

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

8a.

Diagnóstico microbiológico
de las infecciones por
herpesvirus

2 0 0 5

EDITORES: EMILIA CERCENADO Y RAFAEL CANTÓN

Coordinador: José L. Pérez Sáenz
Autores: Concepción Gimeno Cardona
David Navarro Ortega
María de Oña Navarro
José L. Pérez Sáenz



ISBN: 84-609-7031-0

ÍNDICE:

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTIFICO

1. INTRODUCCIÓN

2. VIRUS DEL HERPES SIMPLE

2.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

2.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

2.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

2.2.2. Aspectos analíticos: métodos diagnósticos

2.2.3. Diagnóstico serológico

2.2.4. Detección de antígeno vírico

2.2.5. Detección de genoma vírico

2.2.6. Cultivos celulares

2.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

2.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIVIRICOS

3. VIRUS VARICELA-ZÓSTER

3.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

3.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

3.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

3.2.2. Respuesta inmune y diagnóstico serológico

3.2.3. Detección de antígeno vírico en muestras clínicas

3.2.4. Detección del genoma vírico

3.2.5. Cultivo celular

3.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS

3.4. RESISTENCIA A LOS ANTIVIRICOS

4. CITOMEGALOVIRUS HUMANO

4.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

4.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

4.2.1. Conceptos y definiciones

4.2.2. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

4.2.3. Respuesta inmune y diagnóstico serológico

4.2.4. Métodos basados en el cultivo

4.2.5. Diagnóstico histológico y detección de antígenos en tejidos

4.2.6. Prueba de antigenemia de CMV

4.2.7. Métodos moleculares cualitativos

4.2.8. Métodos moleculares cuantitativos: carga vírica

4.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

4.3.1. Utilidad real de las técnicas serológicas

4.3.2. Indicaciones de los métodos basados en el cultivo

4.3.3. Utilidad de las técnicas histológicas y de detección de antígenos en tejidos

4.3.4. Aplicación práctica de la prueba de antigenemia

4.3.5. Utilidad de las técnicas moleculares cualitativas

4.3.6. Pruebas moleculares cuantitativas

4.4. DIAGNÓSTICO DEL CMV EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS

4.4.1. Problemas diagnósticos y pronósticos en la gestación

4.4.2. Diagnóstico de la infección congénita en el recién nacido

4.4.3. Diagnóstico y pronóstico en el inmunodeprimido: trasplante de órganos

4.5. RESISTENCIA A LOS ANTIVIRICOS Y PRUEBAS *IN VITRO*

4.5.1. Métodos fenotípicos de sensibilidad a los antiviricos

4.5.2. Métodos genotípicos de detección de la resistencia

4.5.3. Cuándo, cómo y qué métodos podemos aplicar en la práctica clínica

5. HERPESVIRUS HUMANO 6

5.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

5.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

5.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

5.2.2. Diagnóstico directo por cultivo

5.2.3. Detección de antígeno en sangre (antigenemia)

5.2.4. Detección de ADN del HVH6 (PCR)

5.2.5. Respuesta inmune frente al HVH6: diagnóstico serológico

- 5.3. DIAGNÓSTICO DEL HVH6 EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE PACIENTES
 - 5.3.1. Infección primaria
 - 5.3.2. Infección en los pacientes transplantados
- 5.4. TRATAMIENTO Y RESISTENCIAS A LOS ANTIVIRICOS
- 6. HERPESVIRUS HUMANO 7**
- 6.1. IMPORTANCIA CLÍNICA
- 6.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
 - 6.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras
 - 6.2.2. Métodos de cultivo
 - 6.2.3. Detección de antígeno en sangre (antigenemia)
 - 6.2.4. Detección de ácidos nucleicos
 - 6.2.5. Diagnóstico indirecto o serológico
- 6.3. TERAPÉUTICA ANTIVIRICA DE LAS INFECCIONES POR EL HVH7
- 7. VIRUS DE EPSTEIN-BARR**
- 7.1. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA
- 7.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: GENERALIDADES
- 7.3. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA NO TUMORAL EN EL PACIENTE INMUNOCOMPETENTE
 - 7.3.1. Diagnóstico de la mononucleosis infecciosa
 - 7.3.2. Diagnóstico de la enfermedad crónica activa
- 7.4. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA NO TUMORAL EN EL PACIENTE INMUNODEPRIMIDO
 - 7.4.1. Diagnóstico de la infección primaria
 - 7.4.2. Diagnóstico de la leucoplasia oral vellosa
- 7.5. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA TUMORAL VINCULADA CON EL VEB
 - 7.5.1. Detección de proteínas del VEB en el tejido tumoral
 - 7.5.2. Detección de ADN y ARNm del VEB en el tejido tumoral
 - 7.5.3. Análisis de la carga vírica del VEB en la sangre periférica
- 8. HERPESVIRUS HUMANO 8**
- 8.1. IMPORTANCIA CLÍNICA
- 8.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
 - 8.2.1. Diagnóstico directo: muestras y métodos
 - 8.2.2. Detección mediante PCR
 - 8.2.3. Otros métodos de diagnóstico directo
 - 8.2.4. Diagnóstico indirecto o serológico: generalidades
 - 8.2.5. Detección de anticuerpos frente a antígenos de fase latente
 - 8.2.6. Detección de anticuerpos frente a antígenos de ciclo lítico
 - 8.2.7. Resumen: selección del antígeno a utilizar en los ensayos serológicos
- 8.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
 - 8.3.1. Condicionantes del diagnóstico directo
 - 8.3.2. Interpretación de los resultados serológicos
 - 8.3.3. Relación entre los cuadros clínicos asociados al HVH8 y la inmunosupresión en los pacientes infectados por el VIH y en los traNsplantados
- 8.4. SENSIBILIDAD Y TRATAMIENTO ANTIVÍRICO
- 9. BIBLIOGRAFÍA**
 - 9.1. Virus del herpes simple
 - 9.2. Virus varicela-zóster
 - 9.3. Citomegalovirus
 - 9.4. Herpesvirus humanos 6 y 7
 - 9.5. Virus de Epstein-Barr
 - 9.6. Herpesvirus humano 8

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. Aislamiento de los virus del herpes simple en cultivo convencional en tubo.
2. Método simplificado para determinar la sensibilidad de los virus del herpes simple a aciclovir.
3. Detección directa del virus varicela-zóster en lesiones cutáneas mediante inmunofluorescencia.
4. Detección de antígenos en cultivo (*shell vial*) para el citomegalovirus y para otros virus.
5. Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus.
6. Prueba de la avidéz IgG anti-VCA del virus de Epstein-Barr.
7. Detección de ADN de Herpesviridae en LCR y otras muestras mediante PCR múltiple.

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

8a. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR HERPESVIRUS. 2005

Coordinador: José L. Pérez Sáenz

Autores: Concepción Gimeno Cardona

David Navarro Ortega

María de Oña Navarro

José L. Pérez Sáenz

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Herpesviridae* comprende una serie de virus con ADN de gran importancia en la clínica (tabla 1), cuya característica biológica más importante es su capacidad de establecer latencia. Tras la infección primaria, sintomática o asintomática, el virus permanece latente, sin multiplicarse, en tipos celulares particulares, a partir de los que se reactiva con la consiguiente replicación vírica. La reactivación obedece a causas muy diversas, según el virus de que se trate y, en general, poco definidas, aunque siempre son el reflejo de la ruptura del equilibrio existente entre el virus y el sistema inmune del hospedador, especialmente la inmunidad celular. Existe también la posibilidad de la reinfección, por la que una cepa de un determinado herpesvirus infecta a un individuo que ya lo estaba por otra cepa de ese mismo virus.

Todos los herpesvirus son muy ubicuos geográficamente y con una gran prevalencia en la población general. Como consecuencia, una proporción sustancial de individuos adultos ha tenido contacto con el virus en etapas previas de su vida, lo que se refleja en la respuesta de anticuerpos específicos y en el mantenimiento del virus latente. Sin embargo, en contraste con la elevada prevalencia, la mayor parte de las infecciones (primarias, reactivaciones o reinfecciones), suelen ser asintomáticas, e incluso el espectro de manifestaciones clínicas varía ampliamente, desde las benignas hasta las que comprometen seriamente al paciente. Mientras que en el paciente con inmunidad normal, lo habitual es lo primero, en el paciente inmunodeprimido las infecciones por herpesvirus pueden presentar una extraordinaria gravedad, lo que engloba a los herpesvirus como patógenos típicamente oportunistas. La situación se complica cuando las manifestaciones clínicas son muy inespecíficas, lo que obliga a un diagnóstico diferencial.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce la importancia que tiene el diagnóstico de laboratorio para el manejo de las infecciones por miembros de la familia *Herpesviridae*. Puesto que existen muchas pruebas diagnósticas, es fundamental que el microbiólogo aplique su buen criterio y conocimientos a la hora de seleccionar la prueba o pruebas que mejor se adapten a la situación clínica de que se trate.

Desde la publicación en 1995 de la primera versión de este procedimiento, son muchos los cambios y avances que se han producido en todas las áreas de investigación sobre herpesvirus, de ahí la conveniencia de revisar críticamente este manuscrito. Entre ellas, cabe citar:

- La descripción de nuevos herpesvirus, alguno, como el herpesvirus humano 8 (HVH8), ni siquiera se consideraba en la anterior versión.
- La consolidación en el conocimiento y significación clínica de otros virus recientemente descritos en esa fecha [herpesvirus humanos 6 (HVH6) y 7 (HVH7)], o de cuadros clínicos con experiencia limitada, como los síndromes linfoproliferativos producidos por el virus de Epstein-Barr (VEB).
- El aumento progresivo de la población de pacientes inmunodeprimidos, susceptibles de sufrir infecciones graves o, en la parte positiva, el control de la infección por el virus del SIDA, lo que modifica sustancialmente la demanda de pruebas diagnósticas.
- La aparición de nuevos fármacos antivíricos y el uso intenso de éstos, con el consiguiente desarrollo de resistencias en la práctica clínica real.
- Por supuesto, los avances en las técnicas diagnósticas, en particular las moleculares, algunas de los cuales ya han quedado como métodos de referencia; en otras ocasiones, se han despejado las dudas acerca de su utilidad real en el laboratorio.

Tabla 1. Virus de la familia *Herpesviridae* que producen infecciones en el hombre.

	Sinónimo	Abreviatura empleada en esta monografía
Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i>		
Virus del herpes simple tipo 1	Herpesvirus humano tipo 1	VHS1
Virus del herpes simple tipo 2	Herpesvirus humano tipo 2	VHS2
Virus varicela-zóster	Herpesvirus humano tipo 3	VVZ
Subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i>		
Citomegalovirus humano	Herpesvirus humano 5	CMV
Herpesvirus humano 6	Herpesvirus humano 6	HVH6
Herpesvirus humano 7	Herpesvirus humano 7	HVH7
Subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i>		
Virus de Epstein-Barr	Herpesvirus humano 4	VEB
Herpesvirus humano 8	Herpesvirus humano 8	HVH8

2. VIRUS DEL HERPES SIMPLE

2.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

Los virus del herpes simple tipos 1 y 2 (VHS1 y VHS2) pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Fueron los primeros virus del grupo en identificarse y han sido ampliamente estudiados. La infección por estos virus esta mundialmente extendida y, así, prácticamente toda la población comprendida entre los 20-40 años ha tenido contacto con el VHS1.

La infección por los VHS es una infección crónica que persiste toda la vida del paciente. La infección primaria puede ser o no sintomática, y las recidivas son de frecuencia e intensidad variables. Se manifiesta generalmente como una infección mucocutánea, menos frecuente como infección del sistema nervioso central (SNC) y, ocasionalmente, como afectación visceral. Las manifestaciones clínicas y la evolución de la enfermedad son variadas y dependen del tipo de VHS, del lugar anatómico afectado, de si se trata del primer episodio o de una reactivación, y de la edad y situación inmunológica del paciente. La infección primaria por los VHS suele acompañarse de síntomas generales y de mayor duración que las recidivas. El VHS1 se implica con mayor frecuencia en la presentación como herpes orolabial y el VHS2 como genital; sin embargo, ambos pueden causar infecciones bucales o genitales. Las reactivaciones por el VHS2 son 8-10 veces más frecuentes que las producidas por el VHS1. El 80% de los pacientes inmunodeprimidos tienen reactivaciones por los VHS, siendo las localizaciones periorales las más frecuentes. Las manifestaciones atípicas, las complicaciones de la enfermedad y las infecciones diseminadas, que pueden ocurrir hasta en un 10-15%, también son más frecuentes en estos pacientes. La infección en el embarazo, la transmisión vertical y la infección neonatal son situaciones de especial dificultad para la prevención y el tratamiento.

Por lo tanto, aunque en un principio estos virus se relacionaron con lesiones en la piel (gingivostomatitis, herpes labial, genital, panadizo, etc.), hoy se conoce su implicación en patologías como la queratoconjuntivitis, infecciones neonatales y en entidades tan importantes como la encefalitis, o aquéllas que pueden implicar cualquier víscera (hepatitis, neumonía, esofagitis, colitis, etc.), sobre todo en los pacientes inmunodeprimidos. Por fortuna, los VHS tienen un tratamiento eficaz y son relativamente fáciles de diagnosticar en el laboratorio.

2.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Aunque las presentaciones clínicas, como las formas mucocutáneas, son muy típicas y su diagnóstico es generalmente clínico, la relativa frecuencia de lesiones atípicas, o el hecho de que puedan presentarse sin lesiones externas (uretritis), o la importancia de genotipar el VHS (herpes genital), hacen recomendable que el diagnóstico se confirme en el laboratorio. Asimismo, es necesario

incluirlo en el diagnóstico etiológico de las infecciones del SNC (encefalitis y meningoencefalitis), infecciones generalizadas en inmunodeprimidos, infecciones oculares (queratitis) y en el diagnóstico diferencial de las infecciones congénitas y neonatales.

2.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

Los VHS se han detectado o aislado en numerosos tipos de muestras: lesiones cutáneas, exudados de muchos tipos, lavados broncoalveolares, aspirados traqueales, saliva, lágrimas, LCR, sangre o biopsias. En la mayoría de los casos, para su recogida y transporte, requieren de un medio específico adecuado para la viabilidad de los virus: solución tamponada con rojo fenol, antibióticos y una fuente proteica, como la albúmina.

Vesículas o lesiones cutáneas. Las muestras de vesículas o lesiones cutáneas, si contienen células, pueden ser muy útiles para un diagnóstico etiológico rápido. Para ello, se debe abrir la vesícula y realizar improntas de la base de la lesión en varios portaobjetos, con el fin de poder llevar a cabo tinciones directas. Además, se debe recoger una muestra en medio de transporte de virus para cultivarla o aplicar otros métodos. Si no se realizaron las improntas, parte de la muestra recogida en el medio de transporte de virus se puede centrifugar a unas 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recupera para el cultivo del virus u otro método diagnóstico, y las células se pueden depositar en un portaobjetos para su posterior tinción con anticuerpos monoclonales. Esta técnica es sencilla y rápida (el diagnóstico puede obtenerse en 30 minutos), y está al alcance de laboratorios sin infraestructura específica para Virología. Su eficacia diagnóstica está en relación con el estadio de la lesión, variando desde el 100% en el caso de vesículas a un 25% cuando las improntas se realizan a partir de las costras. Como en todas las muestras para diagnóstico microbiológico, no debe demorarse el transporte al laboratorio ni su procesamiento.

Exudados: faríngeos, nasales, endocervicales, uretrales y rectales. En todo tipo de exudados es recomendable recoger la mayor cantidad de células posibles, en las que se podría realizar una tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales. En este caso, la técnica no resulta tan sensible y se debe siempre acompañar de otras, como los cultivos celulares.

Lágrimas y exudados conjuntivales. Los exudados conjuntivales se deben de recoger de la base del ojo. La lágrima se puede obtener del conducto lagrimal con la torunda que llevan los medios de transporte de virus. Por el escaso número de células que se recogen se deben aplicar técnicas muy sensibles como la amplificación genómica, que evitarían la recogida de raspados corneales.

Líquido cefalorraquídeo (LCR). Dada la gravedad de las infecciones del SNC producidas por los VHS, conviene ser exigente con todos los procedimientos para obtener un buen rendimiento

diagnóstico. El LCR es la muestra idónea. Se debe recoger por medio de una punción lumbar y enviarlo al laboratorio en un contenedor estéril. Los cultivos del LCR para los VHS tienen un rendimiento de aislamiento muy bajo y, por lo tanto, hay que aplicar técnicas más sensibles, como la PCR. Este procedimiento evitaría tener que obtener muestras más agresivas, como biopsias de cerebro.

Otras muestras. Las biopsias son poco frecuentes en la práctica habitual del diagnóstico de los VHS, aunque pueden ser de elección en patologías digestivas. Estas muestras se deben enviar al laboratorio en un contenedor estéril, preferiblemente con suero fisiológico o medio de transporte de virus. Los VHS no se encuentran generalmente en la sangre periférica, salvo en niños muy pequeños o inmunodeprimidos, ni en la orina, con la excepción de los inmunodeprimidos, por lo que tampoco son muestras habituales. En cualquier caso, y para las situaciones mencionadas, la sangre se debe recoger en un tubo con anticoagulante de la que se separarán los polimorfonucleares para aplicar métodos de detección de antígeno o genoma. La orina se recoge en un tubo estéril para realizar cultivos celulares.

2.2.2. Aspectos analíticos: métodos diagnósticos

Como en todo tipo de infecciones víricas para el diagnóstico de los VHS se pueden utilizar tanto métodos indirectos (detección de anticuerpos – Serología-), o directos, poniendo de manifiesto la presencia del virus o alguno de sus componentes. En el caso de los VHS, los estudios indirectos tienen poca validez, porque sus resultados siguen siendo tardíos y, en ocasiones, confusos, como en el caso de los inmunodeprimidos. Por otra parte, la detección citológica de los cambios celulares de la infección (células gigantes o inclusiones intranucleares) es poco sensible y específica. Por todos estos motivos, son de elección los métodos directos basados en el cultivo o la detección antigénica.

2.2.3. Diagnóstico serológico

Los anticuerpos de la clase IgM se producen tras la primoinfección, seguidos de los anticuerpos IgG. Estos últimos permanecen de por vida mientras que los primeros se pueden detectar hasta cuatro meses después, dependiendo de la técnica que se utilice. Las reactivaciones herpéticas no se acompañan de elevación de anticuerpos IgM, sino de IgG. Por lo tanto, la utilidad de la serología se circunscribe a los estudios epidemiológicos y al diagnóstico de primoinfecciones.

En la actualidad existen numerosas pruebas que identifican anticuerpos de la clase IgG e IgM, tanto por enzoinmunoensayo (EIA) como por inmunofluorescencia (IF). La demostración de la producción intratecal de anticuerpos en las infecciones del SNC, donde se utilizan los índices de anticuerpos IgG totales y específicos LCR/suero, junto con el índice de albúmina, indicador de barrera hematoencefálica intacta o alterada, se han utilizado para diagnosticar estas infecciones. Actualmente

esta estrategia diagnóstica ha quedado desplazada por la detección del genoma del virus en LCR.

Desde hace unos años existen en el mercado ensayos para determinar la inmunidad de tipo para ambos virus del herpes simple. La principal ventaja teórica de estos ensayos sería ayudar en la detección de personas infectadas por el VHS2, con vistas al control del herpes genital y, en último término, a la prevención de la infección neonatal. Sin embargo, como era previsible, los VHS1 y VHS2 muestran muchos determinantes antigénicos comunes, lo que dificulta la detección específica de anticuerpos. Algunos sistemas comerciales utilizan extractos víricos crudos o parcialmente purificados, lo que los inhabilita con el objetivo anterior. Los más modernos están basados en técnicas de EIA con antígenos recombinantes de las glucoproteínas G1 y G2 (gG1 específica del VHS1; gG2, específica del VHS 2), que mejoran la especificidad. Sin embargo, estos ensayos todavía presentan imperfecciones, por lo que los Centers for Disease Control norteamericanos recomiendan que un resultado de anticuerpos positivo para VHS2 se confirme por un segundo ensayo o, mejor, con el aislamiento en cultivo. Por ésta y otras razones, la estrategia de control del herpes genital y de la prevención del herpes neonatal, basada en la serología específica, no es coste-efectiva.

2.2.4. Detección de antígeno vírico

Los antígenos víricos se pueden poner de manifiesto con anticuerpos monoclonales, bien mediante técnicas de EIA o por IF. En el caso de los VHS, con una replicación muy activa, las técnicas de inmunofluorescencia son sencillas y rápidas, ya que sobre cualquier muestra con células se puede obtener un resultado en una hora desde su recepción en el laboratorio. También se han diseñado técnicas de EIA en placa o en soporte sólido, pero con menor sensibilidad.

2.2.5. Detección de genoma vírico

En el caso de los VHS, la amplificación genómica o PCR no ha sido tan relevante como en otros virus, ya que estos virus se multiplican en gran cantidad en el lugar que infectan y por lo tanto, son fácilmente recuperables con técnicas de cultivo o identificables con métodos de detección de antígeno. Sin embargo, son de especial interés en muestras con poca carga vírica y donde el aislamiento del virus es complicado como en muestras de lágrimas o en LCR. Actualmente existen multitud de protocolos de diagnóstico de genoma del VHS. Los más empleados utilizan un fragmento de las glucoproteínas de la envuelta como diana y aplican la variedad de PCR múltiple con el fin de identificar, en la misma reacción, los dos tipos de virus, e incluso otros de la familia de los herpesvirus. En los últimos años han empezado a introducirse procedimientos de PCR *en tiempo real* que simplifican y acortan la emisión de resultados, y permiten cuantificar la cantidad de virus existente en una muestra.

2.2.6. Cultivos celulares

Los VHS se pueden aislar en un número elevado de líneas celulares establecidas, habituales en cualquier laboratorio de virología: fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5), Vero, Hep-2, A549, RD. El efecto citopático de los VHS es muy característico y, en ocasiones, puede aparecer a las 24-48 h desde su inoculación, aunque generalmente se necesitan 5-7 días para su desarrollo. El diagnóstico se puede acelerar si se inocula la muestra (100-200 µl) sobre una monocapa de células susceptibles previamente crecidas sobre un portaobjetos circular (*shell vial*, SV), seguida de una centrifugación y, tras 24-48 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se procede a detectar la presencia del virus mediante una tinción con un anticuerpo monoclonal específico.

La inoculación de los cultivos convencionales se realiza por adsorción de la muestra a la monocapa celular durante 1 h a 37°C (también se puede realizar por centrifugación). Después de retirar la muestra y añadir medio de mantenimiento se incuban los tubos a 37°C y atmósfera del 5% de CO₂ durante 14 días, observándolos periódicamente para visualizar el efecto citopático. En un cultivo celular no se puede distinguir el VHS1 del VSH2, y por lo tanto, se deberá realizar una identificación posterior con anticuerpos monoclonales. Los aislamientos de los VHS son sencillos y fáciles de realizar a partir de muestras con carga vírica elevada, como pueden ser las lesiones cutáneas o los exudados. Sin embargo, están limitados en muestras como LCR o lágrimas, con poca carga vírica, o biopsias, que pueden resultar tóxicas para las células. En cualquier caso, la elección de un método u otro depende de las manifestaciones clínicas del paciente, muestras disponibles y características del laboratorio (tabla 2).

2.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

El diagnóstico virológico de los VHS se puede realizar de varias formas, dependiendo en cada ocasión de que haya o no vesículas, de las características del huésped (edad, inmunosupresión, etc.) y del momento en que se realice la toma de la muestra. Así, podemos distinguir dos situaciones:

a) Casos en los que haya lesión vesiculosa: la técnica de elección sigue siendo el diagnóstico directo, por IF con anticuerpos monoclonales específicos, a partir de improntas tomadas de la lesión. Siempre que se realice una impronta, se debe tomar también una muestra para cultivo, ya

que así se puede obtener la cepa para realizar el estudio de sensibilidad fenotípica.

a) Cuando no existen lesiones vesiculosas, hay que distinguir, a su vez, las siguientes circunstancias clínicas:

- Faringitis, neumonías (inmunodeprimidos), cervicitis, uretritis: la detección del virus se debe realizar por cultivo rápido y convencional. Las muestras de elección son los exudados de la zona afectada (faringe, lavado broncoalveolar, cuello uterino, uretra). Hay que tener en cuenta que hay un 2% de excreción asintomática faríngea de HSV1.
- Queratititis, esofagitis, proctitis: las muestras de elección en estos casos son los raspados corneales y mejor la secreción lagrimal del ojo afectado el caso de la queratititis, y las biopsias en el caso de esofagitis y proctitis. La técnica diagnóstica de elección es la PCR, aunque se debe de realizar también el cultivo. Si se realiza cocultivo se ponen en contacto 15x10⁴ células susceptibles con la biopsia triturada o tripsinada en 1,5 ml de medio de mantenimiento. Después de formada la capa se cambia el medio y se incuba a 37 °C y 5% de CO₂ durante 14 días observándolo periódicamente para detectar la aparición de efecto citopático.
- Encefalitis: la técnica de elección es la PCR anidada o *nested* realizada a partir de LCR. Se puede utilizar la PCR múltiple que incluya, al menos, cebadores específicos de HSV1, HSV 2 y VVZ. Aunque muchos laboratorios utilizan una técnica de desarrollo propio, hay métodos comerciales que incluyen una primera amplificación múltiple y, posteriormente, una hibridación con revelado enzimático para cada agente vírico. Actualmente, otra alternativa a tener muy en cuenta en este diagnóstico es la PCR *en tiempo real*.
- Procesos clínicos con viremia como herpes neonatal, herpes generalizado y visceral en inmunodeprimidos en ausencia de lesiones: en estos casos el diagnóstico se realiza a partir de leucocitos de sangre periférica y se utilizan las técnicas de detección de antígeno por IF directa, detección genómica por PCR y también se puede aislar el virus mediante cultivo celular.

Tabla 2. Sensibilidad de los métodos diagnósticos de VHS según el tipo de muestra.

	Antígeno	PCR	Cultivo
Vesículas o lesiones cutáneas	++	++	++
Exudados faríngeos, endocervicales, uretrales y rectales	+	++	++
Aspirados traqueales y lavados broncoalveolares	++	++	+
Lágrimas y exudados conjuntivales		+++	+
LCR		+++	
Sangre	+	+++	+
Orina		++	++
Biopsias	+	+++	+

2.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIVIRICOS

Se utilizan dos tipos de fármacos antiviricos para el tratamiento de las infecciones producidas por los VHS. La primera clase incluye moléculas que, después de su fosforilación vírica o celular compiten con los desoxinucleósidos trifosfatos naturales para su incorporación en la cadena de ADN. Están representados por el aciclovir y el penciclovir con sus respectivos profármacos, el valaciclovir y el famciclovir, y se consideran de elección para el tratamiento de las infecciones por los VHS. También el cidofovir y el adefovir, derivados acíclicos fosforilados de los nucleósidos, una vez activados, son un substrato alternativo para la polimerasa de ADN y, por lo tanto, podrían ser útiles como fármacos anti-VHS. Sin embargo, no se han utilizado para el tratamiento de este tipo de infecciones. El otro tipo de compuestos anti-VHS son los análogos de pirofosfatos, como el foscarnet. Estos agentes son inhibidores directos no competitivos de la polimerasa de ADN vírico. Una simple mutación en la polimerasa del virus podría, por tanto, conferir resistencia a más de un antivirico, dependiendo del lugar específico donde tenga lugar la unión de la enzima al fármaco.

El aciclovir es el fármaco más utilizado para el tratamiento de los VHS1 y VHS2, y las resistencias actualmente siguen siendo escasas. Sin embargo, su uso cada vez más frecuente en ciertos grupos de pacientes (transplantados, SIDA) podría precipitar la aparición de resistencias. Así, en los pacientes inmunodeprimidos, se ha descrito una prevalencia de resistencias entorno al 5%, siendo preferentemente en los transplantados alogénicos de precursores hematopoyéticos (que reciben profilaxis universal con aciclovir) donde la resistencia aumenta hasta cerca del 30%. También se han descrito más resistencias para el VHS2.

Por lo tanto, es conveniente disponer y desarrollar en los laboratorios métodos de evaluación de sensibilidad a los antiviricos. Actualmente, ya se han descrito métodos fenotípicos que pueden proporcionar un resultado en 48-72 h desde el aislamiento del virus. También se pueden emplear métodos genotípicos que detectan mutaciones implicadas en la resistencia. Si se dispone de la cepa, la sensibilidad fenotípica es un método rápido y asequible a los laboratorios de virología con cultivos celulares. Dentro de los métodos fenotípicos, el más rápido es el que consiste en titular la cepa del virus en paralelo, con y sin una concentración de 1 ó 2 $\mu\text{g/ml}$ de aciclovir, según se trate de HSV1 o HSV2, respectivamente, en una microplaca de fondo plano, en la que previamente se ha hecho crecer una monocapa de células Vero. Una disminución del título de al menos dos diluciones de la cepa del virus (en base logarítmica 10) en la titulación con el antivirico, indica que ese virus tiene una ID_{50} para el aciclovir menor de 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$, y es por lo tanto sensible. Si no fuera así, habría que cuantificar el efecto citopático con un colorante vital y calcular el

porcentaje de inhibición, pero en el 95% de los casos las cepas son sensibles.

