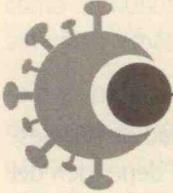


Fundamentos de las técnicas diagnósticas para las infecciones virales



Marta Cecilia Ospina O. *Bact, Esp. Vir. Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Laboratorio Departamental de Salud Pública.*

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones virales presenta ciertas dificultades derivadas de las características intrínsecas de los virus. La dificultad más obvia estriba en el pequeño tamaño de estos microorganismos que los coloca fuera del alcance del microscopio óptico convencional. El microscopio electrónico permite visualizar los virus, pero su uso está limitado por razones prácticas y económicas; adicionalmente este instrumento, en principio, no permite diferenciar los agentes con características morfológicas similares. La imposibilidad de crecer en medios libres de células, como caldos y agaros nutritivos, obliga a utilizar sistemas vivos para su aislamiento, lo cual aumenta la dificultad y el costo de estos procedimientos. Debido a éstas, y otras limitaciones, el diagnóstico rutinario de muchas enfermedades virales se realiza por procedimientos de detección de antígenos, anticuerpos o segmentos genómicos y no por medio de métodos convencionales tales como aislamiento y visualización microscópica, utilizados para otros microorganismos.

Los métodos de diagnóstico virológico pueden clasificarse así:

1. Métodos de detección directa: son aquellos que permiten demostrar la presencia de un virus o de alguno de sus componentes. Los más utilizados son la detección de antígenos específicos y la detección de ácidos nucleicos. También es posible, en algunos casos, demostrar la presencia del virus utilizando el microscopio electrónico, o aislarlo en un sistema apropiado.



2. Métodos indirectos: permiten detectar la presencia del virus a través de métodos serológicos; es decir, se basan en la determinación de la respuesta humoral del paciente contra el agente. Estos métodos no solo se utilizan para diagnosticar la infección, sino también para estimar la inmunidad de un individuo hacia un virus, obtenida por vacunación o por infección previa.

Selección, recolección y transporte de muestras

El éxito del diagnóstico virológico depende en gran medida de la calidad de la muestra. El tipo de muestra ideal y las técnicas de recolección y transporte dependen del virus sospechado, fecha de inicio de síntomas y pruebas de laboratorio disponibles. Las muestras para diagnóstico virológico pueden ser fluidos estériles como sangre total, suero, plasma, líquido de vesículas o líquido cefalorraquídeo (LCR) o muestras usualmente contaminadas como hisopados o aspirados nasofaríngeos, materia fecal, orina o material de autopsia. En general, durante las fases tempranas de la infección, cuando existe mayor excreción viral, las pruebas ideales son el aislamiento viral y las pruebas de detección directa, mientras que en las etapas más tardías es más práctico tomar muestra de suero para detectar la presencia de anticuerpos.

Las muestras para aislamiento viral deben recolectarse en los primeros días de inicio de síntomas y requieren una temperatura de conservación que permita mantener el virus viable. Si se pueden enviar rápidamente (antes de 72 horas) deben mantenerse a la temperatura de refrigeración (2-8° C). De lo contrario deben congelarse a -70° C y enviarse en hielo seco. Algunas muestras para cultivo, como hisopados o aspirados nasofaríngeos, líquido de vesículas, muestras de tejido etc., requieren un medio de transporte virológico para preservar la viabilidad del virus, puesto que la mayoría de ellos son muy susceptibles a la desecación. El uso de congeladores corrientes (-10 a -20° C) y los ciclos de congelación y descongelación deben evitarse, pues aceleran la inactivación de los virus en la muestra.

Los métodos de detección de antígenos y genomas virales también requieren una muestra tomada tempranamente en el curso de la infección, excepto en las infecciones crónicas en las que el agente persiste durante largos periodos. A diferencia de las muestras para aislamiento viral, éstas sí pueden congelarse a temperaturas entre -10 a -20° C.

Las muestras para detección de anticuerpos generalmente son suero, plasma o LCR y pueden enviarse a 4° C si fuera posible el análisis antes de una semana, o entre -10 y -20° C para periodos más prolongados.

