pruebas más recientemente desarrolladas y que ha adquirido gran popularidad en los países más adelantados tecnológicamente, es la hibridación molecular. Esta prueba se basa en la propiedad que tiene una cadena de ácido nucleico de unirse (hibridarse) con su cadena complementaria. La presencia de ácido nucleico viral en una muestra puede entonces determinarse mezclando ácidos nucleicos de la muestra con una sonda ra-

radioactiva (la cadena complementaria marcada con un radioisótopo); si el radioisótopo permanece en la muestra es porque esta cadena de ácido nucleico ha encontrado su complemento y por lo tanto es una indicación de que el virus problema se encuentra presente. Esta prueba tiene la ventaja de determinar la presencia del virus, no por sus cualidades fenotípicas (externas) sino por su genotipo; lo cual nos acerca mucho más a un diagnóstico certero.

Finalmente, mencionemos la técnica más moderna disponible en la actualidad para el diagnóstico de algunas infecciones virales, entre otros posibles usos; se trata de la Polimerasa de Reacción en Cadena (PRC). Esta prueba basada, como la anterior, en principios de la biología molecular, sería la más sensible y específica, además de rápida, que se haya concebido. Se trata en breve, de, a partir de una pequeñísima cantidad de un virus determinado (teóricamente entre 1-10 partículas virales, por decir algo) lograr el aumento (amplificación) del ácido nucleico viral hasta hacerlo visible en un gel de agarosa. El método funciona directamente con virus DNA, pero también es posible con virus RNA transcritos previamente a DNA con la ayuda de la transcriptasa reversa. La PRC utiliza un iniciador de DNA conocido y específico para el virus que se quiere determinar, una mezcla de nucleótidos y la enzima Taq DNA polimerasa; la mezcla se somete a ciclos de amplificación a 90°C y a 37°C, repetidamente y finalmente se revela el producto mediante electroforesis en agarosa y con la ayuda de bromuro de etidio. El tiempo necesario para llegar a un diagnóstico puede ser de 5-7 horas.

Nos falta mencionar, así sea solamente por cultura general, el microscopio electrónico. Este aparato tiene su importancia para el diagnóstico de virus que carecen todavía de un método apropiado para su cultivo *in vitro*, como es el caso de algunos agentes causantes de diarreas. El problema mayor, en este caso es el costo del equipo y su mantenimiento. Para detectar los virus al microscopio electrónico se necesita una alta concentración de partículas virales en la muestra; las posibilidades de observar estas partículas se aumentan mediante ultracentrifugación de la muestra o mediante el uso de anticuerpos para aglutinar las pocas partículas presentes.

Como podemos ver, existe todo un arsenal tecnológico para hacer el estudio y el diagnóstico de las infecciones virales; en todos los casos se trata simplemente de mezclar reactivos en forma ordenada y de conocer el principio de las técnicas para poder hacer la interpretación adecuada de los resultados. En esta oportunidad tratamos, solamente, de presentar un panorama del problema; un tratamiento a fondo de cada una de las técnicas podría ser por sí mismo un tratado de muchas páginas.