La resistencia al aciclovir se debe a mutaciones en el gen de la timidín-kinasa, enzima que inicia la fosforilación del compuesto. Estas mutaciones asociadas a resistencia son la inserción o supresión de los codones 92 y 146, o la sustitución de los codones 176-177 y 336. La resistencia a este fármaco lleva consigo resistencia cruzada con otros fármacos dependientes de la timidín-kinasa, como el penciclovir y el famciclovir. Las infecciones por virus resistentes pueden tratarse con foscarnet o cidofovir, ya que estos dos antiviricos no necesitan ser fosforilados por el enzima para poder inhibir la polimerasa vírica.

Aunque menos frecuentes, se han descrito cepas clínicas resistentes al aciclovir y al foscarnet conteniendo mutaciones en el gen de la polimerasa tras una terapia prolongada con estos agentes. La polimerasa de ADN del VHS es una proteína codificada por un gen de 3705 pb (UL 30) que contiene ocho regiones conservadas, llamadas I-VII de acuerdo a su grado de conservación (la región I es la más conservada). Las mutaciones en la polimerasa están mayoritariamente localizadas en lugares conservados del gen de este enzima. También se han descrito, en cepas de laboratorio, mutaciones en la polimerasa del VHS que dan lugar a resistencias al cidofovir, aunque aun no se han identificado en cepas procedentes de pacientes con fracaso terapéutico. Además, también se han descrito la aparición de mutaciones en el gen de la polimerasa asociadas con la reducción de la susceptibilidad al foscarnet y al adefovir en pacientes que recibían el primero de estos fármacos.

Para detectar las mutaciones que confieren resistencia se amplifica y secuencian el producto de PCR directamente de la muestra biológica, obteniendo un resultado en 24-48 h. Actualmente, los resultados obtenidos por caracterización genética de las cepas clínicas resistentes al aciclovir indican que la secuenciación de fragmentos limitados de los genes de la timidín-kinasa y de la polimerasa es suficiente para detectar la mayoría de las mutaciones asociadas con la resistencia.

3. VIRUS VARICELA-ZÓSTER

3.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

Como su nombre indica, el virus varicela-zóster (VVZ) es el responsable de una infección primaria, la varicela que, tras un periodo de latencia, se reactiva produciendo la infección secundaria o herpes zóster. La varicela es una infección exantemática infantil muy frecuente y contagiosa, pero una proporción variable de personas (entre el 4 y el 20%) alcanza la edad adulta sin padecer la infección y es, por lo tanto, susceptible a ella.

La transmisión del VVZ se produce por contacto directo y por gotitas de aerosol, y puede ser de transmisión aérea en comunidades. El paciente con varicela es infeccioso desde 1-2 días antes de la aparición de la erupción hasta 3-4 días después. En

el niño normal cursa como una dolencia benigna, generalmente sin complicaciones y de fácil diagnóstico clínico. Por el contrario, cuando la contrae un adolescente o un adulto, la enfermedad es más larga y grave, y las complicaciones más frecuentes y graves, en particular la neumonía. Así, los adultos son 10 veces más propensos a necesitar hospitalización y la mortalidad asociada es 20 veces mayor que en los menores de 14 años. La vacuna actualmente esta recomendada en los niños con edades entre los 12 y los 18 meses de edad que no hayan padecido la enfermedad, y se administra junto con la triple vírica. Los niños sanos y mayores de 13 años que no hayan padecido la enfermedad deberán recibir dos dosis separadas de vacuna, con un intervalo de 4-8 semanas entre ambas.

El zóster consiste en una erupción vesicular precedida de parestesias y dolor en la zona cutánea afectada, relacionada con la reactivación en células nerviosas de las raíces dorsales de los ganglios cervicales inferiores, torácicos y lumbares. Sin embargo, en el paciente inmunodeprimido la reactivación del VVZ puede ser más complicada y grave, como la neumonitis o encefalitis, y puede ser atípica la presentación cutánea. La retinitis progresiva por VVZ es una entidad que se ha descrito en pacientes inmunodeprimidos que obliga a realizar un tratamiento de inducción y posterior mantenimiento para evitar una extensión de las lesiones o un desprendimiento de retina que son las mayores complicaciones de esta afección.

La varicela congénita por el VVZ es una enfermedad muy rara asociada a la primoinfección de la gestante durante el primer trimestre de embarazo. Gracias a la vacunación, se ha logrado rebajar de forma muy importante la frecuencia de esta enfermedad, ya que el feto tiene un riesgo de infectarse de sólo el 1-7%, aunque no todos los fetos infectados desarrollarán un síndrome de varicela congénita. El periodo susceptible para que el feto se infecte es por lo general entre las semanas 7 y 20 de la gestación. Caso de existir, la varicela congénita producida por reactivación (zóster) en la madre es una entidad extremadamente rara. Existe otra forma de infección neonatal por este virus: cuando la infección primaria materna se produce en los cinco

días anteriores al nacimiento, el feto tiene un elevado riesgo de sufrir un cuadro grave con alta mortalidad (15-30%), que obliga a la toma de medidas preventivas. Sin que se sepa a qué obedece, este cuadro perinatal es cuatro veces más frecuente en fetos femeninos.

En cuanto a las medidas de prevención en los pacientes hospitalizados, se recomienda que sean aislados estrictamente durante al menos cinco días o mientras dure la erupción vesicular, es decir, hasta cuando las lesiones progresen a costras. Se debe tener especial cuidado con los pacientes inmunocomprometidos (con leucemias o tumores) los cuales pueden requerir mayor tiempo de aislamiento, por tener un tiempo más largo de erupción y, a ser posible, en habitaciones con flujo de aire controlado. En caso de existir enfermos susceptibles expuestos, estos deben permanecer aislados de 10 a 21 días después del comienzo del exantema en el paciente índice. Los pacientes de alto riesgo pueden protegerse con vacunación. Es útil la profilaxis con gammaglobulina específica 3 días después de la exposición. Los pacientes que reciben inmunoglobulina específica, deben mantenerse en aislamiento durante 28 días después de la exposición. Los niños con embriopatía por varicela no requieren aislamiento, pero si los neonatos con el exantema o cuyas madres tienen varicela activa.

3.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

De acuerdo a su importancia clínica se debe realizar un diagnóstico de laboratorio del VZV fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos con lesiones atípicas, para confirmar el diagnóstico, o en pacientes inmunocompetentes con pocas lesiones; también en mujeres embarazadas, así como en aquellas patologías que no se presenten con lesiones vesiculosas como la encefalitis. Una última indicación de las pruebas de laboratorio sería el conocimiento del estado inmune (tabla 3).

3.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

Como en el caso del herpes simple, el VVZ se puede detectar en las vesículas de las lesiones que produce y en otras muestras como exudados y lavados respiratorios, biopsias, LCR, líquidos amnióticos, etc.

Tabla 3. Principales indicaciones de las pruebas diagnósticas para el VVZ.

Con lesiones cutáneas:

- Infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos.
- Lesiones atípicas o escasas.
- Lesiones cutáneas de las embarazadas.

En ausencia de lesiones cutáneas:

- Infecciones del sistema nervioso central.
- Infecciones congénitas.

Estudios epidemiológicos:

- Conocimiento del *status* inmune:
 - Mujeres en edad fértil.
 - Niños inmunodeprimidos.
 - Personal sanitario al cuidado de pacientes susceptibles de riesgo.
- Para determinar la eficacia de la vacuna.

Al igual que en ese virus, las muestras de vesículas o exudados se recogen en medio de transporte de virus. El fluido de vesículas es muy conveniente para el cultivo, mientras que el raspado celular obtenido por frotis enérgico de la base de estas lesiones está particularmente indicado para el diagnóstico directo por IF. Este método es el procedimiento de elección y su sensibilidad es mayor que el cultivo, dada la dificultad que tiene este virus para multiplicarse en los cultivos celulares. Incluso las costras se pueden utilizar si se realiza con ellas una impronta con solución salina en un portaobjetos, con el fin de depositar las células sobre éste.

Cuando el VVZ está implicado en otras patologías que no cursan con lesiones manifiestas, como la afectación del SNC, sospecha de infección congénita, o infecciones respiratorias graves en el transcurso o inmediatamente después de una varicela, es importante establecer el diagnóstico. Las muestras de LCR y líquido amniótico se recogen sin medio de transporte y se envían rápidamente al laboratorio. En el caso de las muestras respiratorias se procesan de la forma protocolizada para virus respiratorios. Es conveniente obtener células por centrifugación para realizar una IF y detección genómica, si procede. A partir del sobrenadante se realizan cultivos rápidos y convencionales.

3.2.2. Respuesta inmune y diagnóstico serológico

Para detectar la respuesta de anticuerpos que se produce tras la infección primaria por el virus, actualmente la técnica más utilizada es el EIA, que detecta anticuerpos de la clase IgM, además de los de tipo IgG. Las reactivaciones (herpes zóster), se acompañan generalmente de un aumento del título de anticuerpos de la clase IgG, que se pueden detectar por técnicas de fijación de complemento, pero que no son útiles como diagnóstico. Los anticuerpos de la clase IgG se detectan sobre todo en estudios seroepidemiológicos y para comprobar el estado inmune de aquellos pacientes que se someten a transplante de órganos (tabla 4)

3.2.3. Detección de antígeno vírico en muestras clínicas

Sigue siendo el método de elección cuando las lesiones son recientes. Es un método sencillo y con una sensibilidad cercana al 100% si se realiza la toma en los tres primeros días. La técnica más utilizada es la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, aunque en la actualidad no son muchas las firmas comerciales que suministran estos anticuerpos específicos.

La detección de antígeno puede ser positiva también cuando las lesiones están más evolucionadas (5-7 días después), aunque el porcentaje de resultados positivos decrece con el tiempo; en estos casos, si la prueba fuese negativa y se requiriese un diagnóstico virológico, habría que recurrir a técnicas más sensibles, como la detección genómica.

3.2.4. Detección del genoma vírico

Cada vez tienen más utilidad las técnicas de detección genómica cualitativa o cuantitativa, indicadas siempre para el diagnóstico de la encefalitis, en los casos de formas anómalas de varicela en inmunodeprimidos o cuando el diagnóstico antigénico o de cultivo falla en este tipo de pacientes o en embarazadas. También se aplican sobre muestras de biopsia y, en general, en todas aquéllas en las que la sensibilidad de las pruebas convencionales sea insatisfactoria. Por último, pueden también emplearse para el diagnóstico prenatal, a partir de líquido amniótico.

3.2.5. Cultivo celular

Se basa en el aislamiento del virus en cultivo celular (fibroblastos de pulmón fetal humano o MRC5) a partir de muestras clínicas, fundamentalmente líquido de vesículas. Además del cultivo convencional en tubos, existe una variante rápida en SV que utiliza los mismos substratos celulares, pero en la que el diagnóstico se completa tras 3-4 días de incubación mediante una tinción fluorescente de las monocapas celulares con anticuerpos monoclonales fluorescentes.

Tabla 4. Principales indicaciones de las técnicas diagnósticas para el VVZ.

Técnica	Utilidad	Inconvenientes
Diagnóstico serológico		
EIA	IgM en primoinfecciones Conocer el estado inmune	Comparación de reactivos
Aglutinación	Cribado de vacunación	Precio
Fluorescencia antimembrana	Encuestas serológicas de referencia	Laboriosidad
Detección de antígeno		
	Sensible Rápida	Correcta toma de muestra Sólo vesículas cutáneas Experiencia del observador
Detección genómica		
PCR anidada	Muy sensible y específica	Precio de comerciales
PCR múltiples	Afectación SNC y formas atípicas	Falta de estandarización
PCR <i>en tiempo real</i>	Permite la cuantificación	
Cultivo		
Convencional	Específico, obtención de la cepa	Insuficiente sensibilidad
Rápido (<i>shell vial</i>)	Específico y rápido	

La sensibilidad del cultivo es menor que la de la detección directa de antígeno y, como era de esperar, mejora en muestras de lesiones recientes. El cultivo convencional es un paso ineludible previo si se pretenden realizar pruebas de sensibilidad a los antiviricos. El crecimiento del primer subcultivo de las cepas suele ser lento pero, a partir de éste, el virus desarrolla un efecto citopático (ECP) que se extiende de forma espectacular, pudiéndose llevar a cabo pruebas fenotípicas de sensibilidad con una metodología similar a la referida anteriormente para los VHS en un plazo tan corto como cuatro días, lo que puede tener utilidad en el manejo de ciertos pacientes inmunodeprimidos con infección por el VVZ.

3.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS

De igual forma que en el caso de los VHS, se pueden diferenciar dos situaciones diagnósticas:

- a) En infecciones con lesiones observables, en cuyo caso la técnica a emplear inicialmente es la detección directa de antígeno sobre las muestras recogidas de la lesión. También se puede realizar el cultivo. En el caso de que la primera de estas técnicas falle por diversas causas, como en las lesiones evolucionadas o cuando la obtención de la muestra ha sido subóptima, convendría realizar una amplificación por PCR, preferiblemente anidada. Si se tiene acceso, también se puede realizar una técnica *en tiempo real*, aunque no presenta un valor añadido respecto a las pruebas de amplificación cualitativas sobre este tipo de muestras. La ventaja de esta técnica de amplificación sería la rapidez y facilidad de estandarización, así como su sensibilidad, pero, en cualquier caso, no son técnicas al alcance de muchos laboratorios, entre otras cosas por su precio.
- b) Si no existen lesiones, como en la afectación del SNC, la muestra recomendable sería el LCR, y la técnica a emplear sería cualquier procedimiento de amplificación genómica que garantice una elevada sensibilidad, como las PCR anidadas o *en tiempo real*. El diagnóstico de las infecciones congénitas y neonatales sobre muestra de líquido amniótico, leucocitos de sangre periférica o muestras respiratorias, puede llevarse a cabo mediante detección de antígeno o por cultivo, si bien el método más sensible es, de nuevo, la PCR. En estas situaciones, la cuantificación genómica por PCR *en tiempo real* podría ser útil, ya que habría una relación proporcional entre la carga vírica y los síntomas clínicos, si bien la experiencia al respecto es limitada por el momento.
- c) Los estudios seroepidemiológicos están indicados en: i) la valoración de la eficacia de la vacuna, ii) la comprobación del estado inmune de los pacientes que reciben un trasplante de órganos, y iii) el conocimiento de la inmunidad en los pacientes de riesgo y expuestos al virus, como en algunos pacientes inmunodeprimidos, o en ciertas situaciones de exposición a lo largo de la gestación.

3.4. RESISTENCIA A LOS ANTIVIRICOS

Para el tratamiento de las infecciones producidas por el VVZ son útiles los mismos fármacos antiviricos que se utilizan para los VHS 1 y 2, es decir el aciclovir y el penciclovir, con sus respectivos profármacos valaciclovir y famciclovir. Estas sustancias son de primera elección, mientras que el foscarnet, cidofovir y adefovir son alternativas. También existen agentes inmunomoduladores que pueden actuar de forma indirecta sobre el virus por inducción en el huésped de citocinas y reducir las recurrencias, pero la experiencia es reducida.

La posibilidad de aparición de mutaciones de resistencia al aciclovir en el VVZ es reducida, pero ésta aumenta en los pacientes inmunodeprimidos o que han recibido tratamiento previo. Al igual que ocurre en los VHS, las cepas resistentes presentan una mutación en el gen de la timidín-kinasa, enzima necesaria para la fosforilación intracelular del aciclovir, paso inicial e ineludible antes de ser convertido en su forma trifosfato, que actúa como sustrato alternativo inhibiendo polimerasa de ADN vírico. El cidofovir y otros fármacos análogos de los nucleótidos dependen de enzimas celulares para su conversión en formas activas, pero no de la actividad timidín-kinasa del virus, por lo que también pueden ser útiles en el tratamiento del VVZ resistente al aciclovir. El foscarnet no requiere ningún metabolismo previo para interactuar con la polimerasa vírica, por lo que es un fármaco alternativo en las cepas deficientes en actividad timidín-kinasa que se seleccionan en el curso del tratamiento prolongado con aciclovir.

Es posible determinar la sensibilidad al aciclovir o al foscarnet, los fármacos más frecuentemente empleados, mediante estudios fenotípicos a partir de la cepa aislada. Mediante los subcultivos, como se comentó anteriormente, el efecto citopático se extiende a toda la monocapa, y en el segundo subcultivo el virus es, prácticamente, extracelular, lo que facilita llevar a cabo un ensayo rápido de sensibilidad. De forma análoga a los VHS, se inoculan diluciones seriadas de la cepa en los pocillos de una microplaca con cultivos de células MRC-5. Tras centrifugación, se añade medio de mantenimiento en la mitad de la placa y, en la otra mitad, medio de mantenimiento con una concentración de aciclovir o foscarnet límite (3 µg/ml para el aciclovir, y 400 mM para el foscarnet). Posteriormente, a los 4-7 días, se calcula el título del virus con y sin antivirico. Si la cepa es sensible, tiene que producirse un descenso del título de al menos dos unidades logarítmicas decimales en los pocillos con antivirico.

En cuanto a la detección de mutaciones que confieren resistencia se realizan a partir de la muestra mediante una secuenciación del producto de amplificación de los genes de la timidín-kinasa o de la polimerasa de ADN vírico. Las mutaciones relacionadas con cepas resistentes se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Mutaciones de resistencia descritas del VVZ a los antivíricos.

Gen afectado	Resistencia a:	Codones asociados con la resistencia
Timidín-kinasa	Aciclovir	glu 303 stop codon
ADN polimerasa	Foscarnet	Arg-665Gly; V666Leu ; Gln692Arg; Arg806S; L809S

4. CITOMEGALOVIRUS HUMANO

4.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El citomegalovirus humano (CMV) está ampliamente distribuido en la población general. Se calcula que, en nuestro país, en torno al 70-80% de los individuos adultos están infectados latentemente por el virus, con una cierta tendencia a la baja según muestran algunas encuestas recientes. La infección requiere el contacto estrecho con el virus, que se excreta en múltiples fluidos biológicos: sangre, saliva, secreciones respiratorias y genitales, orina, etc., y está presente en los órganos que se transplantan. La transmisión del virus se produce a través de las mucosas oral, respiratoria y genital; por la vía parenteral, mediante la sangre, derivados sanguíneos y órganos transplantados y, por último, verticalmente, de la madre al neonato. Todas estas circunstancias nos explican la cinética de adquisición de anticuerpos, con picos en la edad escolar y en la adolescencia o primera juventud. Desde el punto de vista patogénico, existen tres estados: infección primaria, reactivación y, más raramente, reinfección. La inmensa mayoría de estas infecciones cursan de forma asintomática, debiendo considerarse el CMV como un típico oportunista. En la práctica clínica, dado el distinto espectro de manifestaciones y sus consecuencias, suelen clasificarse en infecciones en el paciente normal y en el inmunodeprimido.

La primoinfección en el niño y adulto sanos es mayoritariamente asintomática. En los pocos casos con manifestaciones, estas se circunscriben a un síndrome mononucleósico, sin presencia de anticuerpos heterófilos y, en ocasiones, con ligera alteración de las pruebas funcionales hepáticas. En contraste con esto, el CMV es la causa más importante de infecciones congénitas y neonatales. Se estima que entre el 0,5 y el 2,5% de los recién nacidos contraen la infección *in utero*, dependiendo de la prevalencia de la infección en la población gestante. El neonato también puede infectarse durante el parto, o inmediatamente después de éste, por la lactancia materna (en torno al 25-40% en el primer año de vida). El mayor riesgo de infección clínicamente significativa se asocia con la primoinfección materna contraída durante el primer

trimestre de gestación, lo que puede originar el cuadro grave de enfermedad citomegálica, con ictericia, hepatoesplenomegalia, exantema petequeal y, en ocasiones, manifestaciones oculares y neurológicas. La mortalidad es del 20-30% y las secuelas neurológicas son graves. Por fortuna, la infección congénita en una gestante inmune (por reactivación), o la infección perinatal, que son con mucho las formas más frecuentes de infección en el neonato, no suelen tener traducción clínica.

La situación es muy diferente en el inmunodeprimido. Entre los pacientes de riesgo hay que incluir a los onco-hematológicos, los pacientes con SIDA y, en general, todos aquellos que están sometidos a tratamientos inmunosupresores con corticoides u otros fármacos, muy especialmente los transplantados de órgano sólido y de precursores hematopoyéticos. Es importante señalar que, aún en este tipo de paciente, las infecciones activas por el virus, esto es, las que cursan con multiplicación del virus, no siempre se traducen en manifestaciones clínicas (enfermedad por CMV), lo que complica el diagnóstico y la selección de las pruebas idóneas. Salvo en los transplantados de precursores hematopoyéticos, el mayor riesgo de enfermedad por CMV se produce en la primoinfección por el virus, si bien puede producirse también en las reactivaciones y reinfecciones. Los cuadros clínicos son extremadamente variados y, de nuevo, con manifestaciones muy inespecíficas. El más frecuente es el llamado síndrome vírico, con fiebre, leucopenia o plaquetopenia y, a veces, elevación de las transaminasas. El CMV puede causar infecciones focales o diseminadas: neumonitis, retinitis, afectación del tubo digestivo (esofagitis, colitis), del SNC (mielitis, encefalitis), hepatitis, etc.

Como consecuencia de todo lo anterior, el interés de las pruebas diagnósticas se centra en: a) la determinación del estado inmune frente al virus, b) el diagnóstico de la infección activa, especialmente la investigación de los marcadores pronósticos de enfermedad por CMV, d) el diagnóstico de ésta y e) dado que existen fármacos antivíricos activos frente al virus, la detección de la resistencia (tabla 6).

Tabla 6. Situaciones en las que es necesario el diagnóstico de laboratorio del CMV.

- Encuestas seroepidemiológicas en la población o en grupos poblacionales.
- Conocer la susceptibilidad a la infección en pacientes de alto riesgo (transplantados).
- Determinación del estado inmune frente al virus en donantes de órganos y precursores.
- Diagnóstico diferencial de la infección en el neonato.
- Diagnóstico de las infecciones activas en los pacientes con riesgo de desarrollar infecciones sintomáticas (enfermedad por CMV).
- Guía de inicio del tratamiento anticipado en transplantados (*preemptive therapy*).
- Como ayuda en el diagnóstico diferencial de la enfermedad por CMV.
- Monitorizar la eficacia del tratamiento antivírico específico.
- Detección de la resistencia a los antivíricos.

4.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Son muchas las técnicas que hay disponibles para el diagnóstico del CMV. Sin embargo, como ya se ha mencionado, no todas se adaptan bien a todos los problemas diagnósticos que pueden presentarse. En las tablas 7 y 8 (al final del documento) se resumen las características, ventajas e inconvenientes del amplio abanico de métodos de laboratorio

4.2.1. Conceptos y definiciones

Como introducción al diagnóstico de las infecciones por el CMV conviene aclarar algunos conceptos que se utilizarán en lo sucesivo. Se denomina **infección** la simple presencia del virus en un individuo. Cuando la infección cursa con multiplicación del virus, y por contraste con la situación de latencia, se habla de **infección activa**, que puede ser la consecuencia de una primoinfección, de la reinfección o, mucho más comúnmente, de la reactivación. Por último, cuando la infección activa se acompaña de manifestaciones clínicas atribuibles al virus, se denomina infección sintomática o **enfermedad por CMV**. El paso de infección activa a enfermedad se produce cuando el sistema inmune del huésped no es capaz de controlar la replicación del virus y, en consecuencia, las manifestaciones clínicas se correlacionan estrechamente con la carga vírica.

4.2.2. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

El diagnóstico de laboratorio del CMV no presenta condicionantes particulares respecto al de otros virus. El suero y el plasma deberán separarse de la fracción celular de la sangre lo antes posible y conservarse en nevera a 2-8°C durante un máximo de 7 días, o congelados a temperatura de -20°C o inferior. La sangre para cultivo será anticoagulada (EDTA o heparina), y se recomienda procesarla rápidamente, siempre antes de 18 h. Este mismo tipo de muestra sirve para la detección de antígenos de CMV en leucocitos (antigenemia), con la salvedad de que el rendimiento de la prueba baja considerablemente si el procesamiento se prolonga más allá de las 6 h de la extracción. Para el diagnóstico molecular en sangre, no se debe utilizar heparina como anticoagulante, ya que esta sustancia inhibe algunas enzimas de polimerización (*Taq*), siendo preferible el EDTA. Las muestras de orina para cultivo no requieren conservantes especiales, sino un transporte y procesamiento rápidos, al igual que la saliva o las secreciones respiratorias. Las biopsias y piezas sólidas pueden ser remitidas en suero fisiológico estéril, nunca en formol, si bien es recomendable utilizar medios de transporte para virus [medio mínimo esencial (MEM) con suero bovino fetal o albúmina y una solución de antibióticos] cuando su tamaño lo permita.

4.2.3. Respuesta inmune y diagnóstico serológico

La infección primaria por el CMV se acompaña, como ocurre con otros patógenos, de una respuesta humoral típica. En la infección primaria,

los primeros en producirse son los anticuerpos IgM (7-12 días), seguidos rápidamente (2-3 semanas) de una respuesta IgG frente a diferentes proteínas del virus. Estos últimos anticuerpos permanecen de por vida, mientras que los del tipo IgM persisten durante 3-4 meses. Las reactivaciones en el individuo inmunocompetente rara vez se acompañan de IgM. Los inmunodeprimidos pueden no producir IgM en la infección primaria y, por el contrario, hasta un tercio de ellos pueden presentarlas en las recurrencias. Puesto que éstas son, en términos absolutos, las formas de infección más frecuentes en la práctica clínica, se comprenderán de antemano las limitaciones que presentan las pruebas serológicas.

Existe una notable variedad de técnicas aplicables a la detección de anticuerpos frente al CMV, aunque la utilidad de algunas de ellas está condicionada por razones prácticas. La técnica de fijación del complemento (FC) es un método clásico para la detección de anticuerpos IgG, pero su laboriosidad y falta de sensibilidad analítica son limitaciones graves que han provocado su abandono. La inmunofluorescencia (IF), que utiliza como fuentes de antígeno microcultivos con el virus, permite detectar anticuerpos IgM e IgG, y es claramente más sensible que la FC. Sin embargo, la IF estándar produce falsos positivos (hasta en un 30%), ya que el CMV induce la expresión de receptores Fc en la superficie de las células infectadas que reaccionan de forma inespecífica con inmunoglobulinas de la clase IgG. Para evitar esto, existe la variante denominada de fluorescencia anticomplementaria (ACIF), que es el método de referencia para la detección de anticuerpos IgG. Sin embargo su complejidad técnica y laboriosidad la circunscriben a laboratorios de referencia.

Existen en el mercado reactivos que detectan anticuerpos anti-CMV por aglutinación pasiva con partículas de látex sensibilizadas (CMVscan®, Becton Dickinson). Esta técnica es rápida (5-10 minutos), sencilla de realizar y de fácil lectura. La sensibilidad es elevada, incluso superior a la IF para algunos autores, y su especificidad supera el 95% comparada con la ACIF, lo que la convierte en una técnica de gran utilidad en el cribado serológico pretransplante de donantes y receptores, así como para conocer el estado inmune de los pacientes. La aglutinación con látex presenta el fenómeno de prozona y, para algunos autores, se positiviza algo más lentamente que otras pruebas tras la infección primaria. La variante cualitativa no está suficientemente evaluada. Recientemente, se han producido problemas que afectan a la comercialización de estos reactivos en nuestro país (marca CE), lo que plantea incógnitas sobre su disponibilidad futura.