1. Métodos de detección directa

Detección de antígenos

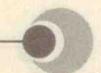
La detección de antígenos virales en tejidos o en fluidos corporales es de mucha utilidad para el diagnóstico virológico. Estos antígenos pueden detectarse por técnicas como inmunofluorescencia, la cual se describe a continuación; o pruebas de ensayo inmunoenzimático, que se describirán más adelante.

La Inmunofluorescencia se basa en la detección de antígenos o anticuerpos, adhiriendo fluorocromos a las moléculas de anticuerpos. El fluorocromo más utilizado es el isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual al ser excitado por luz de longitud de onda corta (luz ultravioleta), emite luz de longitud de onda más larga (verde manzana) que se puede observar bajo un microscopio de fluorescencia cuando se da la reacción antígeno-anticuerpo. Esta prueba es muy utilizada en los laboratorios de virología ya que permite la detección rápida y directa de antígenos virales en muchas infecciones; también se utiliza para identificar virus aislados en cultivo celular o en ratones. Además de la rapidez, ésta técnica ofrece múltiples ventajas como facilidad técnica y buena sensibilidad y especificidad. Las desventajas son el alto costo del microscopio de fluorescencia y la necesidad de personal entrenado.

Existen dos estrategias para el uso de la IF: Inmunofluorescencia directa (IFD) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). En la IFD, los anticuerpos (monoclonales o policlonales) marcados con el fluorocromo, se ponen a reaccionar directamente con los antígenos presentes en la muestra fijada en una lámina portaobjetos, y posteriormente se realiza la lectura en el microscopio de fluorescencia. Este método requiere un solo paso. En la IFI, se coloca a reaccionar la muestra del paciente inicialmente con un anticuerpo específico o primario que no está marcado y la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia mediante la adición de un segundo anticuerpo marcado con el fluorocromo, y dirigido contra el anti-anticuerpo primario. Aunque ésta metodología requiere dos pasos puede ser más sensible que la IFD.

Detección de Ácidos Nucleicos

Hibridación de ácidos nucleicos. Esta técnica se basa en la capacidad de una cadena de ácido nucleico (ADN o ARN), de adherirse a cadenas que poseen secuencias complementarias. La detección del híbrido puede realizarse con sondas marcadas con elementos radiactivos y visualizando la reacción mediante una autoradiografía, o a través de sondas biotiniladas y visualización del híbrido mediante una reacción inmunológica. La hibridación in situ se realiza en un corte de tejido o sobre una monocapa de cultivo celular. Estas técnicas se utilizan poco hoy en día, puesto que son menos sensibles que las técnicas de amplificación que se describen a continuación.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la amplificación, in vitro, de secuencias específicas de ADN existentes en una muestra para producir millones de copias de longitud y secuencia definidas en pocas horas. La primera fase del método consiste en extraer y purificar el ácido nucleico de la muestra. La segunda fase, o PCR propiamente dicha, consta de tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión, en ciclos repetitivos para amplificar el ácido nucleico. El primer paso es la desnaturalización que consiste en la separación de las dos cadenas de ADN por efecto de la alta temperatura (94-96°C); el segundo paso es el alineamiento (annealing) que consiste en la hibridación de cebadores o "primers" con las cadenas en la secuencia blanco a baja temperatura (50-65°C). Los cebadores son oligonucleótidos con secuencias complementarias al ADN del agente que se quiere detectar. El tercer paso es la extensión de la secuencia de nucleótidos de dichos cebadores utilizando la secuencia blanco como molde a 68-72° C, mediante la acción de una polimerasa de ADN termoresistente, usualmente la Taq polimerasa. Estos tres pasos constituyen un ciclo de PCR, en el cual se duplica el número de secuencias blanco. Una región del ADN viral puede ser amplificada millones de veces, dependiendo del número de ciclos utilizado. En la fase final, el fragmento amplificado se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o bien mediante hibridación con una sonda específica para el producto amplificado.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). Se aplica a virus ARN, ya que la PCR como tal solo amplifica ADN. Primero se extrae el ARN viral de la muestra y mediante la enzima transcriptasa reversa (TR) se convierte en ADN copia (cADN) y esta cadena resultante se utiliza como molde para la reacción de PCR. Esta prueba puede realizarse de manera cuantitativa para medir la carga viral en algunas infecciones tales como VIH-1, hepatitis C, citomegalovirus.