Tabla 7. Técnicas convencionales aplicables al diagnóstico de la infección y enfermedad por el CMV.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Diagnóstico serológico			
Fijación de complemento	Ninguna	Laboriosa. Insuficiente sensibilidad	No se recomienda hoy.
Enzimoimmunoanálisis (EIA)	Metodología familiar Disponibilidad comercial Sensibilidad Detecta IgG e IgM Procesamiento en lotes	Controlar la eficiencia de los reactivos comerciales Poco flexible	Determinación del estado inmune Soporte de algunos diagnósticos clínicos
Aglutinación con látex	Elevada sensibilidad Sencillez, flexibilidad	Interpretación subjetiva Fenómeno prozona Ausencia de marca CE	Cribado rápido de donantes de órganos Susceptibilidad a la infección
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Sensibilidad Detecta IgG e IgM Flexibilidad	Inespecificidad en la detección de IgG	Superada por pruebas de EIA.
Prueba de fluorescencia anticomplemento (ACIF)	Sensibilidad	Laboriosidad Experiencia técnica Sólo detecta IgG	Sólo en centros de referencia
Histopatología	Habituales en laboratorios Correlación con afectación focal	Sensibilidad insuficiente	Referencia diagnóstica de afectación focal
Detección de antígeno			
Antigenemia pp65 (leucocitaria)	Sensibilidad Especificidad Rapidez y familiaridad técnica Marcador de carga viral	Difícil estandarización Interpretación de los resultados dependiente de experiencia propia	Diagnóstico de enfermedad en transplantados y otros inmunodeprimidos (SIDA) Marcador de profilaxis guiada
En otras muestras	Detección <i>in situ</i> Especificidad	Sensibilidad variable Experiencia	Neumonitis en lavado broncoalveolar Inmunohistoquímica
Métodos de cultivo			
Cultivo en tubo	Especificidad	Experiencia en cultivos Sensibilidad insuficiente Tardanza de resultados	Confirmación de casos atípicos Punto de partida para los estudios de sensibilidad a los antivíricos
Cultivo <i>shell vial</i>	Rapidez Sensibilidad, especificidad	Experiencia en cultivos Experiencia en la técnica	Seguimiento de transplantados Diagnóstico rápido diferencial

Tabla 8. Resumen de las principales características de las técnicas moleculares aplicables al diagnóstico del CMV^a

Técnica	Sensibilidad analítica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Métodos cualitativos				
PCR desarrollo propio	Simple: 10 ³ copias Anidada: 10-10 ² copias	Elevada sensibilidad	Ausencia de estandarización. Bajo valor predictivo de ECMV (no aplicable a seguimiento de pacientes de riesgo)	Diagnóstico de la afectación del SNC Diagnóstico prenatal de la infección congénita
Nuclisens pp67	700 copias ARN	Asociación con ECMV	No cuantitativo. Instrumental específico. Poca experiencia clínica Precio	Seguimiento de pacientes de riesgo
Amplicor® CMV	1000 copias/ml plasma	Escasas	Sensibilidad insuficiente como procedimiento cualitativo	Superada por procedimiento cuantitativo (Amplicor® CMV Monitor)
Métodos cuantitativos				
Digene Hybrid Capture (captura del híbrido)	700 copias/ml sangre	Sencillez del proceso	Muchos controles/muestra Poca experiencia clínica Precio	Seguimiento de pacientes de riesgo
Quantiplex® CMV ADN ramificado	900 copias/10 ⁶ PMN	Alta reproducibilidad	Requiere partir de 2x10 ⁶ PMN Instrumental específico Trabajo en lotes grandes	No se ha llegado a comercializar
Amplicor® Monitor	400 copias/ml plasma 400 copias/5x10 ⁶ PMN.	Elevada sensibilidad	Instrumental específico Impacto de controles y estándares Precio	Seguimiento de pacientes de riesgo

^aAbreviaturas. ECMV: enfermedad por CMV; PMN: leucocitos polimorfonucleares

Las técnicas de EIA y sus variantes han supuesto un gran avance y, hoy en día, son las más utilizadas en el laboratorio diagnóstico por razones de índole práctica. Son razonablemente rápidas (2-4 horas), automatizables, de lectura objetiva y con una amplia disponibilidad en el mercado. Los equipos e instrumentos son comunes para otros patógenos y la tecnología muy familiar a todos los laboratorios. Permiten la detección de IgG e IgM y la cuantificación del título de anticuerpos. La sensibilidad y especificidad, superiores al 98%, son comparables a las de la técnica de referencia ACIF aunque, en algunos estudios antiguos, se describieron resultados falsos positivos con algunas marcas comerciales, lo que obliga a una selección racional de los reactivos por parte del microbiólogo. En este sentido, se recomiendan los métodos comerciales con antígenos recombinantes, en lugar de los que utilizan extractos crudos de cultivo.

La detección de anticuerpos IgM específicos por IF o EIA constituye un apartado de particular importancia en este virus, pues permite *a priori* establecer el diagnóstico de infección reciente. Las técnicas indirectas presentan falsos negativos por competición con los anticuerpos IgG, especialmente en presencia de un título elevado de éstos. También pueden producirse falsos positivos por la presencia de factor reumatoide que reacciona inespecíficamente con otras IgG. Para obviar estos problemas, los métodos más modernos absorben previamente estos factores o, mejor, utilizan variantes técnicas de captura, que son las más recomendables.

Recientemente, se ha descrito la prueba de avidéz de los anticuerpos IgG como método para diferenciar una infección pasada (alta avidéz) de una reciente. Estas técnicas se aplican con los métodos convencionales sobre muestras de suero tratadas o no con una solución de urea 5-8 M, calculándose el cociente porcentual entre la absorbancia de la muestra tratada dividida por la absorbancia de la muestra sin tratar. Una avidéz inferior al 35% sería indicativa de una infección reciente, mientras que si es superior al 65% sería sugestiva de una infección pasada en el tiempo. Algunas evaluaciones iniciales han sido prometedoras, especialmente como ayuda en el diagnóstico de la infección congénita, si bien la experiencia es insuficiente como para recomendarlas con carácter general y, por el momento, probablemente deben ser objeto de laboratorios de referencia.

4.2.4. Métodos basados en el cultivo

El CMV es un virus con una gran especificidad de especie y sólo las células diploides humanas permiten el crecimiento *in vitro*. Existen diversas líneas de este tipo que pueden adquirirse comercialmente, lo que facilita y amplía el diagnóstico a bastantes laboratorios. Las más utilizadas son las líneas semicontinuas de fibroblastos MRC-5 o WI-38 de pulmón embrionario humano. En nuestro país, es posible obtenerlas en

tubos o viales listos para su inoculación, o en suspensiones estabilizadas (más económicas).

En el cultivo convencional, suelen inocularse tubos de cultivo celular y la positividad se detecta mediante la observación del efecto citopático, que es característico. Cuando se observan las monocapas directamente con un microscopio invertido, aquél consiste en focos discretos con células pignóticas, redondeadas y refringentes, que progresan lentamente. Si se tiñen los cultivos con tinciones convencionales (hematoxilina, etc.), es posible observar la imagen típica de células con grandes inclusiones nucleares, similar al efecto citopático que se observa *in vivo*. El CMV es uno de los herpesvirus con tiempo de replicación más largo, lo que se traduce en la tardanza en desarrollar el efecto citopático en los cultivos y, en consecuencia, en una demora en el tiempo real de diagnóstico. En la experiencia de muchos autores, el término medio de detección suele ser de unos 10 días, pero no es raro que se prolongue hasta 15-20 días, y difícilmente se observa la presencia antes de cinco. Estos plazos son excesivos para incidir sobre la terapéutica, lo que constituye la mayor desventaja de este método diagnóstico. Una excepción a esto la encontramos en los cultivos de orina procedentes de neonatos con infección congénita, cuya elevada carga vírica se traduce en efectos manifiestos a las 48 h. Otro problema de los cultivos convencionales es la labilidad del virus, lo que limita el transporte a centros de referencia para cultivo. Por último, la sensibilidad del cultivo es insuficiente para el control en pacientes inmunodeprimidos, lo que es particularmente cierto en muestras como el LCR.

El método de cultivo conocido como *shell vial* (SV) ha permitido obviar alguno de los inconvenientes del cultivo en tubo, y supuso en su día un avance innegable en el diagnóstico del CMV. Detecta antígenos víricos inmediato-precoces mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, en un formato de cultivo sobre viales de fondo plano. La sensibilidad se incrementa al poder centrifugar la muestra sobre las monocapas de fibroblastos dispuestas sobre un portaobjetos redondo colocado en el fondo de un vial igualmente redondo. En la práctica, el método SV permite realizar la mayor parte de diagnósticos en 24 h y algunos pocos más en 48 h. Todo el material, incluyendo los viales con los cultivos, se puede adquirir en el comercio. Para el revelado de los viales se puede utilizar una tinción fluorescente o enzimática, siendo las primeras las más convenientes por su sencillez. Existen diversos monoclonales (o mezcla de ellos) comercializados en nuestro país, pero es obligado que detecten antígenos inmediato-precoces, por lo general la proteína de 72 kD. Específicamente, no son aptos los dirigidos frente a antígenos tardíos, como los utilizados en tinciones directas o en la prueba de antigenemia (ver más adelante). En manos expertas, la técnica SV ha demostrado una sensibilidad superior incluso al cultivo convencional, permitiendo ampliar el diagnóstico virológico en un 15-20% de las

muestras. Algunos autores refieren una menor eficiencia con los cultivos de sangre, dado que la centrifugación incrementa la toxicidad de las células sanguíneas sobre los fibroblastos del cultivo, pero es dudoso que esto tenga una trascendencia real en la práctica de los laboratorios. Salvo errores técnicos, la especificidad es casi del 100% en laboratorios con técnicos que posean un entrenamiento mínimo.

4.2.5. Diagnóstico histológico y detección de antígenos en tejidos

Las tinciones convencionales (hematoxilina-eosina, Papanicolau, etc.) pueden aplicarse al diagnóstico del CMV en muestras de tejidos (pulmón, cerebro, hígado, biopsias de tubo digestivo, etc.), así como a preparaciones procedentes de lavados broncoalveolares. En estos casos, es posible observar la presencia de las típicas células citomegálicas con inclusiones intranucleares basófilas de cromatina vírica rodeadas de un halo que margina la cromatina celular al borde de la membrana nuclear (imagen en "ojo de búho"). En manos de patólogos con experiencia, estas imágenes son patognomónicas de afectación tisular por el CMV aunque, siendo estrictos, también podrían confundirse con infecciones por otros virus, especialmente adenovirus. El mayor problema de estas técnicas es su falta de sensibilidad. La aplicación de tinciones inmunoenzimáticas con anticuerpos monoclonales mejora la especificidad, pero no significativamente la sensibilidad. Estos métodos se han aplicado con éxito al diagnóstico de la neumonitis en pacientes de alto riesgo, sobre muestras de lavados broncoalveolares y, en especial, al diagnóstico de la enfermedad focal por CMV en pacientes inmunodeprimidos, en biopsias del tejido afecto, constituyendo en estos casos el método de referencia.

4.2.6. Prueba de antigenemia de CMV

Esta técnica ha demostrado ser un avance significativo en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes de riesgo, muy en particular en los pacientes transplantados e inmunodeprimidos en general. Consiste en detectar la presencia de antígenos del CMV en los leucocitos extraídos de la sangre de pacientes con sospecha de infección activa por el virus, utilizando para ello tinciones inmunofluorescentes o inmunoenzimáticas, habitualmente las primeras. La antigenemia presenta una serie de ventajas teóricas, como son la sencillez de realización, la accesibilidad a muchos laboratorios, la familiaridad de la metodología y la rapidez en la obtención de resultados, puesto que es posible llevar a cabo la técnica en 4-5 horas. De gran importancia, la experiencia ha demostrado que la cuantificación de los leucocitos que expresan el antígeno se correlaciona muy bien con la carga vírica del CMV presente en la sangre, lo que posibilita *a priori* utilizar la prueba como marcador diagnóstico, pronóstico y en el control del tratamiento.

La sensibilidad de la antigenemia, tomando como referencia los métodos de cultivo en condiciones óptimas, lo que no siempre es fácil conseguir de

forma continua, puede alcanzar el 100%. Al rebajar el umbral de detección del virus, es posible adelantarse en el diagnóstico de infección activa en torno a una media de 7 días respecto al cultivo en SV, lo que posibilita su utilización como marcador pronóstico, como veremos más adelante. Con un mínimo adiestramiento técnico, la mayor sensibilidad no se traduce en falta de especificidad de la antigenemia, pero para conseguir una mayor reproducibilidad de esta técnica, es obligado realizarla en condiciones estándar, para lo que se remite al lector a revisiones metodológicas especializadas. Mientras que la estandarización intra-laboratorio es factible razonablemente, no ocurre lo mismo con la repetitividad de los resultados obtenidos entre laboratorios diferentes, lo que constituye una limitación de la técnica. Se pueden hacer una serie de recomendaciones para conseguir resultados óptimos: el antígeno diana más idóneo es la fosfoproteína de matriz de 65 kD (pp65). Existen en el mercado diversos anticuerpos de calidad contrastada (Chemicon, Argene-Biosoft, BioRad, etc.). La fijación de las preparaciones deberá hacerse con formaldehído, que ofrece mejores resultados que la acetona fría. Un aspecto capital es la rapidez de procesamiento, pues el antígeno pp65 es lábil, para lo que se aconseja no demorarlo más allá de 18 horas, preferiblemente dentro de las cuatro primeras horas desde la extracción de la muestra. Esto puede representar un problema en laboratorios con recursos limitados, o para aquellos que deriven muestras a laboratorios de referencia. Asimismo, los mejores resultados en sensibilidad y precisión se obtienen sobre una preparación con 2×10^5 leucocitos. Por último, la precisión es aceptable entre 10 y 250 células CMV⁺/preparación. Más allá de este límite superior resulta extremadamente difícil realizar recuentos reproducibles y, por lo demás, tampoco es clínicamente necesario.

4.2.7. Métodos moleculares cualitativos

Las técnicas moleculares, especialmente las de amplificación, se han aplicado profusamente al diagnóstico del CMV, entre ellas la PCR y el NASBA (*nucleic acid sequencing-based assay*). Por lo que se refiere a las primeras, se han descrito múltiples procedimientos que varían en la secuencia del gen a amplificar, el formato de amplificación [simple frente a anidada (*nested*)] y el método de detección (electroforesis, hibridación con sondas específicas seguida de un EIA, etc.). También se han descrito métodos de PCR múltiple, que permiten la detección de varios herpesvirus a la vez. Muchas de estas técnicas han derivado en sistemas comerciales. La principal ventaja de estos métodos es su gran sensibilidad; así, en muestras de sangre o de LCR, pueden detectar incluso 10-100 copias/ml. Los mejores resultados se obtienen con técnicas anidadas y detección con hibridación-EIA. Las diferencias de sensibilidad descritas en la literatura respecto al fragmento a amplificar pueden ser debidas más bien a la eficacia de cada laboratorio en particular que a la propia diana, siendo los genes de

la polimerasa de ADN vírico, glucoproteína B y del antígeno inmediato-precocoz de 72 kD los más utilizados. La especificidad es superior al 98% si se hace una elección cuidada de los cebadores y se toman las precauciones adecuadas para evitar la contaminación cruzada con *amplicones*. Aunque cabe la posibilidad de que las técnicas más sensibles detecten el virus latente en las células de la muestra, la experiencia en el seguimiento de pacientes de riesgo (SIDA, transplantados) indica que esta posibilidad es más teórica que real y que, en la práctica, una prueba positiva es sinónimo de infección activa. Es importante adelantar que la gran sensibilidad puede ser una desventaja en determinadas situaciones diagnósticas.

La amplificación isoterma NASBA se utiliza en un método comercial (Nuclisens® CMV pp67, BioMérieux) en el que el ácido nucleico a amplificar no es el ADN del virus, sino el ARNm del gen de la proteína pp67 que se produce durante su replicación. Se pretende con ello diferenciar la infección activa, con multiplicación del virus, de la simple latencia. La extracción se hace con un agente caotrópico (isotiocianato de guanidina) seguida de una precipitación y adsorción con partículas de sílice. Recientemente, se ha cambiado el sistema de detección por otro que utiliza tecnología *en tiempo real*. En general, existe poca experiencia con esta técnica, aunque los resultados son aceptables. Aplicada al seguimiento de pacientes de riesgo, fundamentalmente transplantados, la sensibilidad y precocidad diagnóstica son similares a las de la prueba de antigenemia, con variaciones entre los distintos estudios, e inferiores a los métodos de PCR. Como es lógico, la especificidad es prácticamente total.

4.2.8. Métodos moleculares cuantitativos: carga vírica

En la actualidad, existen dos tipos de tecnología aplicada a la cuantificación de la carga vírica del CMV por métodos moleculares disponibles comercialmente: la técnica de captura del híbrido (Hybrid Capture CMV DNA Assay, Digene) y la PCR competitiva cuantitativa (Amplicor® CMV Monitor, Roche). También se ha desarrollado un método basado en la amplificación de señal con ADN ramificado (Quantiplex® CMV, Bayer), pero no se ha comercializado. Además, existen en la literatura numerosas publicaciones con métodos semicuantitativos y cuantitativos, por lo general basados en la amplificación por PCR. Dada la necesidad de estandarización inter-laboratorio, sólo se mencionarán en este documento los métodos comerciales.

El método de captura de híbrido se basa en la formación de un híbrido mixto entre el ADN del CMV, previa lisis de la muestra, y una sonda de ARN complementaria. Posteriormente, estos híbridos son captados por anticuerpos anti-híbrido ADN-ARN fijados sobre las paredes de un tubo soporte de la reacción, que se revela con la adición de un conjugado con fosfatasa alcalina que actúa sobre un

substrato quimioluminiscente. En la versión más moderna, el método amplifica la señal original unas 3.000 veces. No existen estudios de evaluación amplios y bien diseñados pero, en general, muestran que la sensibilidad analítica (700 copias/ml), es comparable o algo inferior a la antigenemia y al método Amplicor® CMV Monitor. Puesto que la cuantificación se lleva a cabo por referencia a una curva de calibración con 12 estándares, el método no se aplica sobre lotes de muestras pequeños, por lo que resulta poco flexible. El intervalo de linealidad se cifra entre 2,1 y 830 pg de ADN de CMV lo que, aproximadamente (no existen patrones internacionales), se traduce entre 700 y 200.000 copias/ml sangre, que se considera suficiente desde el punto de su aplicación al seguimiento de los pacientes de riesgo.

El método Amplicor® CMV Monitor está basado en una amplificación competitiva por PCR y utiliza cebadores específicos del gen de la polimerasa de ADN vírico marcados con biotina. La extracción se lleva a cabo con isopropanol tras una lisis con tiocianato de guanidina en presencia de detergentes, seguida de una precipitación con etanol absoluto. La amplificación se lleva a cabo en presencia de un estándar interno cuantificado y la detección se hace por hibridación con sondas específicas dirigidas al estándar interno, que actúa de referencia de la eficacia de la amplificación y al ADN diana del CMV en la muestra problema. Tanto la amplificación como la detección se lleva a cabo automáticamente en el aparato Cobas® Amplicor y los resultados se expresan en copias de CMV/ml plasma o por 5×10^6 leucocitos. La sensibilidad analítica es de 400 copias/ml de plasma o 5×10^6 leucocitos, algo inferior a la versión cualitativa Amplicor® CMV, y el intervalo de linealidad, entre este límite inferior y 10^5 copias por el volumen de plasma o número de células antes señalado, probablemente suficiente para el seguimiento de los pacientes. Respecto a los valores de carga vírica por unidad de volumen, son superiores en el caso de sangre completa (carga leucocitaria) que los obtenidos sobre plasma, pero los estudios muestran muy buena correlación entre ambos valores, por lo que se prefiere el plasma por su más fácil manipulación.

Mención aparte, por sus expectativas de futuro, merecen las técnicas de amplificación cuantitativa *en tiempo real*, de las que se han descrito bastantes aplicaciones de desarrollo propio por los laboratorios, y algunas de ellas están a punto de ser comercializadas. Todas se basan en la amplificación por PCR seguida de la detección en el mismo tubo en el que se lleva a cabo la amplificación. Dicha detección puede hacerse con fluorocromos que se intercalan en el ADN amplificado (por ejemplo, SYBR Green) o, mejor, con sondas específicas fluorogénicas en sus diversos formatos: sondas Taqman, molecular beacons, sondas FRET, etc. La cuantificación se realiza con un soporte lógico informático, determinando el primer ciclo en el que se detecta fluorescencia en la muestra y extrapolando

con una curva de calibración externa o, si se utilizan fluorocromos diferentes, con un patrón interno.

Los métodos de amplificación *en tiempo real* poseen unas ventajas técnicas teóricas muy interesantes. A pesar de las diferencias metodológicas, las evaluaciones existentes muestran una sensibilidad analítica de hasta 100 copias y un intervalo lineal de cuantificación situado entre valores de 6-7 en la escala logarítmica decimal, con lo que, en principio, cubrirían las cualidades de los métodos cualitativos y cuantitativos actuales. Con todo, las principales ventajas para el laboratorio serían la sencillez, flexibilidad, rapidez diagnóstica y el realizar la amplificación y detección en el mismo tubo cerrado, evitando así la posibilidad de contaminación cruzada con *amplicones*.

4.3. PRINCIPALES INDICACIONES DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Debido a las particularidades biológicas del CMV, la interpretación de los resultados de laboratorio presenta dificultades. Con ánimo simplificador, en la práctica, hay que considerar a las pruebas serológicas como idóneas para documentar la infección por el virus, mientras que las técnicas de cultivo, detección de antígeno o moleculares se aplican al diagnóstico de la infección activa, de la enfermedad y al seguimiento del tratamiento antivírico.

4.3.1. Utilidad real de las técnicas serológicas

En el paciente inmunocompetente, la serología encuentra utilidad para detectar el estado de infección, con fines de encuestas seroepidemiológicas de la población y, especialmente, en el cribado de donantes y receptores de órganos. En el trasplante de órgano sólido, el injerto de un órgano procedente de un donante seropositivo para el CMV en un receptor seronegativo (trasplante D⁺/R⁻) es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de complicaciones graves por este virus tras el trasplante. También es importante el cribado en los transplantados de precursores hematopoyéticos, si bien aquí el mayor riesgo se produce en el receptor previamente seropositivo, por reactivación del virus latente.

La serología es el único método que es capaz de diagnosticar la infección primaria y diferenciarla de la reactivación, aunque éste es un objetivo más bien teórico pues, en la práctica, lo que se hace es iniciar la quimioprofilaxis en caso de riesgo de primoinfección, como ocurre con los trasplantes D⁺/R⁻. Sólo la demostración de una seroconversión IgG establece el diagnóstico de infección primaria. La detección de IgM no lo hace, ya que pueden deberse a la persistencia de títulos tras una infección pasada, a la producción de estos anticuerpos en algunos casos de reactivación (especialmente en pacientes inmunodeprimidos) y al estímulo policlonal por otros virus (Epstein-Barr, herpes humanos 6 y 7 y varicela-zóster).

Aunque la principal aplicación de la serología se centra en la detección del estado inmune de un

individuo frente al virus, también puede aplicarse al diagnóstico de la infección primaria, especialmente si es sintomática. Por razones prácticas, para la detección de IgG, se recomienda un método EIA de calidad contrastada, o la aglutinación pasiva con látex, de sencilla y rápida realización. Para las IgM es preferible un EIA de captura que evita falsos positivos.

Sin embargo, al margen de los problemas técnicos, es preciso tener presentes las limitaciones de la serología para el diagnóstico de la infección activa y la enfermedad por CMV. Los pacientes inmunodeprimidos (la población sobre la que más consecuencias tiene la infección por el virus) no desarrollan una respuesta inmune adecuada, lo que hace difícil detectar la infección primaria por seroconversión, o las reactivaciones por el aumento significativo del título de anticuerpos. Con todo, la mayor desventaja práctica de la determinación de IgG radica en la demora en obtener resultados inherente a la necesidad de muestras pareadas, lo que les resta interés en el manejo de los pacientes de riesgo. Las pruebas que detectan IgM son más rápidas pero ya se han señalado antes los problemas técnicos que presentan. Además, la IgM tampoco permite diferenciar la infección primaria de la reactivación o la reinfección en el individuo inmunodeprimido, ni mucho menos distinguir la infección activa de la enfermedad ni establecer pronósticos al respecto.

4.3.2. Indicaciones de los métodos basados en el cultivo

Ya se han comentado anteriormente las limitaciones técnicas que presentan estos métodos. Por todo ello, para laboratorios que se inicien en el diagnóstico del CMV, tal vez podría hacerse la recomendación de que buscasen estrategias diagnósticas alternativas (detección de antígenos o métodos moleculares). Cuando el laboratorio ya disponga de esta tecnología, el cultivo convencional puede ser útil, porque es el punto de partida para la realización de pruebas de sensibilidad a los antivíricos, y porque permite el aislamiento de otros patógenos víricos que pudieran estar presentes en la muestra. También pueden facilitar el diagnóstico de la infección neonatal, por las razones señaladas en un apartado anterior. En este y en otros casos similares, la técnica SV es preferible por rapidez y sensibilidad. Por último, los métodos de cultivo implican la presencia de viriones viables en la muestra, por lo que pueden servir como indicador de la eficacia temprana del tratamiento antivírico. De nuevo, la recomendación es el empleo del SV.

4.3.3. Utilidad de las técnicas histológicas y de detección de antígenos en tejidos

También se han comentado anteriormente las limitaciones técnicas que presentan estos métodos, particularmente la insuficiente sensibilidad. Por esta razón, la principal aplicación se circunscribe al diagnóstico de la enfermedad focal sobre muestras de biopsia del órgano afectado, en donde tanto las tinciones convencionales como las

inmunoenzimáticas constituyen el método de referencia. Es importante señalar este dato, puesto que ni los métodos de cultivo, ni mucho menos las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos establecen el diagnóstico de certeza, dado su bajo valor predictivo positivo, y no es infrecuente su utilización con estos fines en laboratorios diagnósticos.

4.3.4. Aplicación práctica de la prueba de antigenemia

La principal cualidad que hace interesante la prueba de antigenemia es su potencial de cuantificación, como indicador de la carga vírica. Son muchos los estudios que demuestran una buena correlación lineal entre la cifra de antigenemia y la carga vírica medida por otros métodos, como los cultivos cuantitativos y los métodos moleculares. Por otra parte, la carga vírica elevada se asocia claramente con la presencia de síntomas (enfermedad por CMV), como reflejo de la ruptura del equilibrio entre la inmunidad celular del huésped y el propio virus. Por la misma razón, la dinámica de una carga vírica creciente en el tiempo indica un desenlace favorable a la replicación del virus y, en este sentido, representa un riesgo de desarrollo futuro de la enfermedad. En consecuencia, como todo método de carga vírica, la antigenemia encuentra su principal indicación en el seguimiento de los pacientes de riesgo (inmunodeprimidos), tanto como marcador diagnóstico, junto con su buena sensibilidad, como pronóstico.

El valor de la antigenemia para el diagnóstico de la enfermedad está documentado en la literatura y siempre se asocia con niveles por encima de unos valores críticos que varían según el tipo de paciente y de las condiciones de realización técnica. La sensibilidad es muy elevada para situaciones clínicas que implican la diseminación del virus, como el llamado síndrome vírico del inmunodeprimido, y menos para la afectación focal, especialmente la del tubo digestivo y, en menor medida, en la retinitis de los pacientes con SIDA avanzado, en donde es posible obtener resultados de antigenemia negativos o cifras por debajo del umbral de significación establecido. Sin embargo, cabe decir que muchos cuadros con síntomas focales coinciden con una diseminación sanguínea del CMV, de ahí el interés de la detección del antígeno pp65 en sangre. En la misma línea, la antigenemia (u otras medidas de la carga vírica en sangre) ha demostrado su utilidad en la monitorización de los pacientes de riesgo en la práctica clínica, con una precocidad media de unos siete días antes de la aparición de los síntomas. Aunque el tratamiento antivírico se asocia con una bajada de la cifra de antigenemia, la respuesta no es inmediata, e incluso es posible observar cifras crecientes en la primera semana de tratamiento eficaz.

Aunque la antigenemia se ha utilizado fundamentalmente en los pacientes inmunodeprimidos, hay experiencias de aplicación en otras situaciones clínicas. Así, en su tiempo se

propuso como técnica diagnóstica de la afectación del SNC, pero los resultados no han sido concluyentes, dada la necesidad de disponer de un número elevado de leucocitos, lo que no siempre es posible, bien porque el recuento en LCR es bajo, o porque el volumen de muestra disponible es insuficiente. Además, las técnicas de amplificación han demostrado una eficacia superior. También es posible diagnosticar la infección congénita detectando el antígeno del virus en la sangre del neonato, pero la experiencia es limitada.

4.3.5. Utilidad de las técnicas moleculares cualitativas

Tal como se ha indicado antes, la principal característica de los métodos moleculares de amplificación cualitativa por PCR es su extrema sensibilidad. Esta circunstancia puede ser ventajosa en ciertas situaciones, pero negativa en otras, por lo que es importante aplicar el sentido común a la hora de encontrar indicaciones. Así, la PCR cualitativa constituye el método de referencia para el diagnóstico de las infecciones del SNC en muestras de LCR, para lo que, en general, se prefieren los métodos con la máxima sensibilidad (amplificación *nested* más hibridación-EIA). Es cierto que, con el control clínico de la infección por el VIH, este tipo de afectación es infrecuente en la práctica clínica actual, pero sigue siendo útil en casos de sospecha de encefalitis y ventriculitis no sólo para efectuar el diagnóstico de CMV, sino también para excluirlo. Por lo que respecta a la afectación medular, un cuadro infrecuente, cursa con una carga vírica en LCR suficiente para ser detectada por métodos menos sensibles, como el cultivo rápido SV. Las técnicas de PCR múltiple de herpesvirus tienen la ventaja indudable de facilitar el diagnóstico de la infección del SNC por diversos virus, pero también el riesgo de ser aplicadas indiscriminadamente, sin un diagnóstico clínico diferencial riguroso, lo que puede plantear dificultades de interpretación de los resultados. Además del diagnóstico de las infecciones del SNC, la PCR cualitativa es un método útil para el diagnóstico de la infección congénita preparto.

Fuera de las situaciones clínicas anteriores, es difícil encontrar una aplicación útil de las pruebas cualitativas en la práctica clínica. Su gran sensibilidad se traduce en un bajo valor predictivo positivo para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad por CMV en los inmunodeprimidos, como demuestran muchos estudios, incluso en muestras clínicas más significativas, como la sangre, habiendo sido superadas con los métodos de cuantificación de la carga vírica. Tampoco deben aplicarse para el control del tratamiento ni la detección de la aparición de resistencia a los antivíricos. Respecto al diagnóstico de la enfermedad focal en los inmunodeprimidos, la positividad de la PCR sobre muestra de tejido no se considera diagnóstica por las mismas razones. Recientemente, se ha aplicado a la detección del CMV en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerosa o

enfermedad de Crohn, pero no existe suficiente evidencia sobre la implicación real del virus en estos cuadros, ni mucho menos del significado de una detección positiva, por lo que no debe aplicarse la PCR fuera del contexto de la investigación clínica de esta posible relación patogénica.

Como se ha visto antes, los resultados obtenidos en los pocos estudios de evaluación de la técnica comercial Nuclisens® CMV son bastante aceptables. Su utilidad se circunscribe al seguimiento de los pacientes de riesgo, pero deben valorarse cuestiones prácticas antes de ser aplicadas en el laboratorio. Entre ellas, cabe citar negativamente el precio, superior al de otras alternativas (antigenemia), especialmente cuando se requiere un diagnóstico inmediato por las circunstancias clínicas del paciente. Tampoco parece mostrar ventajas sobre los métodos de PCR cuantitativa, por lo demás una tecnología más familiar e implantada en muchos laboratorios de microbiología molecular.

4.3.6. Pruebas moleculares cuantitativas

Como toda prueba de determinación de carga vírica, el interés de las pruebas moleculares se centra en el seguimiento de los pacientes de riesgo, como marcador diagnóstico de la enfermedad, de inicio de la terapia anticipada (*preemptive therapy*) y en la monitorización de la respuesta al tratamiento. En este apartado, los métodos moleculares compiten con la prueba de antigenemia, lo que se discute de forma particular más adelante. La mayor ventaja técnica de los métodos de cuantificación moleculares es la mayor estabilidad del ADN vírico (frente a la labilidad del antígeno pp65). En la parte negativa, hay que mencionar la necesidad de trabajar en lotes amplios (24 en el caso del Amplicor® Monitor, o de 48 en el Hybrid® Capture) para aminorar el impacto económico de los controles y estándares necesarios para realizar la prueba, con lo que se resta eficiencia y rapidez diagnóstica. Aún en las mejores condiciones, el precio por prueba es considerable, lo que debe tenerse en cuenta.

En estos momentos no existe una experiencia amplia de aplicación de las pruebas de amplificación *en tiempo real* en la práctica clínica, por lo que todas las recomendaciones se basan en sus ventajas teóricas indudables. También aquí deben tenerse en cuenta las consideraciones económicas y la necesidad de disponer de aparatos costosos por el momento. Es previsible que, en un futuro a medio plazo, reemplacen a las técnicas cualitativas y cuantitativas comerciales actuales.

4.4. DIAGNÓSTICO DEL CMV EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS

4.4.1. Problemas diagnósticos y pronósticos en la gestación

La detección de los anticuerpos anti-CMV fue, en años pasados, un componente ineludible del cribado serológico en las gestantes. En la actualidad, existe unanimidad entre los expertos en que esta estrategia no es coste-efectiva, y ello por varias razones: a) la prevalencia de la infección en la población general es

bastante elevada, b) el riesgo de complicaciones graves para el neonato en el caso de una infección congénita o perinatal producida por la reactivación de un virus latente en la madre, por lo demás la situación mayoritaria dentro del conjunto de infecciones neonatales, es prácticamente despreciable, c) no es posible identificar los casos concretos con riesgo de presentar complicaciones graves, incluso dentro de las adquiridas en el primer trimestre de gestación, d) la incidencia de infección congénita grave es baja en nuestra población, e) es difícil, en la práctica, demostrar una infección primaria en la madre, y f) no se conoce la utilidad ni seguridad del tratamiento antivírico específico durante el embarazo. En consecuencia, las pruebas de laboratorio no son capaces de orientar ni el tratamiento ni la prevención, por lo que no se recomienda el cribado serológico durante la gestación. Sí es recomendable realizarlas como parte del consejo sanitario pregestacional, pues una positividad en la mujer prácticamente descarta una infección clínicamente significativa para el feto. También podría ser útil guardar muestras de suero obtenidas durante la gestación para el cribado de otros patógenos, ya que ayudarían en el diagnóstico diferencial de la sepsis neonatal.

4.4.2. Diagnóstico de la infección congénita en el recién nacido

El aspecto más importante para las pruebas de laboratorio en este contexto es establecer un diagnóstico inequívoco. En estos casos, los cultivos de orina o secreciones orofaríngeas obtenidos inmediatamente tras el parto suelen ser positivos y con una elevada carga vírica, lo que conduce a diagnósticos bastante rápidos con los métodos SV, y hasta cierto punto con el cultivo convencional. Aunque la experiencia es limitada, parece que el inóculo vírico es claramente superior en la infección congénita que en la de adquisición perinatal, lo que ayudaría a distinguir entre estas dos situaciones patogénicas. La detección de anticuerpos IgM en el recién nacido, mediante una técnica EIA de captura también podría ayudar en el diagnóstico, mientras que la detección de IgG carece de interés. La infección congénita también puede diagnosticarse por métodos moleculares en sangre obtenida del cordón umbilical antes del parto y, cuando esta exploración esté clínicamente indicada, en líquido amniótico por métodos moleculares y por cultivo rápido.

En la práctica, no es infrecuente que se plantee el diagnóstico diferencial en un recién nacido de tres o más meses de vida. En estos casos, ninguna técnica nos puede ayudar a diferenciar entre una infección congénita de una perinatal. Únicamente, si se dispone de sueros maternos obtenidos durante la gestación, será posible esclarecer un diagnóstico por comparación con sueros post-parto.

4.4.3. Diagnóstico y pronóstico en el inmunodeprimido: transplante de órganos

La determinación de la carga vírica tiene un indudable interés clínico en el control y seguimiento

de la infección por el CMV en los pacientes inmunodeprimidos. Tras la introducción de los modernos tratamientos antirretrovirales, este seguimiento se circunscribe fundamentalmente a los transplantados de órgano sólido y de precursores hematopoyéticos. Como ya se ha comentado, el dilema se ha planteado entre la utilización de la prueba de antigenemia frente a los métodos cuantitativos moleculares. Por el momento, no existe evidencia de superioridad de ningún método, ambos son aplicables al seguimiento de estos pacientes y todos tienen ventajas e inconvenientes, por lo que la decisión final debe recaer en factores internos de cada laboratorio: experiencia con una determinada técnica, tipo de pacientes que atiende, volumen de muestras, precio de los reactivos, etc.

Mientras que la utilización de los anteriores marcadores como ayuda al diagnóstico está bien establecida, no ocurre igual cuando se utilizan con carácter pronóstico. La PCR cuantitativa es algo más sensible que la antigenemia, y en consecuencia algo más precoz, pero no hay evidencia de que esto resulte una ventaja importante. Para que así fuese, sería necesario realizar una monitorización muy estrecha de los pacientes, lo que no siempre es posible llevar a cabo en la práctica clínica.

Por el momento, no existe unanimidad en los valores a utilizar para iniciar la terapia anticipada, tanto para la antigenemia como para la PCR cuantitativa. La antigenemia presenta problemas de estandarización técnica, pero tampoco ha sido posible establecer valores fiables para las técnicas moleculares. En consecuencia, es muy importante que cada laboratorio establezca sus propios valores a la luz de su propia experiencia, que dependerán de su procedimiento técnico, pero también del tipo de trasplante y de la pauta de inmunosupresión que se emplee en los pacientes. A título orientativo, pueden servir valores de antigenemia de 20 células $CMV^+/10^5$ leucocitos en los transplantados de órgano sólido (quizá más elevados en el trasplante cardíaco) y de 2-5 células $CMV^+/10^5$ leucocitos en los transplantados alogénicos de precursores hematopoyéticos. Con el método Amplicor® CMV Monitor, un valor de corte de 1.000-5.000 copias/ml de plasma puede servir de orientación.

Las pruebas de carga vírica también pueden emplearse en el control del tratamiento, pero la experiencia es menor. No existe acuerdo sobre la conveniencia de prolongar la duración de éste en los pacientes estables clínicamente, a pesar de que mantengan valores positivos de carga vírica al finalizar el tratamiento, y posiblemente no es necesario hacerlo cuando los niveles son bajos. Si no se produce un descenso marcado de la carga vírica tras la primera semana de tratamiento, o se mantienen valores razonablemente elevados, debe valorarse la posibilidad de desarrollo de resistencia a los fármacos y, en consecuencia, plantearse cambiar a otras pautas terapéuticas alternativas.

4.5. RESISTENCIA A LOS ANTIVIRICOS Y PRUEBAS *IN VITRO*

En la actualidad, disponemos en el mercado de cuatro fármacos anti-CMV: el ganciclovir, su profármaco valganciclovir, cidofovir (los tres análogos de nucleosidos) y el foscarnet. Todos inhiben, en última instancia, la acción de la polimerasa de ADN vírico, aunque este último por un mecanismo diferente que los tres primeros. Tanto el ganciclovir como su profármaco necesitan ser fosforilados inicialmente por una enzima vírica para ser convertidos en sus formas activas.

Al igual que con otros herpesvirus, los principales factores de riesgo para la selección de la resistencia en el CMV son el uso continuado de antivíricos (especialmente a dosis subterapéuticas) y el grado de inmunodepresión del paciente. Hasta fechas recientes, el grupo de pacientes en los que se había detectado con mayor frecuencia la aparición de cepas resistentes era el de los infectados por el VIH, puesto que también fueron éstos los más expuestos a estos fármacos. Aplicando las mismas premisas, no es raro que en los últimos años hayamos asistido a la descripción cada vez más frecuente de la resistencia en otros pacientes inmunodeprimidos. El fenómeno está bien descrito en los transplantados de precursores hematopoyéticos, pero también los sometidos a un trasplante de órgano sólido tratados con antivíricos pueden desarrollar la resistencia. Destacan los transplantados de pulmón, aunque hay casos en la literatura en el trasplante cardíaco, hepático y renal.

La resistencia del CMV obedece a la selección de mutaciones en el gen que codifica para la polimerasa de ADN (gen UL54) y, en el caso del ganciclovir y su profármaco, también en el de la fosfotransferasa (gen UL97). En términos de frecuencia, éstas son las más comunes, sin duda relacionado con el uso mayoritario del ganciclovir, y sólo confieren resistencia a estos dos fármacos. Las mutaciones en UL54 pueden provocar resistencia conjunta al ganciclovir y cidofovir (lo más habitual, dada la analogía estructural), al foscarnet sólo o, por fortuna menos frecuentemente, a todos los fármacos anti-CMV. En la tabla 9 se resumen los principales codones afectados por las mutaciones de resistencia.

4.5.1. Métodos fenotípicos de determinación de sensibilidad a los antivíricos

Todos ellos se basan en el efecto de concentraciones crecientes del antivírico sobre la multiplicación del virus, que puede detectarse directamente o a través de sus productos metabólicos. Se determina la concentración inhibitoria del 50% (CI_{50}), esto es, aquélla que es capaz de reducir en un 50% la multiplicación.

El **ensayo de reducción de placas** es el método fenotípico de referencia. Consiste en determinar la reducción en el número de focos (placas) de efecto citopático producidas sobre monocapas inoculadas con una suspensión titulada

Tabla 9. Principales mutaciones de resistencia del CMV a los antiviricos^a.

Gen afectado	Resistencia a:	Codones asociados con la resistencia
UL54 ^b	GCV ^c , CFV	408, 412, 501, 503, 513, 522, 545, 821, 987
	FOS	588, 700, 715, 781
	GCV ^c , CFV, FOS	802, 809
UL97	GCV ^c	460, 510, 520, 590, 594, 595, 603, 607, del 595-603

^aAbreviaturas. GCV: ganciclovir; CFV: cidofovir; FOS: foscarnet.

^bMuchas cepas clínicas presentan resistencia en UL97, por lo que es difícil discernir la contribución relativa de las mutaciones en UL54 a dicha resistencia.

^cLa resistencia al ganciclovir implica necesariamente resistencia al valganciclovir.

del virus, en presencia o no del antivirico. De forma alternativa, puede detectarse el crecimiento del virus por tinciones con anticuerpos frente antígenos inmediato-precoces o tardíos. En todos los formatos, es necesario partir de un inóculo elevado y previamente titulado del virus, lo que obliga a procedimientos de subcultivo lentos y tediosos (4 semanas o más), y el ensayo en sí implica entre 6 y 12 días adicionales de proceso. Ninguno de los métodos de reducción de placas está estandarizado y los resultados entre laboratorios muestran gran variabilidad. La falta de estandarización obedece a varios factores: a) el tipo de línea celular y el número de pases de ésta, b) el inóculo vírico utilizado (libre o no de células, c) el método de tinción de las placas y la subjetividad del observador que realiza la lectura, d) las cepas de laboratorio utilizadas de control en ensayos necesariamente separados, por lo general la cepa AD169. Más importante todavía, no existe acuerdo total sobre las CI₅₀ límite para la resistencia, aunque suelen aceptarse valores de 6 µM para el ganciclovir, 2-3 µM para el cidofovir y 400 µM para el foscarnet, a partir de los cuales se considera la cepa resistente.

Se han descrito alternativas al método de reducción de placas y sus variantes. El ensayo inmunoenzimático detecta la inhibición del crecimiento mediante la determinación de antígenos tardíos en el sobrenadante. Esta técnica se lleva a cabo en cultivos en microplaca de 96 pocillos, lo que permite realizar simultáneamente la titulación de la suspensión vírica que, no obstante, también tiene que ser elevada para dar validez al ensayo. El ensayo de hibridación de ADN mide la reducción en la producción del ácido nucleico vírico utilizando para ello sondas específicas marcadas con un isótopo del yodo. Necesita disponer de un inóculo titulado elevado y de la tecnología de radioisótopos, con los inconvenientes asociados. Hay que señalar, además, que los puntos de corte de resistencia con estos métodos no son necesariamente los aceptados (con reservas) para la técnica de reducción de placas.

4.5.2. Métodos genotípicos de detección de la resistencia

La presencia de cepas de CMV con resistencia a los antiviricos puede determinarse detectando la presencia de las mutaciones de resistencia resumidas en la tabla 9, lo que puede llevarse a cabo por diferentes métodos. La detección de mutaciones mediante **endonucleasas de restricción** (patrones RFLP) fue el método empleado inicialmente en la

investigación de mutaciones. Parte de fragmentos amplificados de cepas aisladas en la clínica y, con menor efectividad, amplificando directamente de la muestra. Se ha aplicado fundamentalmente al estudio del gen UL97. La **hibridación con sondas específicas**, o la amplificación con cebadores diseñados para hibridar sólo con fragmentos salvajes o mutantes se han empleado con fines de investigación, pero han caído en desuso.

La **secuenciación** de los genes UL97 o UL54 es el método de referencia para detectar la aparición de mutaciones en el curso del tratamiento, y puede realizarse tras una amplificación por PCR partiendo de la cepa aislada en cultivo o, mejor, directamente sobre la muestra clínica. Se pueden obtener resultados en 2-3 días, pero requieren personal entrenado e instrumental sofisticado.

4.5.3. Cuándo, cómo y qué métodos podemos aplicar en la práctica clínica

A fecha de hoy, no existen bases firmes que aconsejen la realización sistemática de pruebas de sensibilidad del CMV frente a los antiviricos en los laboratorios clínicos. Varias son las razones para ello: a) la metodología es laboriosa o costosa, y no está estandarizada, b) no es posible obtener resultados lo suficientemente rápidos como para modificar la actitud terapéutica, y c) la práctica clínica demuestra que estos pacientes pueden manejarse mediante marcadores indirectos, como la carga vírica medida mediante la antigenemia o los métodos moleculares. Sin embargo, sí parece aconsejable seguir profundizando en la investigación. En estos centros, cada vez están más al alcance los métodos de secuenciación directa, debiéndose reservar los fenotípicos para caracterizar mutaciones no descritas previamente o para conocer el efecto combinado de varias de ellas.

5. HERPESVIRUS HUMANO 6

5.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El herpesvirus humano tipo 6 (HHV6) fue aislado por primera vez en 1986 en linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados por el VIH o con síndromes linfoproliferativos. En 1991 se describieron dos variantes genéticamente distintas de este virus, la variante A (HVV6A) y la variante B (HVV6B), con diferencias antigénicas, de tropismo celular, distribución geográfica y manifestaciones clínicas. Durante muchos años no se le consideró como agente etiológico de cuadro clínico alguno hasta que, en 1988, Yamanishi *et al* describieron su asociación con el exantema súbito, también conocido

como *roseola infantum* o quinta enfermedad. A partir de ese momento, el HVH6 se considera un virus de distribución universal, que infecta a casi todos los niños menores de dos años (con un pico entre los 6 y los 9 meses de edad) y que, al igual que otros herpesvirus, se mantiene en estado de latencia y es capaz de reactivarse tanto en pacientes sanos como en inmunocomprometidos.

El modo de transmisión no está aclarado completamente, pero el HVH6 está presente en la saliva y se replica en las células epiteliales, sugiriendo que las secreciones orales contribuyen a la transmisión (sobre todo de adultos a niños), especialmente del HVH6B. Se ha sugerido la transmisión materno-fetal intraútero, y debe considerarse la transmisión a través de la sangre, médula ósea y órganos transplantados.

Tras la infección primaria, el genoma vírico persiste en las células mononucleares de sangre periférica (monocitos) y en los progenitores de la médula ósea. El virus también persiste en las glándulas salivares, pudiéndose detectar, de forma rutinaria, ADN del HVH6 en saliva mediante PCR. El ADN de HVH6 también ha podido detectarse en el LCR de niños, durante y posteriormente a la primoinfección, así como en el tejido cerebral de adultos inmunocompetentes, lo que implica que el SNC puede considerarse un lugar adicional para el establecimiento de la latencia o persistencia de dicho virus. De estos datos, se infiere que la persistencia del HVH6 implica dos estados, uno de verdadera latencia en monocitos (sin producción de virus infecciosos) y otro, con bajo nivel de replicación, en glándulas salivares y cerebro.

La infección por el HVH6 y su asociación con enfermedad clínica es diferente según se trate de pacientes inmunocompetentes o inmunodeprimidos. En los primeros, la infección primaria durante la infancia se manifiesta, en la mayoría de los casos, como una enfermedad febril, aunque en un pequeño porcentaje (17%-20%) aparecen las manifestaciones típicas del exantema súbito (fiebre y posterior desarrollo de un eritema cutáneo, normalmente tras la desaparición de la fiebre). Es un cuadro autolimitado, de unos seis días de duración y cuya complicación más frecuente es la aparición de convulsiones febriles (13%). Pueden aparecer, raramente, complicaciones como hepatitis, artritis, encefalitis y síndrome hemofagocítico.

La infección primaria en el adulto inmunocompetente es más rara, manifestándose como una enfermedad febril sin características especiales, o como una mononucleosis infecciosa. Puede aparecer eritema cutáneo, hepatitis y linfocitosis atípica. También se ha descrito la reactivación del HVH6 en pacientes adultos inmunocompetentes durante la gestación y en períodos de enfermedad crítica (variante HVH6A). La infección por el HVH6 se asocia con muchos otros cuadros clínicos, en los que sólo hay evidencia de asociación, pero sin confirmación de que el HVH6 sea el agente etiológico, como la esclerosis múltiple,

parálisis de Bell, algunos síndromes linfoproliferativos (incluyendo linfomas Hodgkin, no-Hodgkin y leucemia linfoblástica), y síndrome de fatiga crónica.

El HVH6 reactiva comúnmente en los pacientes infectados por el VIH, pero la asociación con síndromes clínicos específicos es rara, siendo la neumonitis y la encefalitis los más frecuentes. Aunque es conocido el efecto que el HVH6 tiene sobre la replicación del VIH *in vitro*, clínicamente no existe evidencia directa de progresión de la enfermedad por VIH por la replicación del HVH6, excepto, tal vez, en los casos de transmisión vertical.

La incidencia de infección por el HVH6 en pacientes transplantados varía según la metodología usada para el diagnóstico, así como con el tipo de trasplante. Se ha sobrestimado la incidencia de infección activa cuando su diagnóstico se ha basado en la detección de ADN por PCR o cultivo del virus a partir de muestras como orina y saliva, de forma similar a lo que ocurre con el CMV. La detección de ADN de HVH6 y el cultivo a partir de muestras de sangre, se correlaciona más con la infección activa por el HVH6 y hace que se haya planteado la conveniencia de una monitorización secuencial mediante PCR en sangre y mejor de la fracción acelular (plasma o suero) en los pacientes transplantados.

El tipo de trasplante también influye, con incidencias medias del 48% en los transplantados de progenitores hematopoyéticos (TPH) y del 32% (0%-82%) en los de órgano sólido. En la mayoría de los casos, las infecciones postrasplante son debidas a la reactivación de la variante HVH6B, aunque también se han descrito casos de primoinfección o sobreinfección debidos a la transmisión del virus a partir del órgano del donante. Sin embargo, la asociación entre infección activa y sintomatología clínica no está totalmente establecida. En el caso del TPH, la asociación es más evidente entre la reactivación y la aparición de fiebre sin focalización y encefalitis, y también se ha descrito la asociación con leucopenia y eritema cutáneo inespecífico. La neumonitis intersticial parece ser más frecuente en el TPH y la hepatitis en el hepático. Puede aparecer encefalitis, con correlación entre la detección de ADN del HVH6 en el LCR y la presencia de síntomas de encefalopatía, lo que es más frecuente en el TPH, al igual que la supresión idiopática de la médula. Se ha descrito que la infección por el HVH6A induce la aparición de una forma más grave de supresión medular en el período postrasplante.

En cuanto a la relación entre infección activa por el HVH6 y el CMV, es posible la modificación de la historia natural de la infección por este último en los pacientes transplantados; así se ha documentado que existe correlación entre la cantidad de ADN de HVH6 en sangre y la presencia de enfermedad por CMV. Incluso algunos autores comentan que la evidencia serológica de infección por el HVH6, que en estos pacientes es de escasa frecuencia, por no ser un método adecuado en esta población, es un

buen marcador de enfermedad por CMV. Por esta razón, en la literatura se ha utilizado el término "síndrome por betaherpesvirus".

5.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico de la infección por el HHV6 (tabla 10) puede realizarse de forma directa, mediante el aislamiento del virus o la detección de expresión antigénica en las muestras, o bien, de forma indirecta, mediante la demostración de una seroconversión o y/o mediante la detección de anticuerpos IgM específicos. Sería lógico asumir también, en el caso de las infecciones por HHV6, las definiciones de infección, infección activa y enfermedad comentadas en el apartado de infecciones por CMV. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con este virus, no han sido expresamente ni universalmente admitidas para el HHV6.

5.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

El diagnóstico de laboratorio del HHV6 no presenta condicionantes particulares respecto al de otros virus. El suero y el plasma deberán separarse de la fracción celular de la sangre lo antes posible y conservarse en nevera a 2-8°C durante un máximo de 7 días, o congelados a temperatura de -20°C o inferior. La sangre para cultivo será anticoagulada (EDTA o heparina), y se recomienda procesarla rápidamente, siempre antes de 18 horas. Este mismo tipo de muestra sirve para la detección de antígenos del HHV6 en leucocitos (antigenemia), con la salvedad de que el rendimiento de la prueba baja considerablemente si el procesamiento se prolonga más allá de las 6 horas de la extracción. Para el diagnóstico molecular en sangre, no se debe utilizar heparina como anticoagulante, ya que esta sustancia inhibe algunas enzimas de polimerización (*Taq*), siendo preferible el EDTA. Las muestras de orina para cultivo no requieren conservantes especiales, sino un transporte y procesamiento rápidos, al igual que la saliva o las secreciones respiratorias. Las biopsias y piezas sólidas pueden ser remitidas en suero fisiológico estéril, nunca en formol, si bien es recomendable utilizar medios de transporte para virus [medio mínimo esencial (MEM) con suero bovino fetal o albúmina y una solución de antibióticos] cuando su tamaño lo permita.

5.2.2. Diagnóstico directo por cultivo

El HHV6 puede cultivarse a partir de muestras clínicas mediante cocultivo con linfoblastos (linfocitos de sangre de cordón umbilical) preparados con interleukina-2 y fitohemaglutinina. Los linfocitos de sangre periférica de los pacientes pueden usarse directamente para producir linfoblastos. El HHV6 puede cultivarse a partir de distintos tipos de muestras, como saliva u orina (aunque con escaso interés diagnóstico, pues es el medio habitual por el que se elimina el HHV6, sin estar relacionado con infección activa), LCR (raramente hay suficiente cantidad de virus como para poderlo cultivar), sangre (la fracción más usada son los linfocitos de sangre

periférica) y muestras de biopsia para el diagnóstico de síndromes específicos, sobre todo en pacientes transplantados.

La replicación vírica en los cultivos puede demostrarse mediante la observación de un efecto citopático (balonización, aumento de tamaño celular), y la confirmación de que dicho efecto citopático es específico del HHV6 se realiza mediante la detección de antígeno de HHV6 con los anticuerpos monoclonales disponibles en el comercio (Chemicon®). El HHV6 puede replicar también en células de línea continua como la HBS-2, la MOLT-4 e incluso replica y produce efecto citopático en las células de estirpe fibroblástica MRC-5. En estos tipos celulares es más fácil la replicación secundaria de las cepas, una vez obtenido el aislamiento primario, siendo más útiles para el mantenimiento y realización de estudios sobre HHV6 que para el aislamiento primario a partir de muestras originales. La técnica de cocultivo es lenta y, sobre todo, consume gran cantidad de tiempo en relación con la ventaja diagnóstica que aporta, por lo que está siendo sustituida por la detección de antígeno en SV.

5.2.3. Detección de antígeno en sangre (antigenemia)

Algunos autores proponen también el uso de la antigenemia o detección de antígeno precoz del HHV6 en linfocitos de sangre periférica, de modo semejante a como se realiza para el diagnóstico de la infección activa por CMV. Consiste en detectar la presencia de antígenos del HHV6 en los leucocitos extraídos de la sangre de pacientes con sospecha de infección activa por el virus, utilizando para ello tinciones inmunofluorescentes o inmunoenzimáticas, habitualmente las primeras. La antigenemia presenta una serie de ventajas teóricas, como son la sencillez de realización, la accesibilidad a muchos laboratorios, la familiaridad de la metodología y la rapidez en la obtención de resultados, puesto que es posible llevar a cabo la técnica en 4-5 horas.

Esta técnica ha demostrado ser un avance significativo en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes de riesgo, muy en particular en los transplantados e inmunodeprimidos en general. La cuantificación de los leucocitos que expresan el antígeno se correlaciona bien con la carga vírica del HHV6 presente en la sangre, lo que posibilitaría *a priori* utilizar la prueba como marcador diagnóstico, pronóstico y en el control del tratamiento. Aunque tiene muy buena correlación con la infección activa, su uso no se ha extendido por el rápido desarrollo de las técnicas de detección de ácidos nucleicos.

5.2.4. Detección de ADN del HHV6 (PCR)

Estas técnicas son rápidas, pueden utilizar muestras obtenidas por técnicas no invasoras (LCR, sangre, linfocitos de sangre periférica, plasma) y tienen alta sensibilidad, incluso en pacientes inmunodeprimidos. Hasta hace poco, sólo se disponía de técnicas cualitativas, bien de desarrollo propio o de procedencia comercial.

Tabla 10. Técnicas convencionales aplicables al diagnóstico de la infección por el HHV6 y el HHV7.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Diagnóstico serológico			
Enzimoimmunoanálisis (EIA)	Metodología familiar Disponibilidad comercial Sensibilidad Detecta IgG (no IgM en HHV7) Procesamiento en lotes.	Controlar la eficiencia de los reactivos comerciales Reacciones cruzadas entre HHV6 y HHV7	Determinación del estado inmune Soporte de diagnóstico clínico en primoinfección Poco útil en seguimiento de trasplantados Seros pareados >1,6 es diagnóstico
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Sensibilidad Detecta IgG e IgM Flexibilidad	Interpretación subjetiva Laboriosidad Reacciones cruzadas entre HHV6 y HHV7	Determinación del estado inmune Soporte de diagnóstico clínico en primoinfección Poco útil en seguimiento de trasplantados Seros pareados: aumento 4 veces o más seroconversión
Histopatología / Inmunohistoquímica	Laboratorios de Patología Especificidad	Sensibilidad insuficiente	Útil en diagnóstico de afectación órganos en trasplante
Detección de antígeno			
Antigenemia leucocitaria	Sensibilidad Especificidad Rapidez y familiaridad técnica Marcador de carga vírica	Difícil estandarización Interpretación de los resultados dependiente de experiencia propia	Diagnóstico de enfermedad en trasplantados y otros inmunodeprimidos (SIDA) Evaluaciones clínicas escasas
Métodos de cultivo			
Cultivo PBMC	Laboriosidad Lentitud	Experiencia en cultivos Sensibilidad insuficiente Tardanza de resultados	Poco usado en el diagnóstico Punto de partida para los estudios de sensibilidad a los antivíricos
Cultivo <i>shell vial</i> .	Más rápido que el convencional Sensibilidad, especificidad	Experiencia en cultivos Experiencia en la técnica	Poco usado
Detección de genoma			
PCR cualitativa (simple, anidada)	Rápida <i>Multiplex</i> (Herpesvirus) Sensible, específica	Experiencia en PCR Entre 5 – 40% positivos en LCR de sanos	Innecesaria para diagnóstico primoinfección Útil en infecciones SNC, trasplante, encefalitis
PCR cuantitativa (<i>en tiempo real</i>)	Sensibilidad, especificidad	Experiencia en la técnica. Actualmente, sólo de desarrollo <i>in house</i>	Útil en monitorización de trasplantados ¿Concordancia con infección activa por CMV en trasplantados?