PCR en tiempo real: En ésta técnica los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea y la cantidad de ADN sintetizado se puede medir en cualquier momento de la reacción. El sistema más simple consiste en el uso de una sustancia intercalante del ADN como el Sybr Green. Estas sustancias son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena (dcADN); así, la cantidad de ADN formado es proporcional a la emisión de fluorescencia. Los termocicladores utilizados en ésta técnica incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. Debido a la facilidad técnica, rapidez y menor riesgo de contaminación, la PCR en tiempo real se impone cada vez más en los laboratorios de diagnóstico virológico.

1. Microscopia electrónica

El microscopio electrónico permite la visualización rápida y directa de un virus y, en algunos casos, determinar la familia o género al que pertenece. Sin embargo, tiene

una sensibilidad limitada comparada con otros métodos, debido a la necesidad de una alta concentración de partículas virales en la muestra. Su especificidad tampoco es buena puesto que no es posible distinguir morfológicamente entre diferentes virus de la misma familia. Su principal aplicación diagnóstica está en el estudio de muestras de materia fecal provenientes de pacientes con sospecha de gastroenteritis viral. Para ello se utiliza la microscopía con tinción negativa. El alto costo del equipo limita el uso rutinario de este recurso.

2. Aislamiento viral

Los virus son parásitos intracelulares obligados y por lo tanto requieren células vivas para su multiplicación. Hasta mediados del siglo pasado los animales y los huevos embrionados eran los sistemas más comúnmente utilizados para aislarlos. Desde 1950 se empezaron a utilizar cultivos celulares a partir de una variedad de tejidos humanos y de animales y este método ha reemplazado, en gran medida, a los dos anteriores. Aunque el aislamiento viral es el "estándar de oro" para el diagnóstico de la mayoría de las infecciones virales, en la práctica rutinaria solo se utiliza en laboratorios de referencia por razones de costo, tiempo de respuesta, riesgo biológico, y sobre todo, por la necesidad de personal especialmente entrenado en estas técnicas.

Aislamiento en animales de experimentación. Los ratones lactantes fueron muy usados para el aislamiento viral, pero su uso tiende a disminuir ante el desarrollo de los cultivos celulares; sin embargo, se siguen usando para algunos virus como los del grupo Coxsackie A que no crecen en otros medios. Otros virus solo crecen en ciertas especies de animales como simios, o en mosquitos; estos procedimientos se utilizan principalmente con fines investigativos.

Aislamiento en huevos embrionados. Los virus pueden inocularse en las diferentes estructuras de huevo embrionado de pollo o de pato. La replicación viral puede evidenciarse por la muerte del embrión, o mediante la detección. Este sistema tiene la ventaja de ser bacteriológicamente estéril, carecer de respuesta inmune y ser de fácil manipulación. Aunque los laboratorios de diagnóstico emplean con mayor frecuencia los cultivos celulares para el aislamiento viral, algunas veces la inoculación de huevos embrionados presenta mayores ventajas, como en el caso de algunas cepas de influenza A, que pueden aislarse más fácilmente en este sistema que en los cultivos celulares.

Aislamiento viral en cultivo celular: Los cultivos de células provienen de un órgano o un tejido, normal o tumoral, y se mantienen en medios de cultivo especiales, en condiciones de temperatura, pH y humedad controladas. En general, los cultivos primarios soportan



una variedad más amplia de virus, seguidos por las líneas de células diploides y por último, las líneas celulares continuas, las cuales son más específicas para ciertos agentes. La definición de estos tipos de células, sus características y los métodos empleados para su manejo se encuentran en el capítulo sobre cultivos celulares.

Debido a que no todos los virus crecen en la misma línea celular, los laboratorios deben disponer de líneas celulares susceptibles, de acuerdo a las infecciones virales más frecuentes en la región. Por ejemplo, las células HEp-2 pueden ser bastante sensibles a poliovirus y virus coxackie B, pero no permiten el crecimiento de virus coxackie A y echovirus, a pesar de que todos pertenecen al mismo grupo taxonómico. Existen otros virus para los cuales aún no se dispone de un tipo de cultivo celular susceptible (papiomavirus, hepatitis B y C, etc.); en éstos casos la detección debe realizarse mediante otra prueba diagnóstica.