Las menos sensibles eran las de detección directa (PCR simple), aumentando la sensibilidad con el uso de las técnicas anidadas. Así por ejemplo, se puede detectar ADN de HVH6 en LCR de pacientes con cuadros neurológicos, con o sin inmunodepresión. Los métodos comercializados suelen utilizar una PCR múltiple con cebadores específicos para casi todos los herpesvirus en formato de detección de amplificados mediante geles de agarosa (Radar®, Real) o tras la hibridación en placas de ELISA (Herplex®, Genómica). También se ha descrito la detección simultánea de ADN de HVH6A, HVH6B y HVH7, aunque no está comercializada. Debemos tener en cuenta que, en estos pacientes, pueden existir diferencias en cuanto a la detección de las distintas variantes del HVH6 según la muestra. Así, Nitsche *et al.* detectaron ADN de ambas variantes en el plasma, pero sólo de HVH6B en las células de sangre periférica. Sin embargo, es difícil distinguir con estos métodos una infección latente de una infección activa por el HVH6, por lo que se han desarrollado técnicas como la RT-PCR (PCR para detectar ARN del HVH6 que correlaciona mejor con infección activa) y la detección de ADN a partir de muestras acelulares como es el plasma, el suero o el LCR.

El desarrollo de técnicas de detección cuantitativa por PCR *en tiempo real*, basadas en la tecnología TaqMan® o similares, permite la amplificación y detección simultánea de los amplificados, con una sensibilidad semejante a los métodos *nested*, posibilita el diagnóstico de las infecciones asociadas al HVH6 y la monitorización de los niveles de ADN del HVH6 en los pacientes inmunodeprimidos.

5.2.5. Respuesta inmune frente al HVH6: diagnóstico serológico

Tras la primoinfección se pueden detectar anticuerpos anti-HVH6 entre los tres y los siete días postinfección. El pico máximo de producción de IgM ocurre en la segunda semana y pueden ser detectables hasta dos meses después de la infección. Los anticuerpos IgG se elevan a las dos semanas y se mantienen durante toda la vida, al menos, en un 90% de los adultos. La reactivación induce una respuesta inmune secundaria, con elevación de los niveles de anticuerpos IgG y, raramente, con aparición de anticuerpos IgM. Dichas reactivaciones se producen en los casos de infección por otros virus, como por ejemplo en pacientes con infección latente por el HVH6 que sufren una infección primaria por el HVH7, así como en los casos de inmunosupresión (transplantados), aunque en éstos no suele ir acompañada de una respuesta serológica detectable. Incluso algunos autores han señalado que, en la infección primaria por HVH6 previa seguida de una infección por el HVH7, se produce respuesta de anticuerpos IgM frente a aquel, y no frente al HVH7. En el caso contrario, es decir, infección por HVH7 previa en el tiempo a la infección por el HVH6, la respuesta de anticuerpos IgM se produce frente a ambos virus.

A pesar de la homología de una región del genoma con el CMV, no existen reacciones cruzadas entre estos virus. Los estudios de seroprevalencia aclaran poco sobre las infecciones por las variantes del HVH6. Sin embargo, parece que la mayoría de las infecciones clínicas en individuos inmunocompetentes están producidas por el HVH6B y que la variante HVH6A contribuye a las infecciones en inmunocomprometidos y a algunas manifestaciones neurológicas, excepto en algunos países africanos, donde se ha documentado que la variante HVH6A es una causa frecuente de primoinfección en niños.

El **diagnóstico serológico** del HVH6 se lleva a cabo mediante inmunofluorescencia (IF), EIA e *immunoblot*. Se debe tener en cuenta que el HVH6 y el HVH7 comparten determinantes antigénicos, por lo que hay reactividad cruzada en la respuesta de anticuerpos frente a antígenos comunes. Es importante señalar que, para incorporar los distintos métodos diagnósticos en el laboratorio, deben elegirse los antígenos que no presenten dichas reacciones. Sin embargo, en la mayoría de los reactivos diagnósticos comerciales se señala esa posibilidad (sin descartarla) y se recomienda alguno de los siguientes métodos para confirmar la significación clínica de un resultado positivo:

- la absorción con antígeno específico del HVH7 (habitualmente no incorporado al equipo comercial).
- la confirmación de que la respuesta de anticuerpos está dirigida específicamente frente al HVH6, mediante titulación de anticuerpos frente a los dos virus. Así, algunos autores señalan que, cuando se detectan anticuerpos frente a ambos virus, sólo se considera verdadero positivo (significativo) aquél que presenta un título igual o superior a 1:32.
- la detección de ADN en plasma o LCR

Así pues, se considera diagnóstico de infección la aparición de IgM específica o el aumento de cuatro veces el título de IgG (seroconversión) si se ha determinado mediante IF, o un aumento de al menos 1,6 veces si se ha hecho por EIA. La detección de títulos altos de IgG frente al HVH6 sugiere infección activa, pero requiere la confirmación mediante la detección de genoma en plasma o LCR, o el aumento del título entre el suero de la fase aguda y el de la de convalecencia.

Existen varios equipos comerciales en el mercado, tanto portaobjetos para IF, que permiten la detección de anticuerpos IgM como IgG, dependiendo del conjugado usado, como equipos de EIA para detectar IgM o IgG (Panbio®, Biotrin®). En la detección de IgG por IF se parte de una dilución inicial del suero de 1:20, aunque no se comenta la existencia de un valor que pueda considerarse como punto de corte. Para la determinación de anticuerpos IgM, se parte de una dilución inicial 1:10 en muestras de suero pretratadas para eliminar IgG, y de una dilución de 1:40 para las no tratadas. Se recomienda su tratamiento para eliminar las posibles reacciones

cruzadas posibles en el caso de enfermedades autoinmunes. Algunos equipos de EIA (Panbio®) permiten interpretar los resultados de anticuerpos IgG mediante un cálculo semicuantitativo de los niveles de anticuerpos. Así, se calculan las unidades dividiendo la absorbancia de la muestra por la media de la absorbancia del *cut-off* y el valor obtenido se multiplica por 10. Menos de 9 unidades se considera negativo, entre 9 y 11 dudoso o indeterminado y mayor de 11 positivo.

La detección de la avidéz de la IgG tiene un considerable valor para distinguir la infección reciente de la antigua, detectándose anticuerpos de baja avidéz durante la infección reciente y de alta avidéz cuando han transcurrido varias semanas de la primoinfección y tras las reactivaciones. Estas técnicas se aplican con los métodos convencionales sobre muestras de suero tratadas o no, con una solución de urea 5-8 M, calculándose el cociente porcentual entre la absorbancia de la muestra tratada dividida por la absorbancia de la muestra sin tratar. Una avidéz inferior al 30% sería indicativa de una infección reciente, mientras que si es superior al 70% sería sugestiva de una infección pasada en el tiempo.

5.3. DIAGNÓSTICO DEL HVH6 EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE PACIENTES

5.3.1. Infección primaria

La detección de ADN del HVH6 es una forma adecuada y segura de diagnosticar la infección primaria por el HVH6 en la población pediátrica. Aunque el valor predictivo en muestra de sangre total, aisladamente, es de un 57%, su positividad combinada con la ausencia de anticuerpos IgG, la detección de ADN en plasma, o una carga vírica elevada, son buenos marcadores predictivos de infección primaria. Otros autores han establecido que la detección de una carga elevada en células mononucleares de sangre periférica, o la combinación de la presencia del ADN del virus en dichas células, en ausencia de ADN en saliva, sugiere infección primaria. Sin embargo, la detección de anticuerpos IgM y o IgG, tal y como hemos comentado previamente, siempre teniendo en cuenta los problemas de las reacciones cruzadas, es el método de elección por su sencillez y rentabilidad, tanto en niños como en adultos.

5.3.2. Infección en los pacientes transplantados

La serología no se considera el método adecuado para distinguir infección activa de infección latente, ni para la monitorización en pacientes transplantados, ya que si eran seropositivos previamente al trasplante, no suele haber cambios durante la reactivación y, si eran seronegativos, la inmunosupresión hace que la mayoría de las veces no haya respuesta inmunológica detectable.

Como ya hemos comentado, se considera que la detección de ADN del HVH6 a partir de muestras de plasma o suero, se correlaciona con la infección activa por el HVH6. Por eso, algunos autores han recomendado la monitorización secuencial mediante

PCR en la fracción acelular en los pacientes transplantados. La aparición de un aumento de la carga vírica en los pacientes transplantados detectada en sangre o, mejor, en plasma, se asocia no sólo con posible infección activa por el HVH6, sino también podría ser un marcador de enfermedad por CMV. De cualquier forma, no existe un acuerdo unánime en los grupos de trasplante sobre la necesidad de llevar a cabo esta monitorización, por lo que la decisión de hacerlo dependerá de las condiciones de cada laboratorio en particular.

5.4. TRATAMIENTO Y RESISTENCIAS A LOS ANTIVIRICOS

La infección por el HVH6 en niños inmunocompetentes es frecuentemente autolimitada y no requiere de terapia antivírica específica. En pacientes inmunodeprimidos, sólo algunos casos poco frecuentes de síndromes orgánicos específicos, tales como la encefalitis, necesitarían tratamiento apropiado. Son necesarios estudios posteriores para conocer si la eficacia de la terapia preventiva o *preemptive therapy* en estos pacientes, iniciada cuando se detecte una elevación de la carga vírica, tiene el mismo valor que en el caso de las reactivaciones por CMV, o en el rechazo de injerto en pacientes transplantados. El ganciclovir, foscarnet y cidofovir son activos frente al HVH6 *in vitro*, mientras que el aciclovir no muestra actividad. El cidofovir tiene la mejor actividad inhibitoria *in vitro* y aunque el ganciclovir es activo frente a ambas variantes, la IC₅₀ es más elevada para la variante HVH6B. El foscarnet es también activo *in vitro* frente a ambas variantes.

Sin embargo, sólo la publicación de casos aislados y de series pequeñas de pacientes tratados ha demostrado la eficacia de ganciclovir y de foscarnet en el caso de síndromes organoespecíficos por HVH6 en pacientes transplantados, demostrando un descenso paralelo de los niveles de ADN de HVH6 y de CMV en los pacientes tratados con cualquiera de estos dos antivíricos. Sólo se ha documentado un caso de una cepa de HVH6A que ha permanecido en niveles detectables en un paciente inmunocomprometido a pesar del tratamiento con ganciclovir y foscarnet, sugiriendo que los estudios *in vitro* no siempre pueden predecir la respuesta *in vivo*. Además, está demostrado que, a pesar de su ausencia de *efecto in vitro*, la profilaxis con dosis elevadas de aciclovir disminuye los niveles de ADN de HVH6 postrasplante en pacientes con TPH.

En cuanto a la resistencia a los antivíricos, se han descrito mutaciones puntuales en la región UL69, homóloga de UL97 de CMV, que se asocian con la disminución de la sensibilidad *in vitro* y con la exposición prolongada al ganciclovir *in vivo*. Hasta ahora, sólo se ha publicado un caso de resistencia del HVH6 a antivíricos. Se trata de una mutante obtenida tras pases seriados *in vitro* con concentraciones crecientes de ganciclovir. Dicha mutante mostró resistencia cruzada al ganciclovir y al

cidofovir. Se han identificado dos mutaciones: una que conduce a la sustitución M318V en la región UL69 (equivalente a la mutación M460I/L de la región UL97 del CMV), y la otra en la región de la ADN polimerasa (A961V). Posteriormente se ha detectado, mediante PCR, la mutante M318V en células mononucleares de sangre periférica infectadas por HVH6, en un paciente con SIDA que había recibido tratamiento prolongado con ganciclovir. La forma de detección de esta mutante es semejante a la descrita para el CMV, pero por su escasa repercusión no se detalla metodológicamente.

6. HERPESVIRUS HUMANO 7

6.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

Fue descrito por primera vez en 1990 a partir de células mononucleares de un adulto sano y posteriormente identificado como un comensal de la saliva. El HVH7 es un virus muy relacionado con ambas variantes de HVH6 y comparte propiedades moleculares y biológicas. En cuanto a su tropismo celular *in vitro* se sabe menos que del HVH6, utilizando el CD4 como receptor celular, al igual que el VIH; sin embargo, *in vivo*, se han detectado otras células que expresan el HVH7 en pulmón, piel, glándulas mamarias, hígado, riñón, amígdalas, apéndice y cuello uterino. Se ha encontrado ADN del HVH7 en tejido cerebral de adultos sanos, pero con menor frecuencia que en el caso del HVH6.

Clínicamente, la infección primaria se asocia con la *roseola infantum* y con varios cuadros en pacientes inmunodeprimidos. La seroprevalencia del HVH7 en adultos varía entre el 60-70% (más frecuente que el HVH6) y la infección se adquiere en los primeros años de vida, generalmente tras la infección por la variante B del HVH6, desconociéndose el significado real de la reactividad cruzada entre algunos antígenos de ambos virus. Se cree que la saliva es la ruta primaria su transmisión.

El HVH7 se considera el agente etiológico de un 10% de los casos de *roseola infantum*, con síntomas similares a los producidos por la variante HVH6B y siguiendo la misma evolución patogénica: viremia, aclaramiento, latencia en linfocitos de sangre periférica y células epiteliales de las glándulas salivares y aparición de anticuerpos. Las complicaciones neurológicas, como convulsiones febriles, aparecen en la mitad de las infecciones primarias descritas. Incluso la infección primaria por HVH7 se asocia con convulsiones sin signos de exantema súbito clásico. También en raras ocasiones se le ha relacionado con manifestaciones más graves, como encefalitis y hemiplejía. Otras asociaciones patológicas son menos concluyentes.

La incidencia de la infección por HVH7 en transplantados oscila en torno al 55% en los TPH y entre el 0 al 46% en transplantados renales. Dado el elevado nivel de seropositividad pretransplante, la mayoría de las infecciones por HVH7 (al igual que el HVH6) parecen producirse por reactivación. Sin embargo, se han descrito casos de infección primaria

en receptores seronegativos a partir de donantes seropositivos, y también pueden producirse sobreinfecciones por esta vía. El pico de actividad de la infección por HVH7 está alrededor del segundo mes postransplante, lo que precede a la normal aparición de la enfermedad por CMV en dos a cuatro semanas. Parece que el riesgo relativo de enfermedad por CMV es mayor cuando coexiste infección por HVH7. Las manifestaciones clínicas directas de la infección por HVH7 en transplantados incluyen el síndrome febril inespecífico asociado a citopenias que, a veces, se ha atribuido erróneamente a reactivación del CMV ("síndrome por β -herpesvirus"). A la luz de la experiencia actual, otras asociaciones son menos concluyentes. Quizá más importantes sean sus posibles efectos indirectos. Estos pueden resultar de la activación de fenómenos inmunológicos o transactivación por otros virus, como el CMV, e incluyen, fundamentalmente, una mayor frecuencia de enfermedad por CMV, o manifestaciones más graves de la enfermedad producida por éste, y una asociación con el rechazo o disfunción del injerto.

6.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico de las infecciones por HVH7 puede realizarse de forma directa, mediante aislamiento del virus o detección de expresión antigénica en las muestras, o bien, de forma indirecta mediante la demostración de una seroconversión o mediante la detección de anticuerpos IgM específicos (tabla 10).

6.2.1. Aspectos preanalíticos: obtención y transporte de las muestras

El diagnóstico de laboratorio de la infección por HVH7 no presenta condicionantes particulares respecto al de otros patógenos víricos. El suero y el plasma deberán separarse de la fracción celular de la sangre lo antes posible y conservarse en nevera a 2-8°C durante un máximo de 7 días, o congelado a temperatura de -20°C o inferior. La sangre para cultivo será anticoagulada (EDTA o heparina), y se recomienda procesarlas rápidamente, siempre antes de 18 horas. Este mismo tipo de muestra sirve para la detección de antígenos del HVH7 en leucocitos (antigenemia), con la salvedad de que el rendimiento de la prueba baja considerablemente si el procesamiento se prolonga más allá de las 6 horas de la extracción. Para el diagnóstico molecular en sangre, no se debe utilizar heparina como anticoagulante, ya que esta sustancia inhibe algunas enzimas de polimerización (*Taq*), siendo preferible el EDTA. Las muestras de secreción respiratoria no requieren conservantes especiales, sino un transporte y procesamiento rápidos. Las biopsias y piezas sólidas pueden ser remitidas en suero fisiológico estéril, nunca en formol, si bien es recomendable utilizar medios de transporte para virus [medio mínimo esencial (MEM) con suero bovino fetal o albúmina y una solución de antibióticos] cuando su tamaño lo permita. La saliva y la orina no se consideran muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones por HVH7.

6.2.2. Métodos de cultivo

El HVH7 puede cultivarse a partir de distintas muestras, como saliva u orina (aunque con escaso interés diagnóstico, pues es el medio habitual por el que se elimina sin estar relacionado con infección activa), LCR (raramente hay suficiente cantidad de virus como para poderlo cultivar), sangre (linfocitos de sangre periférica), muestras respiratorias (lavado broncoalveolar), así como biopsias para el diagnóstico de síndromes específicos sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (transplantados).

El HVH7 se puede aislar mediante cocultivo con linfoblastos de forma similar a como se ha descrito para el HVH6. Así mismo, la replicación vírica en los cultivos puede demostrarse mediante la observación de un efecto citopático (aumento de tamaño celular), y la confirmación de que dicho efecto es específico de HVH7, que se realiza mediante la detección de antígeno del HVH7 con anticuerpos monoclonales disponibles en el comercio (Chemicon®). La técnica de cocultivo es lenta, lo que limita su aplicación práctica, por lo que puede sustituirse por la detección de antígeno en SV, de forma similar a como se realiza el diagnóstico de las infecciones por CMV. Sin embargo, hay que precisar que la experiencia con este método en el HVH7 no es muy amplia.

6.2.3. Detección de antígeno en sangre (antigenemia)

Algunos autores proponen también el uso de la antigenemia o detección de antígeno precoz de HVH7 en linfocitos de sangre periférica, de modo semejante a como se realiza para el diagnóstico de la infección activa por CMV, con las ventajas teóricas ya mencionadas para el CMV y HVH6. La cuantificación de los leucocitos que expresan el antígeno se correlaciona bien con la carga vírica del HVH7 presente en la sangre, lo que posibilitaría, *a priori*, utilizar la prueba como marcador diagnóstico, pronóstico y en el control del tratamiento. Aunque tiene muy buena correlación con la infección activa, su uso no se ha extendido por el rápido desarrollo de las técnicas de detección de ácidos nucleicos.

6.2.4. Detección de ácidos nucleicos

Estas técnicas son rápidas, se pueden utilizar muestras obtenidas por técnicas no invasoras (LCR, sangre, linfocitos de sangre periférica, plasma, suero) y tienen alta sensibilidad, incluso en pacientes inmunocomprometidos. Se han descrito una gran variedad de técnicas, siendo la PCR múltiple, que permiten detectar los distintos miembros del grupo de herpesvirus, la más útil desde el punto de vista práctico. Cuando se busque una mayor sensibilidad, hay que recurrir a PCR anidadas y con detección inmunoenzimática. Por el momento, la mayor parte de técnicas son de desarrollo propio (*in house*), no estando comercializadas.

Se detecta ADN del HVH7 en LCR de pacientes con cuadros neurológicos con o sin inmunodepresión (5%) y en el LCR y el suero de niños con exantema súbito y encefalopatía. A partir de sangre total o de la fracción celular de la misma, es difícil distinguir con estos métodos la infección latente de una infección

activa por HVH7, por lo que se ha desarrollado la RT-PCR (PCR para detectar ARN de HVH7) que correlaciona mejor con infección activa o incluso la detección de ADN a partir de muestras acelulares como es el plasma, el suero o el LCR.

El desarrollo de técnicas de detección cuantitativa de ácidos nucleicos *en tiempo real* puede aportar las ventajas ya señaladas para otros virus del grupo. Ya se ha comentado que la detección de ADN de HVH7 a partir de muestras de plasma, correlaciona más con la infección activa por este virus. La aparición de un aumento de la carga vírica en los pacientes transplantados detectada en sangre o, mejor, en plasma, podría indicarnos no sólo una infección activa por el HVH7, sino que podría ser un marcador precoz de enfermedad por CMV, aunque se necesita más experiencia de aplicación en el seguimiento sistemático de los transplantados.

La detección de ADN de HVH7 es una forma adecuada y segura de diagnosticar la infección primaria por HVH7 en la población pediátrica, aunque muy poco usada. Sin embargo, la presencia de ADN del virus en sangre completa en ausencia de anticuerpos IgG, la detección de ADN en plasma o una carga vírica elevada son buenos marcadores predictivos de infección primaria.

6.2.5. Diagnóstico indirecto o serológico

Se han descrito técnicas de IF, EIA e *immunoblot* que permiten detectar anticuerpos frente al HVH7. Los anticuerpos IgM son los que aparecen en primer lugar tras la infección primaria, y posteriormente disminuyen hasta desaparecer mientras aumentan los anticuerpos IgG. Durante las reactivaciones de la infección latente pueden aparecer de nuevo los anticuerpos IgM e incluso un ligero aumento de las IgG. Dichas reactivaciones se pueden producir en los casos de infección por otros virus, así como en los casos de inmunosupresión (transplantados), aunque en estos últimos, no suele ir acompañada de una respuesta serológica detectable. Como ya se ha señalado, merece la pena resaltar que cuando la infección por el HVH7 precede en el tiempo a la infección por HVH6, la respuesta de anticuerpos IgM se produce frente a ambos virus, mientras que no se detectan anticuerpos IgM frente al HVH7 cuando la primoinfección por HVH6 es previa a la infección por el HVH7.

Es muy importante tener presente que el HVH6 y el HVH7 comparten determinantes antigénicos, por lo que hay reactividad cruzada en la respuesta de anticuerpos frente a antígenos comunes, debiendo ser cauto a la hora de seleccionar el método serológico (y los antígenos) a emplear. En la mayoría de los reactivos diagnósticos comerciales se señala esa posibilidad y se recomienda la absorción con antígeno específico (no incorporada al *kit* comercial) o la confirmación de que la respuesta de anticuerpos está dirigida específicamente frente a uno de ellos mediante la titulación de anticuerpos frente a los dos virus, o la detección de ADN en plasma o LCR. Para algunos autores, cuando se detectan anticuerpos

frente a ambos virus, sólo se considera verdadero positivo a partir de la dilución 1:32.

Así pues, se considera diagnóstico de infección la aparición de IgM específica o el aumento de cuatro veces el título de IgG (seroconversión) si se ha determinado mediante IF, o un aumento de al menos 1,6 veces si se ha hecho por EIA. La detección de títulos altos de IgG frente al HVH7 sugiere infección activa, pero requiere la confirmación mediante la detección de genoma en plasma o LCR, o el aumento del título en sueros pareados. La detección de la avidéz de la IgG tiene un considerable valor para distinguir la infección reciente de la antigua, detectándose anticuerpos de baja avidéz durante la infección reciente y de alta avidéz cuando han transcurrido varias semanas de la primoinfección y tras las reactivaciones.

Existen varios equipos comerciales en el mercado para detectar anticuerpos frente a este virus, mediante técnicas de IF o EIA. En el ensayo de detección de IgG por IF se parte de una dilución inicial del suero de 1:20, y se establece que un título igual o mayor a 1:320 es indicativo de infección por HVH7. Para la determinación de anticuerpos IgM, se parte de una dilución inicial de 1:10 para muestras de suero pretratadas para eliminar IgG y de una dilución de 1:40 para las no tratadas. Se recomienda su pretratamiento para eliminar las posibles reacciones cruzadas debidas a enfermedades autoinmunes. No hay equipos diagnósticos comercializados para la detección de IgM por EIA.

En resumen, la serología no se considera el método adecuado para distinguir infección activa de infección latente, ni para la monitorización en pacientes transplantados, ya que si eran seropositivos previamente al trasplante, no suele haber cambios durante la reactivación y si eran seronegativos, la inmunosupresión hace que la mayoría de las veces no haya respuesta inmunológica detectable. Es, sin embargo, el método de elección para el diagnóstico de la primoinfección.

6.3. TERAPÉUTICA ANTIVIRICA DE LAS INFECCIONES POR EL HVH7

El HVH7 es menos sensible *in vitro* al ganciclovir que el HVH6 (IC₅₀ de 7 µg/ml frente 0,65 µg/ml), aunque algunos autores sugieren cierta eficacia *in vivo*. Es todavía menos sensible al aciclovir y antivirales relacionados (IC₅₀ >11 µg/ml), aunque algunos estudios, que han comparado la detección de ADN por PCR en pacientes sometidos o no a altas dosis de aciclovir, han concluido que, el número de pacientes con PCR positiva es menor en los que toman altas dosis de aciclovir. El HVH7 es más sensible al cidofovir (IC₅₀ 3 µg/ml) y foscarnet que a otros antivíricos. Este hecho puede ser reflejo de que el UL69 del HVH7 puede no tener actividad fosfotransferasa, a diferencia del producto de UL97 del CMV. No se han definido pautas aceptadas para el tratamiento de las infecciones por HVH7. Si bien está claro que no es necesario el tratar las infecciones primarias en niños, no hay consenso en

cuanto a la recomendación del tratamiento de las complicaciones neurológicas. En las encefalitis no hay estudios importantes, pero el foscarnet tendría categoría 3 de recomendación. En cuanto a los cuadros asociados a infección por HVH7 y trasplante, algunos autores sugieren también tratamiento si hay demostración de infección activa mediante: a) aislamiento del virus en sangre, LCR o tejidos, b) antigenemia positiva en sangre o médula ósea o PCR positiva en plasma o suero, LCR, o lavado broncoalveolar y c) manifestaciones clínicas asociadas a la infección por HVH7.

7. VIRUS DE EPSTEIN-BARR

7.1. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un herpesvirus ubicuo que infecta de por vida a gran parte de la población mundial; el VEB comparte con el resto de los *Herpesviridae* la facultad de generar infecciones líticas y latentes, y con los *Gammaherpesviridae* en particular, el tropismo por los linfocitos B y la capacidad de inmortalizar distintos fenotipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. El ADN del VEB codifica alrededor de 100 proteínas cuyo patrón de expresión difiere según el tipo de infección que establece. Durante las infecciones líticas, que culminan con la producción de progenie vírica, el genoma del VEB se expresa por completo siguiendo una secuencia invariable: primero los genes inmediato-precoces (alfa), después los genes precoces (beta), que codifican predominantemente proteínas enzimáticas necesarias para la replicación del ADN vírico y, finalmente, los genes tardíos (gamma), que codifican la mayoría de las proteínas estructurales del virión, varias de las cuales constituyen el denominado complejo VCA (*viral capsid antigens*). Durante las infecciones latentes, como más adelante se concreta, el genoma del VEB se expresa de modo restringido para hacer posible la pervivencia del virus en el hospedador.

El VEB se transmite habitualmente a través de la saliva, de forma infrecuente por vía parenteral, vehiculizado por la sangre y los órganos transplantados e incluso por vía sexual. Cuando se transmite por vía oral, el VEB se multiplica activamente en las células del epitelio orofaríngeo y provoca una infección latente de la mayoría de linfocitos B infectados. Éstos expresan, poco después de la penetración del virus, nueve proteínas de localización nuclear [el complejo EBNA (EBNA-LP, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C)] y las proteínas integrales de membrana LMP-1, LMP-2A y LMP-2B, así como dos ARNm de pequeño tamaño, denominados EBER 1 y 2, y varios transcritos de distinta longitud; este perfil de expresión génica se denomina programa de crecimiento o perfil de latencia tipo III y su característica fundamental es la transformación blástica de la célula infectada. En el inmuno-competente, muchos de los linfocitos B infectados, inmortalizados o no, son rápidamente eliminados por la respuesta celular inmune. En una fracción de los

linfocitos B infectados latentemente cesa la expresión de algunas de las proteínas de latencia sin causa aparente y dejan de proliferar (programa de latencia II), se organizan en centros germinales y acaban diferenciándose en linfocitos B de memoria quiescentes, los cuales contienen el genoma del VEB en forma de episomas y sólo expresan EBNA 1 (programa de latencia I) o LMP 2A (programa de latencia 0), además de EBER 1 y 2. Los linfocitos B de memoria infectados latentemente por el VEB se encuentran en permanente tránsito en el paciente normal. La capacidad del VEB de persistir en el hospedador, a pesar de la vigorosa respuesta inmunitaria que desencadena, indica que el virus ha desarrollado estrategias exitosas de elusión de dicha respuesta y de pervivencia de las células infectadas. Finalmente, el programa latente se desactiva en los linfocitos infectados, que se diferencian en células plasmáticas, bien tras unirse al antígeno que reconocen específicamente o bien a través de un estímulo inespecífico (efecto *by-stander*); el VEB reanuda el ciclo lítico, las células infectadas producen progenie vírica y el virus se elimina a través de las mucosas, preferentemente en la saliva.

El VEB es agente causal o coadyuvante de una amplia variedad de enfermedades de origen linfoide o epitelial, muchas de ellas proliferativas, cuya incidencia y naturaleza clínica varían en función del grado de competencia del sistema inmunitario del hospedador en que asientan (tabla 11). En el individuo inmunocompetente, la infección primaria por el VEB es habitualmente asintomática, sobre todo cuando se produce antes de la adolescencia. En el adulto joven y en el adolescente, el 50% de las primoinfecciones generan un síndrome mononucleósico que cursa, de modo prototípico, con fiebre, odinofagia, adenopatías laterocervicales y varias alteraciones analíticas, entre las que destacan la elevación de los niveles séricos de los enzimas hepáticos y la linfocitosis periférica con presencia de linfocitos atípicos en número variable. La mononucleosis por el VEB es comúnmente una enfermedad benigna y autolimitada: raramente, la enfermedad se complica (encefalitis, miocarditis, rotura esplénica, etc.) o deviene crónica [enfermedad crónica activa (ECAEB)]; los pacientes afectados de esta última presentan una gran morbilidad y mortalidad por disfunción hepática y medular graves y trastornos linfoproliferativos, respectivamente. Raramente, la mononucleosis infecciosa adquiere una gravedad considerable, a menudo letal, en individuos portadores de una mutación en el gen SAP del cromosoma X, lo que les hace incapaces de controlar la infección activa por el VEB. En estas condiciones, muchos de ellos acaban con trastornos linfoproliferativos (asociados al cromosoma X), si no han sucumbido antes al cuadro agudo de mononucleosis. La reactivación del VEB en el individuo inmunocompetente es frecuente, pero no se asocia a enfermedad alguna, al menos clínicamente reconocible.

El VEB ha sido vinculado, con menor o mayor

consistencia, con una amplia variedad de cánceres de origen linfoide (B sobre todo, también T y NK), epitelial y mesenquimatoso, que afectan con cierta frecuencia a los pacientes inmunodeprimidos, especialmente transplantados y enfermos de SIDA y, raramente, a los inmunocompetentes. Entre los de ontogenia linfoide, la denominada enfermedad linfoproliferativa B postransplante (ELPT) es el más frecuente. La ELPT afecta a pacientes sometidos a transplante de órganos sólidos o a transplante alogénico de precursores hematopoyéticos (TPH), e incluye una variedad de trastornos proliferativos de distinta naturaleza y gravedad clínicas, desde procesos linfoproliferativos policlonales reactivos hasta linfomas no-Hodgkin genuinos. En todos los casos, la aparición de la ELPT está ligada causalmente a la inmunodepresión celular T que experimentan los pacientes. En el paciente infectado por el VIH-1 la aparición de neoplasias de origen linfoide, predominantemente linfomas no-Hodgkin (LNH), es casi siempre tardía; éstos pueden presentarse en forma de linfomas tipo Burkitt, linfomas extranodales que preferentemente se localizan en el cerebro, o como linfomas nodales.

Se considera en la actualidad que el VEB es un cofactor relevante en la patogenia del linfoma de Burkitt endémico y de gran parte de los linfomas de Hodgkin (hasta un 65%, dependiendo del tipo histológico); existen pruebas epidemiológicas (los pacientes afectados de estas enfermedades presentan niveles muy altos de anticuerpos anti-VEB en comparación con los de quienes no las padecen) y moleculares (el ADN, varios transcritos y algunas proteínas del VEB están presentes en las células tumorales) que así lo indican.

Entre las neoplasias de origen epitelial, el VEB es un cofactor clave en el desarrollo del carcinoma nasofaríngeo, una neoplasia rara en nuestro medio pero relativamente frecuente en algunas zonas de Asia. También parece asociarse a ciertos tipos histológicos de carcinoma gástrico. El VEB produce asimismo la leucoplasia oral vellosa, una enfermedad rara que se manifiesta comúnmente en pacientes en un estadio avanzado de la infección por el VIH. Se caracteriza por la aparición de lesiones blanquecinas, indoloras, que se extienden a lo largo de los márgenes de la lengua y cuyo sustrato anatomopatológico es la presencia de células epiteliales infectadas líticamente por el VEB.

7.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: GENERALIDADES

Se dispone de un amplio espectro de pruebas de laboratorio para el diagnóstico directo e indirecto de las infecciones causadas por el VEB (tabla 12), el uso de cada una de las cuales tiene indicaciones precisas, como más adelante se concreta.

Tabla 11. Enfermedades asociadas a la infección por el VEB.

Origen	Enfermedad
Linfoide	Mononucleosis infecciosa Enfermedad crónica activa Síndrome linfoproliferativo asociado al cromosoma X Enfermedad linfoproliferativa de linfocitos B Enfermedad linfoproliferativa postransplante Linfomas nodales y extranodales del SNC en pacientes VIH+ o con inmunodeficiencias primarias Linfoma de Burkitt endémico y esporádico (VIH+) Enfermedad de Hodgkin Granulomatosis linfomatoide Linfoma T periférico Linfoma T/NK nasal (VIH+)
Epitelial	Carcinoma nasofaríngeo Adenocarcinoma indiferenciado gástrico Linfoepitelioma intestinal Leucoplasia oral vellosa
Mesenquimatoso	Leiomiosarcoma (VIH+)

Muchas de ellas se llevan a cabo de forma sistemática en los laboratorios de microbiología (determinaciones serológicas, detección del ADN vírico en líquidos biológicos, y cuantificación de la carga vírica en la sangre periférica), otras son más propias de los laboratorios de anatomía patológica (detección de ADN, ARN o proteínas en tejidos tumorales). Las pruebas indirectas (serológicas) son clave para el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa y auxiliares para el diagnóstico de la enfermedad crónica activa y de algunas neoplasias a las que está vinculado el VEB. Los métodos serológicos son, por otra parte, de elección para establecer si alguien está o no infectado por el virus, información de notable interés en el marco del trasplante. Las pruebas directas (PCR, NASBA, *southern blot*, *dot blot*, hibridación *in situ* y procedimientos inmunohistoquímicos), son determinantes para el diagnóstico de los tumores asociados al VEB y, en concreto, las versiones cuantitativas de la PCR son insustituibles en el seguimiento de la infección por el VEB en el paciente inmunodeprimido y en el control postratamiento de ciertas neoplasias asociadas a este virus. Los métodos directos son igualmente relevantes para el diagnóstico de la leucoplasia oral vellosa y de la enfermedad crónica activa grave asociada al VEB. De todos los procedimientos a nuestro alcance, el cultivo del virus es el que encuentra menor aplicación en la sistemática diaria, por lo que no será tratado en la presente revisión.

7.3. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA NO TUMORAL EN EL PACIENTE INMUNOCOMPETENTE

7.3.1. Diagnóstico de la mononucleosis infecciosa

El diagnóstico de la mononucleosis infecciosa (MI) causada por el VEB en el paciente

inmunocompetente es serológico en primera instancia: se trata de acreditar la existencia de una infección primaria mediante la detección en el suero de una especie particular de anticuerpos heterófilos cuya aparición es común en el transcurso de la enfermedad aguda (no aparecen en las reactivaciones), o de demostrar la presencia de anticuerpos específicos frente al VEB, de acuerdo con una secuencia de actuación que se propone más adelante. En la mayoría de los casos basta con una única muestra de suero obtenida durante la fase aguda de la enfermedad; en ocasiones, sin embargo, se precisa una segunda muestra tomada en la fase de convalecencia para demostrar seroconversión.

Los anticuerpos heterófilos que se detectan en la MI causada por el VEB tienen un perfil característico: son mayoritariamente de la clase IgM, reconocen antígenos localizados en la membrana de los hematíes de varios mamíferos, son adsorbidos por un extracto de estroma de eritrocitos bovinos, pero no por un extracto de riñón de cobaya -a diferencia de otros anticuerpos heterófilos, como los de Forssman (prueba clásica de Paul-Bunnell y Davidsohn)- y no reaccionan con proteínas del VEB.

Aparecen en un 80-90% de los pacientes con MI mayores de 10 años, son objetivables en la fase aguda de la enfermedad, rara vez persisten más de dos meses (de hecho, son un marcador excelente de la fase aguda), y no suelen aparecer en los síndromes mononucleósicos de otra causa. En los pacientes menores de 10 años, sin embargo, se detectan en menos de un 50% de los casos.

Tabla 12. Métodos diagnósticos de la infección por el VEB^a.

Métodos	Muestras	Indicaciones
Directos		
Cultivo	Sangre periférica, saliva	Ninguna
Detección ADN/ARN		
PCR (cualitativa, semi y cuantitativa)	Sangre, linfocitos, plasma, suero, LCR, líquidos biológicos, tejidos	MI, encefalitis, seguimiento ELPT
NASBA	Tejidos	Tumores
Hibridación <i>in situ</i>	Tejidos	Tumores
<i>Southern blot</i> (clonalidad)	Tejidos	Tumores
<i>Dot blot</i>	Tejidos	Tumores
Detección de proteínas	Tejidos	Tumores, leucoplasia vellosa
Indirectos		
IF (IFI, IFAC)	Suero	MI, ECAEB, tumores
EIA	Suero	MI, tumores
<i>Western blot</i>	Suero	MI
Avidez IgG	Suero	MI (confirmación)
Ac. heterófilos (aglutinación, EIA, inmunocromatografía)	Suero	MI

^aAbreviaturas: ELPT: enfermedad linfoproliferativa post-transplante; IF: inmunofluorescencia; IFI: inmunofluorescencia indirecta; IFAC: inmunofluorescencia anticomplementaria; MI: mononucleosis infecciosa; ECAEB: enfermedad crónica activa; EIA: enzimoimmunoensayo.

Son muchas las pruebas comercializadas que detectan anticuerpos heterófilos: versiones del método clásico de Paul-Bunnell (Sanofi Diagnostics), técnicas de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno purificado a partir de membranas de eritrocitos bovinos u ovinos (Monolaterx®, Biokit®, Avitex-IM®, Omega Diagnostics; Mono-Lex®, Trinity Laboratories; Dry spot IM kit®, Oxoid), pruebas de aglutinación cuyo sustrato son hematíes equinos (IM Absortion kit®, Microgen; Monospot®, Meridian; Monoslide®, bioMérieux), enzimoimmunoensayos (ImmunoCard-mono®, Meridian) y técnicas inmunocromatográficas (Card-OS Mono-Paci®, Biotech; BIFA-MI-Tira-Bifa Kit®, Sumilab). No hay grandes diferencias de sensibilidad (varía entre un 80-95%, dependiendo de la edad del grupo de población en que se practica la prueba) ni de especificidad (próxima al 100%) entre las distintas pruebas disponibles en el mercado. Los falsos positivos (positivos en ausencia de enfermedad aguda por el VEB) no superan el 2-3% de los casos; se observan en el marco de algunas enfermedades autoinmunes, la infección primaria sintomática por el VIH y en unos pocos casos de síndrome mononucleósico causado por el CMV; en la mayoría de casos, se trata de anticuerpos heterófilos genuinos residuales.

La determinación de anticuerpos de las subclases IgG e IgM y, ocasionalmente, IgA, frente a los complejos antigénicos VCA, EA y EBNA (integrado por proteínas reguladoras multifuncionales no estructurales de localización nuclear) resultan habitualmente clave en el diagnóstico de la mononucleosis por el VEB. Los anticuerpos IgM frente al VCA suelen ser los primeros en detectarse. Posteriormente, son objetivables los anticuerpos IgG anti EA-D (éstos no en todos los casos) y los

anticuerpos IgG anti-VCA; no es infrecuente que la aparición de estos últimos sea simultánea a la de la IgM anti-VCA; los anticuerpos IgG anti-EBNA-1 tardan entre dos y seis meses en ser detectables en el suero y suelen persistir de por vida; en cambio, los anticuerpos anti-EBNA-2 (y otras especificidades EBNA) pueden estar presentes en el suero durante la fase aguda de la enfermedad. Los anticuerpos IgG anti-EA-D y las IgM anti-VCA suelen desaparecer en la fase de convalecencia (rara vez persisten más de 6 meses), mientras que las IgG anti-VCA son detectables de por vida.

La detección de anticuerpos anti-VEB se lleva a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) o anticomplementaria (IFAC), ELISA o *western blot* (WB). Las pruebas de detección de anticuerpos IgM e IgG anti-VCA (IFI), IgG anti-EA (IFI), IgG anti-EBNA (IFI) y anticuerpos totales anti-EBNA (IFAC) se han comercializado por distintas empresas (Gull, Serifluor-Institute Virion, Vircell, etc.); para la detección de los anticuerpos anti-VCA se emplean células productoras de viriones (P3HR-1 o B-95) estimuladas con TPA (éster del formol). Para la determinación de los anticuerpos anti-EA-D (patrón difuso del complejo antigénico precoz) se utilizan células Raji (no productoras de viriones) estimuladas con butirato sódico y, para la de anticuerpos anti-EBNA, células Raji sin estimular. Cuando la detección de anticuerpos anti-EBNA se lleva a cabo mediante IFI se detectan tanto anticuerpos contra EBNA-1 cuanto frente a otras especificidades de EBNA, sobre todo EBNA-2. Si se lleva a cabo mediante IFAC se detectan anticuerpos totales anti-EBNA, preferentemente frente a EBNA-1. No hay diferencias sustanciales de sensibilidad y especificidad entre las distintas pruebas aludidas.

Existe una amplia variedad de sistemas

comerciales EIA que difieren esencialmente en el sustrato antigénico que emplean: lisados de células infectadas por el VEB (Immunowell®, GeneBio), proteínas víricas purificadas mediante cromatografía de afinidad (gp 125 del complejo VCA, ELISA VCA de Gull) o proteínas recombinantes/péptidos sintéticos (p72 EBNA-1, ELISA-EBNA de Gull, Immunowell-EBNA de GeneBio, ELISA-EBNA de Biotest Diagnostics; p18 VCA, ELISA Wampole, Captia-VCA de Centocor, Vironostika EBV-VCA de Organon Teknika; p54 de EA, ELISA-EA de Biotest). La mayoría detecta de forma individualizada las distintas especificidades de anticuerpos anti-VEB; unos pocos, sin embargo, detectan simultáneamente anticuerpos frente a diversas proteínas pertenecientes a varios complejos antigénicos del VEB (Enzygnost anti-EBV, Behring). La mayor parte de los que detectan IgM son EIA indirectos, por lo que es necesario tratar previamente los sueros para evitar la interferencia del factor reumatoide; sólo unos pocos emplean métodos EIA de inmunocaptura (Vironostika VCA IgM, Organon Teknika; Captia Select VCA-M, Centocor).

En general, los EIA ofrecen una mayor sensibilidad que las IF, pero son menos específicos. Aquellos que utilizan extractos celulares como antígenos son más sensibles que los que emplean proteínas purificadas a partir de cultivos infectados, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, aunque son menos específicos. Los EIA que detectan anticuerpos anti-EBNA (proteínas recombinantes p72 o p58, que corresponden a EBNA-1) son relativamente homogéneos en cuanto a su sensibilidad (inferior, no obstante, a la IFAC) y especificidad; existe, de hecho, una correlación aceptable entre la IFAC y estos EIA. Los que detectan anticuerpos IgG anti-VCA se correlacionan aceptablemente con la IFI aunque, en general, son menos sensibles que ésta, mientras que los que detectan anticuerpos IgG frente al EA-D y, particularmente, los que determinan IgM anti-VCA ofrecen, en general, una eficacia diagnóstica muy inferior a lo deseable.

Se encuentran también disponibles en el mercado *western blots* (WB) para la detección de anticuerpos anti-VEB, entre los que se incluye un WB clásico, cuyo sustrato antigénico es un lisado de células linfoblastoides transformadas por el VEB y varios *blots* con antígenos recombinantes o peptídicos dispuestos en línea (Virotech); las proteínas habitualmente presentes en estos *blots* son: p72 (EBNA-1), p18 (VCA) –los anticuerpos frente a esta proteína son un marcador de infección pasada, puesto que aparecen muy tardíamente después de la infección primaria-, p23 (VCA), p54 (EA) y p138 (EA); los segundos son, en general, preferibles a los primeros por su mayor especificidad. Aunque el WB ha sido propuesto como prueba confirmatoria, incluso postulado por algunos como procedimiento de referencia, lo cierto es que no mejora en gran medida la aportación diagnóstica de las pruebas de EIA e IF; proporciona comodidad, eso sí, puesto que

se pueden analizar distintas especificidades antígeno-anticuerpo de forma simultánea.

Con base en lo anterior, ante la presencia de un cuadro clínico de MI a cualquier edad, se recomienda practicar, en primera instancia, una prueba de anticuerpos heterófilos; si ésta resulta positiva, consideramos probada la implicación del VEB. Si resulta negativa y la sospecha de MI por el VEB es firme, debemos analizar los anticuerpos IgG anti-VCA, IgM anti-VCA y de IgG anti-EBNA-1, lo que conducirá al diagnóstico en más de un 90% de los casos (tabla 13). La determinación de anticuerpos anti-EA no aporta información útil para el diagnóstico de la MI. El patrón serológico más común en esta situación es: IgG anti-VCA (+/-), IgM anti-VCA (+) e IgG anti-EBNA-1 (-). Es necesario remarcar que no se debe diagnosticar una MI con la única base de un resultado positivo de una prueba de IgM anti-VCA, por cuanto puede tratarse de un falso positivo, ya se utilice la IFI o el ELISA. En esos casos, conviene solicitar una segunda muestra de suero obtenida durante la convalecencia con objeto de demostrar una seroconversión.

El análisis de los marcadores serológicos mencionados no siempre permite establecer con seguridad la vinculación del VEB con la enfermedad en curso. Los anticuerpos IgM anti-VCA son indetectables en un 10% de los niños con infección primaria por el VEB, su aparición puede demorarse en niños y adultos y su presencia en el suero puede persistir varios meses después de contraer la infección; es posible, incluso, detectar anticuerpos anti-EBNA-1 en un pequeño porcentaje de los enfermos en el momento en que reciben atención médica; la desaparición precoz de los anticuerpos anti-EBNA-1 también puede complicar notablemente la interpretación de la serología del VEB (tabla 13). En estas situaciones debe recurrirse a dos pruebas auxiliares cuyo valor diagnóstico ha sido probado: la determinación de la avidez de los anticuerpos IgG anti-VCA, si son detectables, y la determinación cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de ADN vírico en el suero mediante PCR competitiva o *en tiempo real*, preferiblemente esta última. La presencia de anticuerpos IgG anti-VCA de baja avidez (índice de avidez $\leq 50\%$) se asocia a la existencia de una infección primaria reciente; en las infecciones pasadas, el índice de avidez de las IgG anti-VCA supera el 80%. Por otra parte, la detección del ADN del VEB en el suero apoya el diagnóstico de infección primaria en el inmunocompetente, puesto que no se detecta ni en infecciones pasadas ni en reactivaciones. La presencia del ADN vírico libre en el suero es, sin embargo, efímera. Durante las primeras dos semanas después del inicio de los síntomas la probabilidad de detectar ADN vírico en el suero es mayor del 90% según algunas series publicadas; ésta disminuye considerablemente con el paso del tiempo.

Tabla 13. Infección por el VEB: perfiles serológicos prototípicos.

Anticuerpos heterófilos	IgG VCA	IgM VCA	IgG EBNA1	Interpretación
+/-	+	+	+	Infección aguda
+/-	-	+	-	Infección aguda ^a
+/-	+	-	-	Falso positivo
-	+	-	-	Infección aguda ^b
+/-	+	+	+	Infección pasada
-	+	+	+	Infección aguda ^b
-	-	-	-	Infección pasada
-	-	-	-	No infectado
-	-	-	+	Patrón imposible

^aConviene solicitar una muestra durante la fase de convalecencia para demostrar seroconversión IgG anti-VCA o realizar PCR (ADN vírico) en el suero.

^bAnalizar la avidéz de IgG anti-VCA o determinar ADN vírico en el suero mediante PCR.

Parece existir, además, una relación directa entre la gravedad de las manifestaciones clínicas presentes y la magnitud de la carga vírica en la sangre periférica.

Son muchas las complicaciones posibles de la mononucleosis infecciosa; pueden afectar virtualmente a cualquier órgano o tejido. Las que implican a la médula ósea, hígado, pulmón y SNC son las más graves. La detección del ADN del VEB en el LCR mediante PCR es potencialmente útil en el diagnóstico de las encefalitis. Hay varias PCR cualitativas comercializadas (algunas con formato *multiplex* que permiten la detección simultánea de otros herpesvirus, algunas con patente nacional (Real, QCA) que resultan útiles para este propósito, si bien lo son más las PCR cuantitativas. La eficacia diagnóstica de la PCR en las otras complicaciones mencionadas no está definida con precisión.

7.3.2. Diagnóstico de la enfermedad crónica activa

La constatación de títulos elevados (determinados mediante IF) de IgG anti-VCA (>1:5.120) y anti-EA (>1:612), la persistencia de IgA frente a esos mismos complejos antigénicos y la ausencia de anticuerpos anti-EBNA-1 sustenta el diagnóstico clínico de la ECAEB. La demostración de la presencia del ADN vírico mediante PCR en tejidos afectados durante el transcurso de la enfermedad es también criterio de apoyo para el diagnóstico de la ECAEB grave.

7.4. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA NO TUMORAL EN EL PACIENTE INMUNODEPRIMIDO

7.4.1. Diagnóstico de la infección primaria

La infección primaria por el VEB en el paciente inmunodeprimido tiene como consecuencia habitual un cuadro de MI tendente a complicarse y que, a menudo, particularmente en niños traNsplantados, deviene en una enfermedad linfoproliferativa. La serología no es del todo fiable en el diagnóstico de la MI en estos pacientes, por varias razones: las respuestas de anticuerpos frente a los distintos complejos antigénicos del VEB se demoran o se extinguen rápidamente, la cinética de maduración de los anticuerpos IgG es frecuentemente anómala en

relación con la que se objetiva en el paciente inmunocompetente y el suero de los pacientes tratados con gammaglobulinas inespecíficas contiene comúnmente anticuerpos anti-VEB transferidos pasivamente. Todo lo anterior dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. En estos pacientes es preferible, por lo tanto, el uso de la PCR para detectar ADN vírico en el suero.

7.4.2. Diagnóstico de la leucoplasia oral vellosa

Esta enfermedad se diagnostica mediante la detección inmunohistoquímica de la proteína BZLF-1 (ZEBRA) en biopsias de las lesiones. El anticuerpo monoclonal más utilizado es el proveniente del clon BZ-1 (Dako). Sólo la detección de la proteína en el núcleo celular permite el diagnóstico de certeza.

7.5. DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA TUMORAL VINCULADA CON EL VEB

La vinculación del VEB en la etiopatogenia de neoplasias se ha sustentado clásicamente en la constatación de niveles séricos elevados de anticuerpos anti-VEB en los pacientes enfermos en relación con los de la población sana, y en la demostración de la presencia de ADN, ARN o de proteínas víricas en el tejido tumoral mediante métodos inmunohistoquímicos o moleculares (tabla 14). Los métodos directos mencionados son, hoy en día, de elección para probar la implicación del VEB y los serológicos desempeñan un papel secundario, de apoyo. En cuanto a estos últimos, lo más destacable es lo siguiente: (i) la relación directa existente entre los niveles séricos de IgA anti-VCA, EA y EBNA y la probabilidad de desarrollar o padecer un carcinoma nasofaríngeo; la elevación significativa de los niveles séricos de estos anticuerpos precede la aparición del tumor en 1-5 años; se ha comprobado, igualmente, que la respuesta del tumor a la quimioterapia se sigue de un descenso significativo de esos mismos niveles; (ii) en el linfoma de Burkitt endémico, los niveles séricos de IgG anti EA-R (patrón restringido del complejo EA-patrón de fluorescencia-) proporcionan información diagnóstica y pronóstica; (iii) los niveles de IgG anti-EA permiten inferir el riesgo de desarrollar ELPT; su medición podría ser

de interés, igualmente, para evaluar el grado de respuesta al tratamiento.

Para la detección de ADN, ARN o proteínas víricas son igualmente válidas las piezas quirúrgicas frescas (mantenidas en suero salino estéril o solución de Hanks, por ejemplo), congeladas o fijadas en formol y embebidas en parafina, y los aspirados celulares. La detección del producto vírico puede hacerse directamente en cortes finos de la muestra o a partir de extractos homogeneizados del tejido obtenido. En cualquier caso la muestra ha de tomarse asépticamente, transportarse en un recipiente estéril y conservarse en frío si no ha de procesarse de inmediato. Por otra parte el LCR es una buena muestra para el diagnóstico de los linfomas del SNC en el paciente con SIDA: la presencia del ADN vírico detectado mediante PCR en el LCR se correlaciona significativamente con la presencia de la enfermedad tumoral.

7.5.1. Detección de proteínas del VEB en el tejido tumoral

La detección de proteínas del VEB, preferentemente EBNA-1 y LMP-1, se lleva a cabo mediante (i) técnicas de inmunohistoquímica, lo que permite filiar la naturaleza de las células que expresan la proteína vírica cuando se emplean simultáneamente anticuerpos frente a marcadores celulares y microscopía confocal, o mediante (ii) *western-blot*, en ambos casos utilizando como reactivos anticuerpos monoclonales frente a las proteínas víricas. La detección de LMP-1 mediante el uso del anticuerpo monoclonal CS1-4 (Dako) y S12 (Organon) resulta particularmente ventajosa. La detección de LMP-1 es superponible en sensibilidad y especificidad a la detección de EBER mediante hibridación *in situ* (más adelante se hace referencia a este procedimiento) en el diagnóstico de la ELPT y el linfoma de Hodgkin (se tiñen las células de Reed-Sternberg). El patrón de IF que genera LMP-1 es granular y se distribuye en el citoplasma y la membrana celulares.

7.5.2. Detección de ADN y ARNm del VEB en el tejido tumoral

La detección de ADN vírico mediante *southern blot* (su uso está particularmente indicado para averiguar la clonalidad del tumor) o PCR a partir de ADN total extraído de la muestra es factible, pero la eventualidad de que el ADN hallado provenga de células infectadas pero no transformadas presentes en el material analizado, posible dada la amplia distribución del VEB en el organismo, minimiza el valor diagnóstico de estas pruebas. Son preferibles la detección del ADN mediante PCR *in situ* y, muy especialmente, la detección de ARNm EBER 1 y 2 mediante hibridación *in situ*. EBER 1 y 2 se expresan abundantemente en todos los tumores asociados al VEB (10^6 copias/célula, aproximadamente), hecho que facilita enormemente su detección. Se han descrito numerosos protocolos de hibridación para la detección de EBER, que emplean sondas de ADN o ARN (ribosondas) marcadas con biotina, digoxigenina o fluoresceína y que se encuentran disponibles en el mercado (Boehringer-Manheim,

Dako, Biogenex, etc.). El análisis del ARNm EBER puede llevarse a cabo a partir de preparaciones embebidas en parafina o de aspirados citológicos. Las muestras son tratadas con xilol, si contienen parafina, después con proteinasa K y detergentes, éstos para facilitar la penetración intracelular de la sonda y, posteriormente, son incubadas con la sonda elegida. Las muestras son finalmente examinadas al microscopio: EBER 1 y 2 se acumulan en el núcleo celular. Este procedimiento es de referencia para demostrar la implicación del VEB en todos los tumores con que está vinculado; esta prueba puede ser falsamente negativa como consecuencia de la degradación del ARN de la muestra; es necesario descartar esta posibilidad, para lo cual se incluye en la reacción un control de hibridación (sonda poliT que hibrida con la secuencia poliA del ARNm celular). La detección de ARNm que codifica las distintas proteínas de latencia del VEB en tejido tumoral mediante PCR-RT y NASBA es una posibilidad técnica en estudio que, previsiblemente, ganará adeptos a medida que se perfilen las condiciones óptimas de uso.

7.5.3. Análisis de la carga vírica del VEB en la sangre periférica

Se dispone de datos concluyentes que prueban una relación directa entre la magnitud de la carga vírica del VEB en la sangre periférica y el riesgo de desarrollar algunos trastornos linfoproliferativos y el carcinoma nasofaríngeo. Este vínculo es particularmente manifiesto en el marco de la ELPT y el linfoma nodal o extranodal en el paciente con SIDA, sobre todo cuando concurren en el paciente varios factores predisponentes (determinado tipo de inmunosupresión, infección primaria por el VEB, etc.). Conviene subrayar, sin embargo, que la presencia de cargas periféricas altas no asegura el desarrollo ulterior de enfermedad; ni la de cargas bajas lo hace imposible.

Se ha evaluado una amplia variedad de procedimientos para la cuantificación de la carga vírica periférica: técnicas de PCR semicuantitativas (algunas comercializadas-BioSource), cuantitativas competitivas y cuantitativas *en tiempo real* (comercializada recientemente por Abbott), que amplifican zonas conservadas de distintos ORF, casi siempre EBNA-1; no obstante, la mayoría de estas PCR son de diseño propio, hecho que ha dificultado el análisis comparativo de los datos obtenidos por los diferentes laboratorios y, consecuentemente, ha imposibilitado consensuar un umbral de alerta (número de copias a partir del cual el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta significativamente), o precisar a partir de qué magnitud de cargas la presencia de la enfermedad es un hecho.

Tabla 14. Expresión *in vivo* de proteínas y ARNm en trastornos proliferativos vinculados frecuentemente con el VEB.