El cambio en la morfología celular, inducido por el crecimiento viral se denomina efecto citopático o (ECP). Muchos virus inducen un ECP muy característico en ciertos cultivos celulares, y algunos lo hacen más rápidamente que otros; por ejemplo, el virus Herpes simplex (VHS) induce un efecto consistente en células refringentes, redondeadas y grandes que se disemina hacia toda la monocapa, usualmente a las 48 horas; mientras que otros de la misma familia, tales como citomegalovirus (CMV) y varicela-zoster (VZV), producen un ECP similar pero progresan lentamente; el tiempo de crecimiento podría entonces ayudar a diferenciar a estos virus de la misma familia. Cuando se tiene experiencia en la visualización del ECP se puede presumir la identidad del agente infeccioso; sin embargo, en la mayoría de los casos, es necesario recurrir a métodos de detección directa o a pruebas serológicas para la identificación definitiva.

3. Métodos indirectos

La detección de anticuerpos es muy empleada en el diagnóstico virológico debido a su facilidad técnica, a la disponibilidad de reactivos comerciales y al corto tiempo entre la toma de la muestra y la entrega del resultado. Las infecciones virales agudas se pueden detectar mediante la determinación de anticuerpos IgM específicos en una muestra única, o mediante la seroconversión que se define como el aumento de 4 o más veces en el título de anticuerpos entre dos muestras de suero pareadas: La primera (muestra aguda) tomada en la etapa inicial de la enfermedad y la segunda (muestra convaleciente), por lo menos 15 días después de la primera. Es importante tener presente que la detección de anticuerpos tipo IgG o anticuerpos totales, en una muestra única, no son evidencia de infección actual, pues ellos pueden haber quedado como cicatriz serológica de una infección antigua o de una vacunación. Sin embargo, en infecciones persistentes como la producida por el VIH-1, estas pruebas si son diagnósticas de infección actual.

Neutralización (Nt). La prueba de neutralización se basa en la inhibición del ECP del virus sobre un cultivo, mediante la utilización de un antisuero específico que impide la unión del virus a su receptor celular. Para realizar la prueba se mezcla una cantidad determinada de virus con diferentes diluciones del suero del paciente y luego de una hora de incubación a 37° C (para facilitar la unión de los anticuerpos) se inocula la mezcla en cultivos celulares. Los cultivos se observan varios días para detectar la aparición del ECP. En caso de que el suero del paciente contenga anticuerpos neutralizantes, éstos se unen al virus y la monocapa de células permanecerá intacta; por el contrario, si el suero no contiene anticuerpos neutralizantes, la monocapa de células se destruirá por el efecto del virus. La comparación de los títulos observados en los sueros agudo y convaleciente permite determinar la presencia o ausencia de infección reciente. La neutralización es uno de los métodos serológicos más específicos y es idea para determinar inmunidad a un virus particular, en cuyo caso la prueba se puede realizar en una muestra única. También puede utilizarse para la identificación de un virus desconocido mediante el uso de antisueros de referencia específicos.

Inhibición de la hemaglutinación (IH). Muchos virus presentan hemaglutininas en su superficie y por lo tanto tienen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de alguna especie particular. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación; se producen como respuesta a la infección por dichos virus. Para detectarlos se mezclan diluciones seriadas de los sueros agudo y convaleciente del paciente con una cantidad conocida de virus; luego de la incubación se añaden glóbulos rojos de la especie apropiada y se observa si se inhibe la hemaglutinación, lo cual solo sucederá si en el suero del paciente hay anticuerpos contra el virus en estudio. El título de anticuerpos corresponde a la última dilución del suero que es capaz de inhibir totalmente, la aglutinación de los glóbulos rojos. Esta prueba puede dar resultados falsos positivos por reacción cruzada de los anticuerpos con virus antigénicamente relacionados con el agente de interés, pero se sigue usando por ser técnicamente más sencilla.