Marcador ^b	Enfermedad ^a					
	MI	LB	EH	ELPB	CNF	CG
EBNA-1	+	+	+	+	+	+
EBNA-2	+	-	-	+	-	-
EBNA-3A	+	-	-	+	-	-
EBNA-3B	+	-	-	+	-	-
EBNA-3C	+	-	-	+	-	-
EBNA-LP	+	-	-	+	-	-
LMP-1	+	-	+	+	+/-	?
LMP-2	+	-	+	+	+	+
EBER 1, 2	+	+	+	+	+	+

^aAbreviaturas. MI: mononucleosis infecciosa; LB: linfoma de Burkitt; EH: enfermedad de Hodgkin; ELPB: enfermedad linfoproliferativa de linfocitos B; CNF: carcinoma nasofaríngeo; CG: carcinoma gástrico.

^bAbreviaturas de marcadores: ver texto.

De todos los formatos PCR evaluados, los basados en la tecnología *en tiempo real* son los de mayor futuro; se trata de procedimientos sensibles, reproducibles y capaces de cuantificar con precisión en un amplio intervalo de concentraciones. Tanto la sangre total como el plasma y las células mononucleares de la sangre periférica son muestras adecuadas para la monitorización de la carga vírica del VEB, especialmente las dos primeras.

Es previsible que, en un futuro cercano, la monitorización de la carga vírica del VEB en estos pacientes mediante PCR cuantitativa *en tiempo real* podrá guiar la decisión de prescribir o no un tratamiento anticipado (inmunomoduladores y antivíricos) y evaluar el grado de respuesta al tratamiento.

8. HERPESVIRUS HUMANO 8

8.1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El ADN del herpesvirus humano tipo 8 (HVH8) fue detectado en 1994 a partir de un tejido de sarcoma de Kaposi (SK) procedente de un paciente con sida. El HVH8 presenta la morfología típica de los herpesvirus; tanto es así que, antes de su descripción, se observaron partículas víricas de morfología de herpesvirus en el tejido de SK que fueron identificadas, de forma errónea, como CMV. El análisis filogenético ha demostrado que el HVH8 presenta un elevado grado de homología con otros herpesvirus linfotrópicos humanos [virus de Epstein Barr (VEB)]. Como en este último virus, el genoma de HVH8 se dispone en forma circular durante la fase de latencia, pero el ADN activo durante el ciclo lítico es lineal.

El genoma del HVH8 codifica proteínas que presentan homología con oncoproteínas humanas, así como otras proteínas reguladoras, con función importante en la patogenia de la infección por el HVH8. Una de ellas, el antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA-2) puede interaccionar con la p53 e inhibir la actividad transcripcional mediada por dicha proteína antitumoral. Estas y otras características virológicas explican su papel oncogénico en el desarrollo del SK.

Se le considera responsable de cuadros similares a la mononucleosis infecciosa, como consecuencia de infección primaria, y existe una fuerte evidencia de asociación con el SK, la enfermedad de Castleman, y del PEL, o linfoma de cavidades de células B. El grado de evidencia es menor en las lesiones no-SK en pacientes sometidos a trasplante, en la enfermedad de Bowen, en el pénfigo vulgar asociado o no a la infección por el VIH, y en el linfoma MALT bilateral de la glándula parotídea. Otras asociaciones con las que se le ha relacionado son menos concluyentes.

Parece claro que la presencia del HVH8 es el factor primario y necesario para el desarrollo del SK. Además, la inmunodepresión del paciente es un cofactor importante en la expresión clínica del SK en algunos pacientes infectados por el HVH8. Así, el período de incubación, desde la primoinfección hasta el desarrollo de la enfermedad, depende más de la situación del sistema inmune que de la duración de la infección, de ahí que, tanto el SK, como el PEL, respondan de forma eficaz a la terapia antirretrovírica y que el SK postrasplante se resuelva cuando cesan los regímenes inmunosupresores. Se ha detectado ADN del HVH8 en todos los tipos de SK: clásico, endémico y asociado al SIDA, y mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha observado su localización en las células del endotelio vascular y en las células perivasculares en forma de huso de las lesiones de SK. Dicha asociación está avalada no sólo por estudios moleculares, sino también por estudios seroepidemiológicos.

Se han identificado cinco variantes (de la A a la E), con distribución geográfica diferente (grupos A y C en Europa y Norteamérica). Se ha sugerido la posibilidad de una relación entre el tipo de variante y la expresión clínica pero, por el momento, dicha relación no se ha aclarado convincentemente.

8.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Al no haberse aislado en cultivo, el diagnóstico de las infecciones por HVH8 puede realizarse de forma directa, mediante la detección de ADN y de antígenos específicos en los distintos tejidos o fluidos

implicados, así como mediante la demostración de una respuesta serológica específica (tabla 15).

8.2.1. Diagnóstico directo: muestras y métodos

Las muestras para la detección de genoma del HVH8 mediante PCR son variadas (tejido de SK, tejido linfóide, plasma, células mononucleares de sangre periférica, y suero). Puede detectarse también en la saliva y el semen, pero su implicación en estos casos, es de tipo epidemiológico, más que de una clara asociación clínica, es decir, no serían las muestras más adecuadas para el diagnóstico, aunque sí demostrarían que el paciente está infectado por HVH8 y lo elimina por las vías habituales.

En el caso de la sangre debe enviarse sangre total en un tubo con anticoagulante (EDTA o PPT) para separar ambas fases (plasma y células mononucleares) tras una centrifugación adecuada. Es conveniente que no pasen más de 12-24 horas entre la extracción y la separación. Una vez separado, tanto el plasma como el suero pueden usarse de forma inmediata, o conservarse en nevera durante uno o dos días y, preferiblemente, congelar si se demora su utilización.

Las muestras tisulares pueden enviarse al laboratorio de microbiología en fresco, es decir, tras su extracción, se introducen en un frasco estéril y se envían sin conservantes. Puede ser útil, si van a tardar algunas horas en llegar al laboratorio, añadir unas gotas de agua destilada o suero fisiológico para evitar la desecación. Si la muestra obtenida es pequeña y no puede enviarse muestra a los dos laboratorios (anatomía patológica y microbiología) puede llevarse al de patología para que, tras la parafinación, se envíen de cinco a diez cortes de 10 µm al de microbiología donde se procederá a la desaparafinación de los mismos mediante tratamiento con xilol y a la extracción de ácidos nucleicos según el método con el que el centro tenga experiencia, siendo recomendable alguna de las variaciones del método de Boom (sílicagel) o la purificación en columnas y la posterior detección de ADN mediante PCR.

Se pueden usar varios métodos para el diagnóstico directo de las infecciones por el HVH8, con diferencias en sensibilidad, sencillez de realización y automatización. Los métodos más usados son la detección de ADN mediante PCR clásica, PCR *en tiempo real* o, en menor medida, hibridación *in situ*, así como la detección de expresión antigénica mediante inmunohistoquímica.

8.2.2. Detección mediante PCR

La mayoría de los autores recomiendan la detección de ADN mediante PCR (ya sea la PCR clásica o de amplificación y detección simultánea *-tiempo real-*), encontrándose en el 95% de las lesiones de SK asociado a SIDA, clásico y endémico y entre el 30 y el 60% de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con SK, fundamentalmente durante la primoinfección y la fase de inmunodepresión máxima. También se detecta en las biopsias de pacientes con enfermedad múltiple de

Castleman, así como en el tejido linfóide de pacientes con PEL, y en el semen, plasma y en sangre periférica. Pueden usarse como molde secuencias de varias regiones del genoma vírico, tanto de genes latentes (ORF-73), como de genes líticos (ORF-65).

Existe una clara correlación entre la cantidad de ADN (medida por PCR) en las muestras cutáneas y la gravedad y el estadio de la enfermedad. Así, los pacientes con enfermedad localizada presentan menor cantidad de ADN en las muestras de tejido que los pacientes con enfermedad diseminada. El desarrollo de la PCR *en tiempo real* permite dicha cuantificación, utilizando como estándar células con una cantidad conocida de copias de ADN de HVH8 por célula.

La amplificación *en tiempo real*, a partir de células mononucleares sanguíneas, tiene valor pronóstico en los pacientes trasplantados así como en los VIH, y puede usarse en la monitorización de estos pacientes para conocer el riesgo de aparición de las enfermedades relacionadas con la infección por HVH8. La cuantificación en el plasma es menos sensible, ya que sólo es positiva en los pacientes con replicación vírica importante. Sin embargo, su valor predictivo positivo es muy elevado.

Polstra *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio comparativo entre suero y plasma, usando PCR *en tiempo real*. Según estos autores, los porcentajes son muy semejantes entre suero y plasma (en un 41% de los pacientes se detectó en ambas muestras, en 7 pacientes sólo en plasma y en 8 sólo en suero), con niveles de carga similares. Sin embargo, según estos autores, el suero presentaba menor porcentaje de inhibidores que el plasma, aunque no especifican el anticoagulante usado para la obtención del plasma, por lo que no hay resultados concluyentes a este respecto.

8.2.3. Otros métodos de diagnóstico directo

También la hibridación *in situ* puede usarse para localizar células específicas que alberguen el HVH8 en tejidos de SK, aunque debido a su baja sensibilidad y a la complejidad de realización, está siendo reemplazada por la inmunohistoquímica en los laboratorios de patología. Mediante esta última técnica, se detecta la expresión proteica del HVH8 en las células fusiformes perivasculares y en algunas células epiteliales del SK, en las células tumorales de PEL, en los linfomas que afectan a tejido sólido asociado al HVH8 y en las células de la zona del manto en la enfermedad múltiple de Castleman. En la actualidad, el diagnóstico mediante la detección de antígenos víricos (de expresión durante el ciclo lítico o durante la latencia) en biopsias parafinadas con anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente es de sencilla realización en los laboratorios de patología y permite confirmar el diagnóstico de SK.

Tabla 15. Técnicas convencionales aplicables al diagnóstico de la infección por el HHV8.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Diagnóstico serológico Enzimoinmunoanálisis	Metodología familiar	Poco flexible Controlar eficacia reactivos Sólo comercializado para IgG.	Determinación del estado inmune. Soporte de diagnóstico clínico en SK, Castleman, PEL Útil en seguimiento de transplantados e infectados por el VIH
<ul style="list-style-type: none"> • Ag latente (ORF 73) <i>ABI Inc</i> • Ag fase lítica <i>ABI Inc (virión células KS-1)</i> <i>Biotrin (péptidos líticos)</i> <i>(OR -65 y K8.1)</i> 	No reacción cruzada con VEB	Reacción cruzada con VEB y VIH	
	Sensible	Sin reacción cruzada con VEB ni VIH	
	Sensible Positivo: cálculo de valor índice		
Inmunofluorescencia indirecta (IFI).	Sensibilidad. Detecta IgG e IgM. Flexibilidad.	Interpretación subjetiva. Laboriosidad	Determinación del estado inmune. Soporte de diagnóstico clínico en SK, Castleman, PEL Útil en seguimiento de transplantados e infectados por el VIH.
<ul style="list-style-type: none"> • Ag latente <i>Ag LNA-1(ORF 73)</i> <i>Panbio</i> • Ag fase lítica <i>ABI Inc (células KS-1)</i> <i>Panbio</i> 	Sin reacciones cruzadas con VEB	Interpretación subjetiva. Laboriosidad. Poco específico	
	Punto corte (1:10; 1:40)		
Histopatología / Inmunohistoquímica	Laboratorios Patología Especificidad	La expresión de proteínas cambia según tipo celular	Útil en diagnóstico de SK, Castleman, PEL
Detección de genoma PCR cualitativa (simple, anidada)	Rápida <i>Multiplex</i> (Herpesvirus) Sensible, específica	Experiencia en PCR	Útil para diagnóstico SK Útil en monitorización VIH y transplantados
PCR cuantitativa (<i>real time</i>)	Sensibilidad, especificidad	Experiencia en la técnica Actualmente <i>in house</i>	Soporte diagnóstico de SK, Castleman y PEL Útil en monitorización transplantados

Es una ayuda diagnóstica en los casos de la enfermedad de Castleman y permite evaluar el *status* del paciente con respecto al HVH8 en los casos de linfoma no-Hodgkin.

8.2.4. Diagnóstico indirecto o serológico: generalidades

La detección de anticuerpos frente al HVH8 apoya el diagnóstico de las infecciones relacionadas con este virus. Como en otras infecciones, los anticuerpos que aparecen en primer lugar son de clase IgM, detectándose durante la primoinfección y raramente tras las reactivaciones. Las IgG aparecen posteriormente y se mantienen durante toda la vida, con posibles fluctuaciones que comentaremos posteriormente.

Pueden usarse varios métodos para el diagnóstico serológico, siendo los más utilizados la IF, el EIA y, más raramente, el *immunoblot* (*western blot*). El antígeno usado en cualquiera de estos métodos condiciona la sensibilidad, especificidad, así como el valor predictivo tanto positivo como negativo, y pueden proceder de la expresión proteica durante la fase de latencia, así como de la fase de replicación lítica. Se han probado muchos antígenos, pero sólo algunos de ellos se han incorporado a los métodos comerciales. Comentaremos las características más destacables de los diferentes métodos, según el antígeno utilizado para la detección de anticuerpos y de la existencia o no de reacciones cruzadas con otros virus. Es importante conocer que se han detectado anticuerpos (falsos positivos) frente a la glucoproteína B del HVH8 en pacientes sanos. Así pues, para un correcto diagnóstico serológico es fundamental conocer: a) los antígenos que están incorporados en los métodos comerciales que vayamos a utilizar, y b) que no existe *gold standard* para el diagnóstico serológico, por lo que se utiliza, de forma habitual, la detección de ADN de HVH8 como verdadero positivo para establecer la caracterización o validación de las técnicas serológicas.

8.2.5. Detección de anticuerpos frente a antígenos de fase latente

Para el ensayo de IF, se pueden usar diferentes antígenos que provienen de células infectadas por el HVH8 y tratadas de diversas formas. Las líneas celulares derivadas del PEL (BCP-1, KS-1, BC-3 y BCBL-1) expresan los antígenos nucleares de la fase latente del HVH8, siendo el antígeno ORF73, o antígeno nuclear de latencia (LNA-1), el componente más importante. Dicha proteína, de 226-236 kDa, se localiza en el núcleo de las células infectadas, y tras la utilización de un sistema de fijación celular que permeabiliza las células para que los anticuerpos séricos penetren hasta el núcleo de las células infectadas, muestra en el ensayo de IF una fluorescencia nuclear en pequeños grumos en más del 95% de las células PEL utilizadas como sustrato (ABI Inc). La seropositividad detectada por este ensayo se correlaciona bien con el desarrollo de SK y fue el primer método utilizado para conocer la

prevalencia de anticuerpos, tanto en los pacientes infectados como en los donantes sanos.

Recientemente, se ha desarrollado un EIA con el antígeno LNA recombinante en baculovirus y que se encuentra disponible en el comercio (Advanced Biotechnology Inc., ABI HHV-8 IgG ELISA) para la detección de anticuerpos IgG que es un 10% más sensible que el ensayo IF frente al mismo antígeno y sin reacciones cruzadas con otros herpesvirus, ya que el LNA no tiene homología con el VEB, como ocurre con otros antígenos.

8.2.6. Detección de anticuerpos frente a antígenos de ciclo lítico

La expresión de los antígenos de fase lítica se consigue mediante la inducción química de las células infectadas por el HVH8. Entre un 20 y un 70% de las células de PEL tratadas con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) o con butirato sódico, expresan proteínas propias de la infección lítica, dependiendo del protocolo de inducción y de otros factores biológicos, y mostrando un patrón fluorescente difuso. La técnica IF que utiliza estos antígenos es más sensible que la correspondiente IF con antígeno nuclear latente, incrementándose el porcentaje de positivos en un 20% con el antígeno lítico, aunque, a diferencia de lo que ocurre con el antígeno latente LNA, pueden existir reacciones cruzadas con otros herpesvirus, fundamentalmente con el VEB.

Se han utilizado diferentes sustratos celulares para la determinación de anticuerpos frente a antígenos líticos, algunos de los cuales se describen a continuación.

a) Métodos con antígeno crudo de células KS-1.

Hay varios equipos diagnósticos en el comercio que utilizan estos antígenos:

- Advanced Biotechnologies Inc. (ABI Inc.) comercializa un ensayo IF con células KS-1 expresando antígeno lítico y que permite la detección de anticuerpos IgG e IgM, según el conjugado utilizado. La utilización de la dilución 1:10 del suero permite, en algunas poblaciones con escasa prevalencia de la infección por el HVH8, detectar los pacientes seropositivos. En poblaciones con mayor penetración de esta infección, se recomienda un título de IgG de 40 (dilución 1:40), o incluso mayor, como punto de corte.
- También ABI Inc. ha comercializado un EIA para la detección de anticuerpos frente a antígenos líticos expresados en células KS-1, utilizando como antígeno viriones completos purificados en gradiente de sacarosa.

Ambos métodos son sensibles y se correlacionan bien con la incidencia de enfermedad, pero no son muy específicos.

- Recientemente, se ha desarrollado un ensayo IF, basado en la detección de antígenos recombinantes del HVH8 en el virus Semliki Forest y expresados en las células BHK21 (K8.1_{SFV} IFA), aumentando la sensibilidad y la especificidad (sin reacciones cruzadas con

otros herpesvirus), pero no comercializado hasta la fecha.

- b) Métodos que incorporan otros antígenos de fase lítica. Existe en el mercado un EIA para la detección de anticuerpos IgG con una mezcla de péptidos de antígenos líticos derivados de ORF65 y K8.1, comercializado por Biotrin. El uso de estos epítomos líticos permite una elevada sensibilidad (>93,4%) con una elevada especificidad (>91,2%) sin reacciones cruzadas detectables con el VEB ni el VIH. En este ensayo se usan sólo 10 µl de suero o plasma (incluso plasma citratado) y se calcula el valor índice para la interpretación de resultados dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra por la absorbancia del calibrador (que lleva el equipo diagnóstico) o cut-off del calibrador (COC). Un resultado de lectura de absorbancia mayor de 1,2 veces el COC se considera positivo, negativo por debajo de 0,8 y dudoso entre ambos valores.

También Panbio comercializa unos portaobjetos para la detección de anticuerpos frente a antígenos líticos y otros para la detección de anticuerpos frente a antígenos latentes, aunque no especifica ni el tipo celular ni los antígenos que expresan.

8.2.7. Resumen: selección del antígeno a utilizar en los ensayos serológicos

En general, en base a ensayos comparativos, se puede concluir que:

- Los ensayos preparados con antígenos líticos son más sensibles que los que llevan antígenos de latencia, independientemente del método utilizado.
- Los ensayos preparados con antígenos de la fase latente y péptidos sintéticos de la fase lítica, no presentan reacciones cruzadas con otros virus, a diferencia de lo que ocurre con los antígenos de la fase lítica obtenidos de viriones purificados.
- La IF presenta una variabilidad interobservador importante y no es fácil su automatización, factores ambos ampliamente superados por los métodos de EIA.
- La IF tiene la ventaja de permitir el estudio también de anticuerpos IgM, que aparecen en la primoinfección, y en pocos casos tras la reactivación. No existe ningún EIA comercializado para la detección de estos anticuerpos, por lo que, con esta metodología, sólo es posible la detección de niveles elevados de anticuerpos IgG en una sola muestra y la demostración de seroconversión en sueros pareados.

8.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

8.3.1. Condicionantes del diagnóstico directo

Es importante tener en cuenta dos hechos que pueden afectar al diagnóstico de las infecciones por el HVH8. En primer lugar, el reconocimiento de que existen diferencias en la expresión de las proteínas del HVH8 dependiendo del tipo celular. Así el antígeno LNA-1 (antígeno nuclear latente) se expresa en todas las células, mientras que el recientemente descrito LANA-2 (otro antígeno

nuclear) lo hace en células de la enfermedad de Castleman y en células de PEL; la IL-6 se expresa sólo en los linfocitos B infectados. Estos hechos afectan, en mayor medida, al diagnóstico por inmunohistoquímica y condicionan el uso de los anticuerpos monoclonales adecuados a cada situación. Así, por ejemplo, se ha descrito un anticuerpo monoclonal frente a antígeno vIL-6 que sirve para detectar el HVH8 en biopsias parafinadas de enfermedad múltiple de Castleman y PEL, pero no en el SK. En segundo lugar, el virus sólo replica en una minoría (<1 al 5%) de las células fusiformes perivasculares, siendo necesario que las muestras sean obtenidas adecuadamente, y que contengan abundante celularidad para cualquier método directo de diagnóstico.

8.3.2. Interpretación de los resultados serológicos

La serología tiene importancia diagnóstica y predictiva del desarrollo de la enfermedad relacionada con el HVH8, siempre y cuando se tengan en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) A diferencia de otros herpesvirus, el HVH8 no está universalmente distribuido entre la población. La prevalencia más alta en población sana se da en la población subsahariana, donde casi un 40% son seropositivos. En la zona mediterránea, la seroprevalencia ronda el 10%, con alguna subpoblación (varones italianos y judíos) con una prevalencia más alta, probablemente debido a la asociación con el SK clásico. En el norte de Europa, oscila entre 2-4% y, en Japón, entre un 0,2% en la población sana y un 10% en los pacientes infectados por el VIH. En pacientes con enfermedades asociadas al HVH8 la prevalencia se eleva hasta el 100%.
- b) El HVH8 establece latencia, como todos los otros herpesvirus, por lo que la existencia de anticuerpos IgG sin lesiones asociadas sólo indica el contacto previo con este virus.
- c) Los anticuerpos IgG se mantienen durante toda la vida, pudiendo disminuir en los pacientes con SK que mejoran con el tratamiento antirretrovírico o con la terapia antivírica específica frente al HVH8, o aumentar en las reactivaciones.
- d) El hallazgo de anticuerpos IgM indica primoinfección por el HVH8, y puede asociarse con el desarrollo posterior de SK u otras enfermedades asociadas, pero **no** existe correlación significativa con la aparición de los cuadros asociados al HVH8 (es decir, no prevé la aparición de los cuadros clínicos asociados) en los pacientes no infectados por el VIH.
- e) La inmunodepresión (VIH o trasplante) en pacientes con anticuerpos IgG frente al HVH8, puede precipitar la aparición de lesiones compatibles con infección por el HVH8.

8.3.3. Relación entre los cuadros clínicos asociados al HVH8 y la inmunosupresión en los pacientes infectados por el VIH y en los transplantados

En zonas con baja prevalencia de infección por el HVH8, la seroconversión puede servir para predecir el riesgo de padecer SK en la población seropositiva para el VIH. Así, la demostración de ésta en los pacientes infectados previamente por el VIH incrementa el riesgo de desarrollo de SK, pero no de linfomas relacionados con SIDA ni de infecciones oportunistas. Estos hallazgos confirman al HVH8 como agente causal del SK, enfatizan la relevancia clínica que la infección por HVH8 tiene antes o después de la infección por el VIH y plantean la cuestión de realizar controles serológicos en los pacientes infectados por el VIH que son seronegativos frente al HVH8. Aunque no está protocolizada la monitorización serológica, podría ser útil en estos pacientes, puesto que la seroconversión precede y predice la aparición de SK en este tipo de pacientes.

Por el contrario, no existen estudios concluyentes que indiquen la existencia de correlación significativa entre la primoinfección por el HVH8 y el desarrollo de SK en pacientes transplantados (se ha descrito en dos pacientes que recibieron riñones de un cadáver seropositivo), aunque sí entre la reactivación y el SK. En el trasplante de riñón, los receptores infectados previamente y que reciben un órgano de un donante seropositivo frente al HVH8, tienen un riesgo elevado de desarrollar SK, probablemente por reactivación. Algunos estudios demuestran que un 23% de los receptores seropositivos desarrollan SK, mientras que sólo un 0,7% de los seronegativos lo hacen. También se ha descrito asociación con fallo de prendimiento en el trasplante de médula ósea. Por lo tanto, podría ser útil, en áreas con alta prevalencia de infección por el HVH8, la incorporación de la determinación de anticuerpos frente a dicho virus en el cribado serológico de receptores y donantes, e incluso la indicación de realizar transfusiones con unidades de sangre de donantes seronegativos. La utilidad de la monitorización serológica está más controvertida en estos pacientes; sin embargo, debido a que los niveles de ADN aumentan en los pacientes transplantados previa a la aparición de SK, sí se considera de utilidad la monitorización de la carga vírica.

8.4. SENSIBILIDAD Y TRATAMIENTO ANTIVÍRICO

Los inhibidores de la ADN-polimerasa de los herpesvirus son eficaces en la fase lítica de la infección por el HVH8, pero no en la fase de latencia. El HVH8 es muy sensible al cidofovir *in vitro*, moderadamente sensible al foscarnet y al ganciclovir, y nada al aciclovir, por lo que bajas dosis de cidofovir, o dosis altas de foscarnet o ganciclovir, podrían suprimir la reactivación clínica del HVH8. Tanto el foscarnet como el ganciclovir han inducido la regresión del SK en varios ensayos clínicos. Sin embargo, a pesar de estos resultados clínicos

importantes, no se detectó ningún cambio en el número de células mononucleares de sangre periférica infectadas latentemente, pero sí en cuanto a la disminución de la replicación durante la fase lítica. Es recomendable, a la vista de estos resultados, la monitorización de la carga vírica en pacientes con riesgo de reactivación para instaurar la terapia adecuada si el virus comienza su replicación.

A pesar de que no hay actividad directa de los antirretrovíricos frente al HVH8, sí hay evidencias de reducción de la carga vírica del HVH8 en células de SK, así como en células mononucleares sanguíneas en los pacientes a los que se administra tratamiento antirretrovírico de alta eficacia (TARGE). Además, hay también claras evidencias de la disminución de la incidencia de SK en pacientes tratados adecuadamente con TARGE, así como de la regresión de las lesiones y disminución de los niveles de anticuerpos frente al antígeno lítico ORF-65, pero no al LNA-1.

9. BIBLIOGRAFÍA

9.1. VIRUS DEL HERPES SIMPLE

1. De la Iglesia P, Melón S, López B, Rodríguez M, Blanco MI, Mellado P, De Oña M. Rapid screening test for in vitro susceptibility to acyclovir of clinical herpes simplex virus isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2389-2391.
2. Morfin F, Thouvenot. D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs *J Clin Virol* 2003; 26:29-37.
3. Rawls W. Herpes simplex virus type 1 and 2 and herpesvirus simiae. En: Lennette E, Schmidt N (eds). *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections* (7ª ed). Washington DC: APHA, 1997; pp. 309-373.
4. Roizman B, Sears A. Herpes simplex viruses and their replication. En: Fields B, Knipe D, Howley P (eds). *Virology* (3ª ed). Philadelphia; Lippincott-Raven, 1996; pp. 2231-2296.
5. Stranska R, van Loon AM, Polman M, Beersma MF, Bredius RG, Lankester AC, Meijer E, Schuurman R. Genotypic and phenotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from haematopoietic stem cell transplant recipients. *Antivir Ther* 2004; 9:565-575.
6. Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis* 2003; 188:1345-1351.

9.2. VIRUS VARICELA-ZÓSTER

1. Breton G, Fillet AM, Katlama C, Bricaire F, Caumes E. Acyclovir-resistant herpes zoster in human immunodeficiency virus-infected patients: results of foscarnet therapy. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1525-1527.
2. Fillet AM, Dumont B, Caumes E, Visse B, Agut H, Bricaire F, Huraux JM. Acyclovir-resistant varicella-zoster virus: phenotypic and genetic characterization. *J Med Virol* 1987; 55:250-254.
3. Visse B, Huraux JM, Fillet AM. Point mutations in the varicella-zoster virus DNA polymerase gene confers resistance to foscarnet and slow growth phenotype. *J Med Virol* 1991; 59:84-90.

9.3. CITOMEGALOVIRUS

1. Anónimo. Comparison and availability of diagnostic assays for cytomegalovirus detection in transplant recipients. En: Griffiths PD, Whitley RJ (eds). The challenge of CMV infection and disease in transplantation. Recommendations from the IHMF Management Strategies Workshop and the 8th Annual Meeting of the IHMF. <http://www.ihmf.org> (acceso electrónico, 15 de octubre de 2004).
2. Baldanti F, Gerna G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs: diagnosis, monitoring and clinical impact. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:324-330.
3. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:533-534.
4. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:286-297.
5. Grossi P, Minoli L, Percivalle E *et al.* Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation* 1995; 59:847-851.
6. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (8ª ed). Washington: ASM Press 2003; pp 1304-1318.
7. Kalpoe JS, Kroes CM, de Jong MD *et al.* Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1498-1504.
8. Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. *Transplantation* 2004; 77:1692-1698.
9. Mori T, Mori S, Kanda Y *et al.* Clinical significance of cytomegalovirus (CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33:431-434.
10. Niubò J, Pérez JL, Martínez-Lacasa JT *et al.* Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24:19-24.
11. Pérez JL, Salvà J, Niubò J. La prueba de antigenemia para citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:251-269.
12. Pérez Sáenz JL, Erice Calvo-Sotelo A. Infecciones causadas por citomegalovirus. En: Rozman C (ed). *Farreras-Rozman. Medicina Interna* (15ª ed). Madrid: Elsevier, 2004; pp 2467-2471.