Ensayo inmunoenzimático (EIA o ELISA). Esta prueba se basa en la detección de antígenos o anticuerpos mediante la utilización de otros anticuerpos u otros antígenos marcados (conjugados) con enzimas. En esta prueba se utilizan soportes sólidos recubiertos con antígenos (cuando queremos buscar anticuerpos) o con anticuerpos (cuando queremos buscar antígenos) y se ponen en contacto con la muestra del paciente. Posteriormente se agrega un anticuerpo o anti-inmunoglobulina marcado con una enzima, la cual finalmente actúa sobre un sustrato específico que se adiciona en el momento apropiado. La reacción enzima-sustrato puede evidenciarse por la aparición de un producto que se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda determinada. El nivel de reactividad de la prueba es comparado con un punto de corte previamente estandarizado en el protocolo de la misma; éste se establece con base en la

lectura de los controles o calibradores. Si la lectura excede el punto de corte, el resultado se informa como positivo y si está por debajo, se informa como negativo.

Los EIA utilizan como antígeno lisados crudos o semipurificados de cultivo infectado, antígenos recombinantes, o péptidos sintéticos. Como conjugados se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales, unidos químicamente a una enzima. La peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina son las enzimas más utilizadas. Los sustratos pueden generar color (cromógenos), fluorescencia (fluorógenos) o quimioluminiscencia, efectos que se miden con fotocolorímetro, fluorómetro o luminómetro, respectivamente.

Dos grandes ventajas de las pruebas tipo ELISA sobre las pruebas tradicionales (IH, Nt) son la posibilidad de distinguir la clase de inmunoglobulina (IgM, IgG, IgA) presente en la muestra del paciente y la posibilidad de cuantificar el resultado sin necesidad de procesar múltiples diluciones de la muestra. Para lo primero se utilizan anticuerpos específicos contra la clase de inmunoglobulina de interés; esta anti-inmunoglobulina puede ir conjugada a la enzima (método indirecto) o fijada en la fase sólida (método de inmunocaptura). Para la cuantificación del resultado se deben incluir sueros de título conocido para establecer una curva de calibración.

Los ensayos inmunoenzimáticos son ampliamente utilizados en los laboratorios de diagnóstico por su facilidad técnica, sensibilidad, especificidad y porque la mayoría están disponibles comercialmente. También permiten detectar antígenos virales en diferentes muestras (suero, materia fecal, secreciones nasofaríngeas, etc.) de acuerdo a las necesidades diagnósticas. Algunas variantes han sido adaptadas a formatos simplificados como tirillas o "cassettes", que permiten una ejecución rápida con lectura visual sin necesidad de utilizar instrumentos. Estas pruebas rápidas se utilizan cada vez más a menudo, en laboratorios de baja complejidad, para tamizaje de algunas infecciones virales como por ejemplo VIH, hepatitis B, dengue etc.

Electroinmunotransferencia o "Western blot" Este método permite determinar la presencia de anticuerpos frente a determinadas proteínas o antígenos virales y sigue el principio de los ensayos inmunoenzimáticos. Inicialmente los viriones purificados son solubilizados mediante el tratamiento con detergente iónico para liberar las proteínas virales. Estas proteínas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a su peso molecular y luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa que sirve como soporte de la reacción. Las tirillas de nitrocelulosa se incuban con los sueros a probar, y de ésta forma, si el paciente tiene anticuerpos específicos contra el virus que estamos buscando, éstos formarán un complejo antígeno-anticuerpo con los antígenos unidos a la tirilla. Posteriormente se agrega una anti-inmunoglobulina conjugada con

una enzima y luego un sustrato cromógeno que reacciona con la enzima. La aparición de bandas coloreadas en la membrana, indican la presencia de anticuerpos unidos a proteínas virales específicas. De este modo es posible discriminar contra cuáles componentes virales existe respuesta inmune. Estos componentes se designan por una p (proteína) seguida por un número que significa el peso molecular en kilodaltons (kD). Por ejemplo, p24 es la proteína de cápside del VIH-1 y pesa 24 kD.

Bibliografía

- Specter S, Hodinka R, Young S editors. Clinical Virology Manual. 3 ed. 2000.
- Carballal G, Oubiña J.. Diagnóstico virológico. Virología Médica. Cap. 6. 73-98. 1991.
- Storch G. Diagnostic Virology en: Knipe D.M, Howley PM, editors in chief. Fields Virology. 4 ed. Lippincott-Williams & Wilkins. 2001. Cap. 18. 493-531.