9.4. HERPESVIRUS HUMANOS 6 Y 7

1. Ansari A, Li S, Abzug MJ, Weinberg A. Human herpesvirus 6 and 7 and central nervous system infection in children. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1450-1454.
2. Benito N, Moreno A, Pumarola T, Marcos MA. Virus del herpes humano tipo 6 y tipo 7 en receptores de trasplantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21:424-432.
3. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Emerg Infect Dis* 2001; 33:829-833.
4. De bolle L, Naesens L, De clerq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:217-245.

5. Dewhurst S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11 (supl 2):105a-111a.
6. Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 2003; 52:5-18.
7. Franti M, Aubin JT, De Saint-Maur G, *et al.* Immune reactivity of human sera to the glycoprotein B of human herpesvirus 7. *J Clin Microbiol* 2002; 40:44-51.
8. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt S, *et al.* Isolation of a new herpesvirus from CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:748-752.
9. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, *et al.* Isolation of a new virus (HBLV) in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986; 234:596-601.
10. Specter S, Hodinka RL, Young SA. Human herpesvirus 6, 7 and 8. En: *Clinical Virology Manual* (3ª ed). Washington: ASM Press, 2000; pp 450-471.
11. Ward KN, Couto PX, Passas J, Thiruchelvam AD. Evaluation of the specificity and sensitivity of indirect immunofluorescence tests for IgG to human herpesvirus 6 and 7. *J Virol Methods* 2002; 106:107-113.
12. Ward KN, Turner DJ, Parada C, Thiruchelvam D. Use of immunoglobulin G avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39:959-963.
13. Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol* 1992; 66:3206-3209.
14. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, *et al.* Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988; 1065-1067.
15. Yoshida M, Torigoe S, Yamada M. Elucidation of the cross-reactive immunoglobulin M response to human herpesvirus 6 and 7 on the basis of neutralizing antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:394-402.

9.5. VIRUS DE EPSTEIN-BARR

1. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *New Engl J Med* 2004; 343:481-492.
2. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3381-3387.
3. Guley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001; 3:1-10.
4. Lennette EJ. Epstein-Barr virus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology* 7ª ed. Washington: ASM Press, 1999; pp 912-918.
5. Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:131-140.
6. Mate JL, Navarro JT, Hernández A, Ausina V. Síndromes linfoproliferativos asociados al virus de Epstein-Barr. *Bol Control Calidad SEIMC* 2003; 15:27-34.
7. Navarro D. Diagnóstico de la mononucleosis infecciosa. *Bol Control Calidad SEIMC* 2001; 13:25-28.
8. Tsuchiya ST. Diagnosis of Epstein-Barr virus associated diseases. *Crit Rev Onc Hematol* 2002; 44:227-238.

9.6. HERPESVIRUS HUMANO 8

1. Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8 diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:439-464.

2. Corchero JL, Mar E, Spira TJ, Pellett P, Inque N. Comparison of serologic assays for detection of antibodies against human herpesvirus 8. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8:913-921.
3. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266: 1865-1869.
4. Mendez JC, Procop GW, Espy MJ, Paya CV, Smith TF. Detection and semiquantitative analysis of human herpesvirus 8 DNA in specimens from patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2220-2222.
5. Nitsche A, Muller CW, Radonic A, et al. Human herpesvirus 6A DNA is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 2001; 183:130-133.
6. Polstra AM, Van der Burg R, Goudsmit J, Cornelissen M. Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5488-5491.
7. Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1998; 12:2481-2488.
8. Sergerie Y, Abed Y, Roy J, Boivin G. Comparative evaluation of three serological methods for detection of human herpesvirus 8-specific antibodies in canadian allogenic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2663-2667.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de los virus del herpes simple en cultivo convencional en tubo	Fecha: PNT-VIR-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Diagnosticar las infecciones producidas por los virus del herpes simple tipos 1 y 2 mediante su aislamiento en cultivo celular convencional.

Este procedimiento se aplica en el laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del este Hospital.

2. FUNDAMENTO

Las infecciones primarias o las reactivaciones de los virus del herpes simple 1 y 2 suponen la replicación de estos virus en los tejidos del huésped, a veces relacionada con la patología. Los virus del herpes simple crecen bien y rápido en la mayor parte de líneas celulares, produciendo un efecto citopático característico que puede identificarse mediante tinción con anticuerpos fluorescentes. Si estos anticuerpos son específicos de tipo, es posible realizar la diferenciación de ambos tipos de virus.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras.
- Manual de preparación de medios y reactivos.
- Manual de bioseguridad.
- Gestión de residuos.

4. TOMA DE LA MUESTRA

Las condiciones en que debe tomarse la muestra a analizar están descritas en el "Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras". Las muestras a procesar son: exudados de vesícula, biopsia, líquidos orgánicos y, en general, cualquier muestra biológica en la que se pretenda aislar los virus del herpes simple.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS, REACTIVOS Y CULTIVOS CELULARES

- *Minimum Essential Medium* [MEM; (varios proveedores)].
- Suero bovino fetal (varios proveedores).
- Solución antibiótica de penicilina y estreptomina para cultivos celulares (varios proveedores).
- Células Vero o fibroblastos MRC-5, en frascos tipo Falcon y con monocapas formadas.
- Solución de tripsina-EDTA para cultivos celulares (varios proveedores).
- Solución de azul tripán 1%.
- Solución tampón de fosfatos salina (PBS) estéril.
- Solución de formaldehído al 5% y sacarosa al 2% en PBS (Solución FS).
- Solución de sacarosa al 10%, suero bovino fetal al 1% y Nonidet NP40 (Sigma) al 5% V/V en PBS (Solución SSN).
- Anticuerpos monoclonales de ratón específicos de género (no diferencian los dos tipos de VHS) o de tipo (permiten su diferenciación). [**Nota técnica.**

Existen varios suministradores comerciales. Algunos están conjugados con isotiocianato de fluoresceína y se utilizan para técnicas de inmunofluorescencia (IF) directas (son los más convenientes, por su sencillez), mientras que otros requieren el uso de un conjugado fluorescente para tinción de IF indirecta. Esta última es más sensible, pero no suele ser necesario cuando se utiliza la tinción IF con los fines aquí descritos].

- Conjugado de inmunoglobulinas anti-ratón marcadas con fluoresceína, si se sigue un procedimiento de IF indirecto.
- Líquido de montaje de fluorescencia (mezcla de glicerina con PBS).

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de seguridad biológica clase II.
- Estufa de cultivo de CO₂ y 37°C (control diario de temperatura).
- Microscopio invertido, dotado de objetivos de 10X, 20X y 40X.
- Cámara hematocimétrica.
- Microcentrífuga para tubos de fondo cónico (tipo *Eppendorf*) y rotor angular, con velocidad de rotación mínima de 5.000 rpm (p.ej., la Heraeus Biofuge 13 o similar).
- Agitador orbital tipo *vortex*.
- Secador de aire convencional para cabello.
- Microscopio de fluorescencia con filtro para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.

6.2. MATERIALES

- Pipetas de bulbo estériles.
- Jeringas y filtros de 0,22 µm.
- Tubos de cultivo celular estériles (varios proveedores) de 15 ml
- Portas de fluorescencia con varios pocillos. Alternativamente, podrían utilizarse portas convencionales, con pocillos marcados con un rotulador de laca o lápiz de cera.
- Recipientes para lavado de los portaobjetos.
- Cámara húmeda.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión parenteral o respiratoria establecidas en el "Manual de bioseguridad".

7. PROCESAMIENTO

7.1. CULTIVOS CELULARES: PREPARACIÓN DE TUBOS

- Tripsinizar las células, añadiendo 2-3 ml de solución de tripsina-EDTA en el frasco Falcon que contiene la monocapa de cultivo celular.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de los virus del herpes simple en cultivo convencional en tubo	Fecha: PNT-VIR-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 5

- Cuando las células empiecen a picnotizarse y despegarse (controlar mediante el microscopio invertido), parar la tripsinización añadiendo 5-10 ml de MEM con 10% de suero bovino fetal.
- Mediante una pipeta y un bulbo de goma, aspirar y expulsar el medio, haciendo que el líquido golpee la superficie del cultivo, con el fin de despegar las células y lograr una suspensión homogénea. Evitar, en la medida de lo posible, la formación de espuma.
- Contar las células viables en cámara hematocimétrica con azul tripán (son viables las que no permiten la entrada del colorante azul).
- Ajustar la suspensión a 100.000 células/ml, añadiendo medio de crecimiento (MEM+10% suero bovino fetal+solución de antibióticos; ver "Manual de preparación de medios y reactivos").
- Repartir en los tubos de cultivo celular, a razón de 1,5-2 ml.
- Colocar los tubos en la estufa de CO₂, con los tapones sin cerrar completamente, y con una inclinación aproximada de 5 grados.
- Incubar hasta que se forme una monocapa confluyente en la parte inferior de los tubos.

7.2. INOCULACIÓN DE LOS TUBOS

- Rotular el número de orden de la muestra y la fecha en el tubo (por el lado opuesto a la monocapa).
- Retirar el medio de crecimiento en el que están bañadas las células (volcando).
- Añadir 4 gotas de la muestra (0,2 ml) con pipeta de bulbo.
- Incubar a 37°C durante 1 hora (con un ángulo de inclinación de 5°).
- Pasado este tiempo, retirar la muestra (volcando).
- Añadir 1,5 ml de medio de mantenimiento (MEM+2% suero bovino fetal + solución antibiótica).
- Incubar a 37°C y atmósfera del 5% de CO₂
- Al día siguiente, después de visualizar los tubos al microscopio invertido para ver si la monocapa está bien formada y no hay contaminación, cambiar nuevamente el medio de mantenimiento, retirando el anterior volcando el tubo, y añadir 1,5 ml de medio de mantenimiento nuevo.

7.3. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CONVENCIONALES

- Los tubos se observan periódicamente al microscopio invertido (Vero y MRC-5), para detectar el efecto citopático característico de los virus del herpes simple (monocapa con células redondeadas refringentes que rompen la capa y progresan con rapidez; Anexo 1), en cuyo caso se procede a la realización de un subcultivo y raspado de la monocapa para realizar una inmunofluorescencia de identificación .
- Si a los 15 días no aparece el efecto citopático, informar como cultivo negativo.

7.4. SUBCULTIVO O PASES

- Se realizan raspando levemente la capa celular (con la punta de una pipeta tipo Pasteur, o con el raspador que se utiliza para la técnica de inmunofluorescencia) y tomando 0,2 ml (4-5 gotas) para transferirlas a un tubo nuevo, en el que previamente se ha añadido medio de mantenimiento.
- El nuevo tubo se rotula poniendo el número de muestra, los códigos de tipo celular y el número de pase y la fecha de subcultivo.

7.5. IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS POR TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica, que aquí se utiliza para confirmar un efecto citopático sugestivo de VHS, y para tipificar, puede servir como base para la detección directa de antígenos víricos a partir de las muestras de vesículas (ver PNT-VIR-03), o para teñir los cultivos rápidos en *shell-vial* (ver PNT-VIR-04), con las correspondientes variantes técnicas.

Preparación de los portaobjetos a partir de los cultivos

- Despegar mecánicamente el cultivo, raspando suavemente la parte del tubo con monocapa celular.
- Añadir PBS estéril hasta la mitad del tubo.
- Centrifugar 5 minutos a 2.500 rpm.
- Retirar el PBS.
- Resuspender el sedimento agitando el tubo con el líquido restante, con agitador tipo *vortex*.
- Rotular los portas de inmunofluorescencia con el número de muestra, tipo de virus investigado (si se pretende realizar una tipificación del cultivo sospechoso), posición de muestras y controles (ver más adelante, "9. Control de calidad").
- Poner 10-20 µl en los pocillos correspondientes y dejar secar (puede facilitarse mediante un secador con calor suave, calentador de preparaciones, estufa a 37 °C, etc.).

Fijación de los portas

- Sumergir los portas en un recipiente tipo Köplin con solución FS, a 4 °C.
- Mantener los portas durante 10 minutos.
- Pasar las preparaciones a un nuevo recipiente con solución SSN, a 4 °C.
- Mantener sumergidos los portas durante 5 minutos.
- Sacar del recipiente, dejar escurrir y secar ligeramente las preparaciones.

Tinción de inmunofluorescencia

- Añadir 10-15 µl de cada anticuerpo monoclonal (según planilla) dejando un pocillo como control de la gammaglobulina donde se añade un control negativo.
- Incubar los portaobjetos a 37°C durante 15-30 minutos en cámara húmeda.
- Lavar con PBS y agitación 10 minutos dos veces y después lavar en agua destilada unos segundos, dejar secar a temperatura ambiente.

Servicio de Microbiología	Aislamiento de los virus del herpes simple en cultivo convencional en tubo	Fecha: PNT-VIR-01	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 4 de 5

- Si se sigue una técnica de **IF directa**:
 - Añadir una gota de líquido de montaje.
 - Proceder a la observación de las preparaciones en el microscopio de fluorescencia.
- Si se sigue una técnica de **IF indirecta**:
 - Añadir 10-20 µl de gammaglobulina anti-ratón marcada con fluoresceína e incubar a 37° durante 30 minutos en cámara húmeda.
 - Realizar nuevamente 2 lavados de 1-2 minutos con PBS.
 - Enjuagar en agua y secar al aire.
 - Añadir líquido de montaje y observar a 400x en un microscopio de epiluminiscencia.

Lectura e interpretación

- Se valorará la presencia de fluorescencia en cada pocillo de las muestras y controles.
- Se considerará positiva la presencia de fluorescencia de color verde manzana, típica del isotiocianato de fluoresceína, localizada en el citoplasma celular.
- También deben observarse células fluorescentes en los pocillos de control positivo correspondientes, así como su ausencia en el control negativo (ver "9. Control de calidad"). Si no es así, la técnica no es válida.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Ante la presencia en el tubo de cultivo de focos sugestivos de la presencia de uno de los VHS, el resultado debe expresarse con la fórmula: "Se observa la presencia de un efecto citopático compatible con un virus del herpes simple".
- El efecto citopático en el cultivo NO permite diferenciar ambos tipos de VHS.
- La presencia de células fluorescentes en el procedimiento de identificación/tipificación debe expresarse como "Identificación: virus del herpes simple" si se utilizan monoclonales de género, o indicando el tipo de virus herpes correspondiente si se utilizan anticuerpos específicos de tipo.

9. CONTROL DE CALIDAD

9.1. CONTROL DE CALIDAD DEL CULTIVO CONVENCIONAL

- Cada lote de tubos debe ser controlado antes de su utilización, de acuerdo con:
 - Control de esterilidad: inocular una alícuota de la suspensión celular en un tubo de caldo infusión cerebro-corazón o tioglicolato, durante 48 horas a 37°C. Controlar también la ausencia de turbidez visible en los tubos preparados individualmente, antes de ser inoculados con la muestra.
 - Control de susceptibilidad: inocular dos tubos del lote, elegidos aleatoriamente, con un cultivo positivo conocido de VHS, de forma similar a lo indicado en "7.4. Subcultivo o pases".

9.2. IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MEDIANTE LA TINCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA

- Reservar un pocillo para un control negativo (no se fija ningún tipo de depósito celular).
- Incluir, en cada porta, un control positivo constituido por una suspensión procedente de un cultivo positivo conocido de un VHS si se pretende una identificación genérica. Si se busca la tipificación del VHS, debe incluirse un pocillo para cada uno de estos virus.

10. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: Supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- El cultivo convencional se considera el método de referencia para el diagnóstico de los VHS. La variante *shell vial* es asimismo válida, aunque no ha demostrado mayor sensibilidad ni tampoco acorta de forma relevante el tiempo de detección en muestras clínicas.
- La observación del efecto citopático típico (Anexo 1) es bastante fiable como método de identificación, y puede ser suficiente para aquellas muestras en las que se pretende confirmar un diagnóstico clínico de alta sospecha. En caso contrario, es necesario identificar el efecto citopático mediante el método de tinción de inmunofluorescencia descrito. Es muy recomendable que se lleve a cabo la tipificación de especie vírica, por razones de conocimiento epidemiológico.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los métodos de cultivo tienen un muy bajo rendimiento en el diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central, por lo que NO deben ser utilizados con este fin. Alternativamente, ha de utilizarse una amplificación genómica.
- La administración de tratamiento antivírico específico o el tiempo de evolución de las lesiones afectan negativamente al rendimiento de los métodos de cultivo.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Rawls, W. Herpes simplex virus type 1 and 2 and herpesvirus simiae. En: Lennette E, Schmidt N (eds). Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections (7ª ed). Washington DC: APHA, 1997; pp. 309-373.

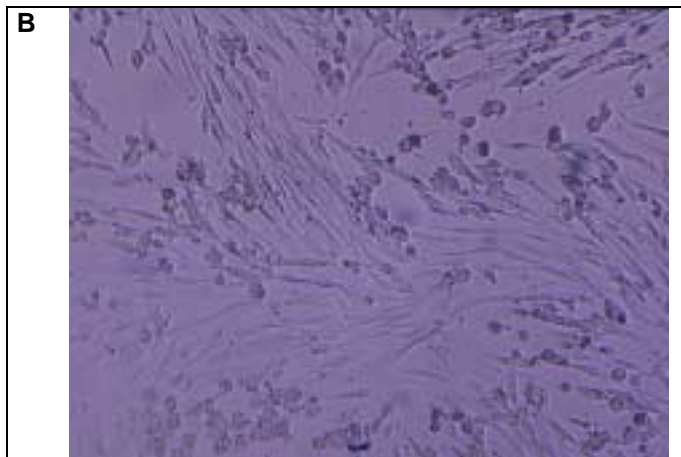
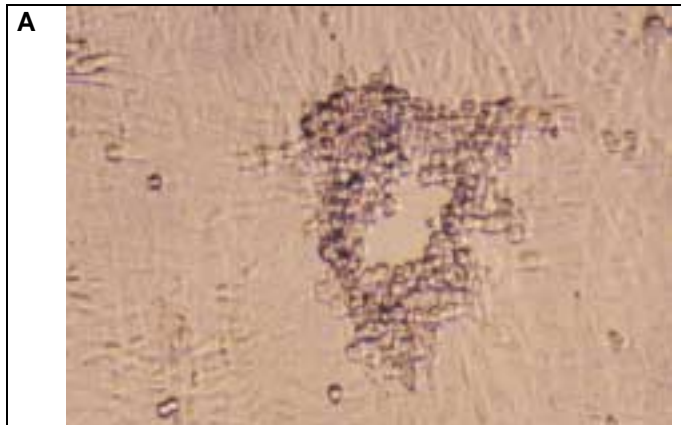
Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de los virus del herpes simple en cultivo convencional en tubo	Fecha: PNT-VIR-01	
Edición Nº 01		Página 5 de 5	

2. Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with

HSV isolation in cell culture. J Infect Dis 2003; 188:1345-1351.

14. ANEXOS

ANEXO 1. Efecto citopático característico de los VHS en células Vero (figura A) y en fibroblastos MRC-5 (figura B).



Servicio de Microbiología Hospital.....	Método simplificado para determinar la sensibilidad de los virus del herpes simple al aciclovir	Fecha: PNT-VIR-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción de la sistemática de procesamiento, lectura e interpretación del ensayo rápido de sensibilidad de los virus Herpes simplex 1 y 2 al aciclovir. Este procedimiento es aplicable también a otras drogas anti-herpéticas, con las variaciones particulares.

2. FUNDAMENTO

El uso cada vez más frecuente del aciclovir hace que se describan con mayor frecuencia resistencias a este fármaco. El disponer de ensayos de sensibilidad rápidos y sencillos supone una herramienta muy útil para los casos en los que fracase el tratamiento, fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos. Este ensayo es aplicable a todas las cepas de VHS 1 y 2 aisladas a partir de muestras clínicas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Manuales de instrucciones de las técnicas aplicadas
Normas de bioseguridad

4. MUESTRA

La muestra a procesar es la cepa de virus herpes simple aislada a partir de un cultivo celular identificado mediante anticuerpos fluorescentes específicos de tipo.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Preparación de la microplaca de 96 pocillos:

A partir de un cultivo en frasco tipo Falcon de células Vero, se realiza un subcultivo (pase por tripsinización de la monocapa original) a placa de microtiter de 96 pocillos, a una concentración de 50.000 células/ml (200 µl/pocillo). Volumen de suspensión celular necesario para la placa: 20 ml. A las 24-48 h ya estará listo para uso (monocapa confluyente).

Preparación de la solución stock de aciclovir:

El peso molecular del aciclovir es de 225 g. Para preparar una dilución 1 mM se deben diluir 22,5 mg en 100 ml de agua bidestilada. La estabilidad de esta dilución a -70°C es de tres meses. Se conserva a esta temperatura, repartida en alícuotas de 1 ml.

Preparación de las concentraciones de aciclovir (ACV)

- a) La solución de 1 µg/ml (4,4µM) de ACV contiene:
32,2 µl de solución stock
8 ml de medio de mantenimiento (MEM)
- b) La solución con 2 µg/ml de ACV (8,8 µM) contiene:
70,4 ml de solución stock
8 ml de medio de mantenimiento (MEM)
- Se deben preparar cada vez que se empleen

Solución de Rojo neutro:

150 mg de rojo neutro
100 ml de tampón fosfato sódico monobásico 0,1M (pH=5)

Se almacena a 4°C

Tampón etanol fosfato

El tampón etanol fosfato contiene:

1000 ml de fosfato monobásico de sodio 0,1 M

1000 ml de etanol al 95%

Con un pH de 4,2; se almacena a 4°C.

6. APARATOS Y MATERIAL

Estufa de cultivo de CO₂ y 37°C (control diario de temperatura).

Pipetas y puntas estériles

Filtros de 0,22 µm

Campana de flujo laminar.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE VHS.

A partir del sobrenadante de un cultivo con efecto citopático (ECP) abundante (50%-70% de la monocapa), se centrifuga el tubo a 1.000 rpm y a 4°C. A continuación se realizan diluciones seriadas del sobrenadante de base 10, desde el concentrado hasta 10⁻⁶. Así se añaden 900 µl de MEM a 6 tubos cónicos de polipropileno (tipo Eppendorf) y en el primero se añaden 100 µl del sobrenadante, pasando 100 µl de cada dilución al siguiente, y así hasta el sexto tubo.

7.2. INOCULACIÓN DE LA MICROPLACA.

Se inoculan 8 pocillos de cada dilución del virus a razón de 100 µl por pocillo. Se emplean otros 8 pocillos como control de células, a los que se añaden 100 µl de medio de mantenimiento.

7.3. ADSORCIÓN.

Se realizará mediante centrifugación de la placa a 1.500 rpm durante 45 minutos.

7.4. PREPARACIÓN DEL ACICLOVIR.

A partir de las alícuotas de aciclovir 1 mM guardado a -70°C realizamos las diluciones según se ha señalado anteriormente.

Concentración 0 mM (sin aciclovir): 8 ml de medio de mantenimiento (200 µl/pocillo).

Concentración 4,4 µM (se emplea para HSV-1): 35,2 µl aciclovir stock + 8 ml de medio de mantenimiento (200 µl/pocillo).

Concentración 8,8 µM (se emplea para HSV-2): 70,4 µl aciclovir stock + 8 ml de medio de crecimiento (200 µl/pocillo).

7.5. INCUBACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LA TÉCNICA.

Se incuba durante 3-5 días a 37°C y 5% CO₂.

Se observa el ECP del HSV considerándolo como positivo cuando la monocapa celular tenga focos con la monocapa "rota".

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. CÁLCULO DEL TÍTULO DE LA CEPA CON Y SIN ANTIVÍRICO (50% DEL PUNTO FINAL, FÓRMULA DE KÄRBER)

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d(s - 0,5)$$

TCID₅₀ = dosis que infecta el 50% del cultivo celular.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Método simplificado para determinar la sensibilidad de los virus del herpes simple al aciclovir	Fecha: PNT-VIR-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

L = logaritmo de la dilución menor.
d = diferencia entre logaritmos de los pasos de dilución.
s = suma de la proporción de las células infectadas.

Ejemplo:

Dilución del virus	Proporción de cultivos infectados
10 ⁰	4/4=1
10 ⁻¹	4/4=1
10 ⁻²	4/4=1
10 ⁻³	4/4=1
10 ⁻⁴	2/4=0,5
10 ⁻⁵	1/4=0,25
10 ⁻⁶	0/4=0

Según esto, L=1; d=1; s=1+1+1+0,5+0,25=3,75

Y operando matemáticamente: TCID₅₀ = 10^{-4.25}

Con esta concentración de virus se infecta el 50% del cultivo celular. Es el título del virus. En 100 µl de esta dilución vírica habrá 1 dosis infectiva; en 100 µl de la dilución 10^{-2.25} habrá 100 dosis infectivas que son las necesarias para realizar el ensayo de sensibilidad.

8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se determina el cociente entre ambos títulos: título del virus en ausencia de aciclovir/título del virus en presencia del fármaco.

Cepa sensible: título de la cepa crecida con aciclovir, al menos 100 veces menor, o lo que es lo mismo, cuando el cociente entre ambos títulos es mayor o igual a 2 diluciones ($\geq 10^{-2}$). Se emplea este límite porque sería lo mismo que la inhibición del 50% del crecimiento vírico de un inóculo de 100 TCID₅₀, el cual se emplea para la determinación de la CI₅₀ en los métodos estándar.

Cepa resistente: título de la cepa con aciclovir menos de 100 veces menor, o lo que es lo mismo, cuando el cociente es menor de 2 diluciones ($< 10^{-2}$). Esto significa que con el inóculo de 100 TCID₅₀ se inhibiría menos de un 50% el crecimiento del virus.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.

Personal técnico: Realización de las técnicas de inoculación, aislamiento y ensayo de sensibilidad. Archivo de hojas de trabajo.

Facultativo responsable: Supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Si el título de la cepa con aciclovir está en el límite de ser 100 veces menor, hay que cuantificar el ECP, ya que si a esa dilución 100 veces menor hubiera una inhibición del crecimiento del 50%, la cepa se podría

considerar sensible. Para ello se procede a la tinción con un colorante vital, como el rojo neutro.

El rojo neutro es un colorante que se capta por las células vivas. De esta forma es posible conocer, por espectrofotometría, el porcentaje de células vivas en un sistema celular inoculado con un virus, a la vez que se cuantifica la inhibición producida por un agente antivírico cuando se compara con un control. El método consiste en añadir a cada pocillo 50 µl de una solución de rojo neutro tamponada. A continuación las placas se incuban durante 45 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se retira el colorante y se lava dos veces la placa con PBS (pH=6,5). Después a cada pocillo se añaden 150 µl de tampón de elución (etanol fosfato) para eluir el colorante vital, incorporado por las células viables. Se obtiene la densidad óptica leyendo la placa en un espectrofotómetro a 550 nm (con valor de referencia de 620).

Después se determina la media de la densidad óptica (DO) de los pocillos control de células y solamente se considera para los cálculos finales aquellos que tienen una desviación de la media de un 10%. A esta media de DO de los pocillos control de células se le asigna un 0% de crecimiento del virus. A la media de la DO de los pocillos control del virus (dilución 10⁰ o puro) restada de la media del control de células se le asigna un valor de 100% de crecimiento.

Posteriormente se calculan todas las medias de DO de todas las diluciones del virus, se le restan de las medias del control de células y se calcula el porcentaje de crecimiento en relación al 100% (virus puro).

Se determina entonces el título del virus (TCID₅₀) que representa la dilución del virus que capta un 50% del colorante y que se corresponde con la dilución del virus que produce un ECP del 50%. Dicho cálculo se realiza mediante análisis de regresión lineal de los datos.

El porcentaje de protección que induce el aciclovir se calcula en cada dilución del virus mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{protección} = \frac{[(DO_{acv})_{cc} - (DO_{acv})_{VHS}]}{[(DO_{no\ acv})_{cc} - (DO_{no\ acv})_{VHS}]} \times 100$$

donde

(DO_{acv})_{cc} = media de absorbancia de las células control

(DO_{acv})_{VHS} = media de absorbancia de la muestra con ACV

(DO_{no acv})_{cc} = media de absorbancia de las células control sin ACV

(DO_{no acv})_{VHS} = media de absorbancia de la muestra sin ACV

Los valores de los porcentajes de protección de cada dilución del virus se emplean para determinar la sensibilidad del ACV a la dilución del virus que emplea 100 dosis infectivas (TCID₅₀) mediante análisis de regresión lineal de los datos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Método simplificado para determinar la sensibilidad de los virus del herpes simple al aciclovir	Fecha: PNT-VIR-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Cuando el porcentaje de protección a 100 TCID₅₀ es mayor de 50% se considera a la cepa como sensible al ACV (CI₅₀ < 1 µg/ml para VHS₁ y CI₅₀ > 2 µg/ml para VHS₂). Cuando este porcentaje de protección es menor o igual al 50% la cepa se considera resistente al ACV. Se recomienda calcular la CI₅₀ utilizando varias concentraciones del ACV.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este procedimiento no determina la ID₅₀ del antivírico ya que utiliza una concentración límite. Actualmente en más del 90% de los casos no es necesario realizar tinción con colorante vital ya que las cepas sensibles tienen cociente de los títulos sin y con ACV mayor de 2.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Chatis PA, Crumpacker CS. Resistance of herpesvirus to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1589-1595.
2. De la Iglesia P, Melón S, López B, Rodríguez M, Blanco MI, Mellado P, de Oña M. Rapid screening tests for determining in vitro susceptibility of herpes simplex virus clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 8: 2389-2391.
3. Hawkes RA. General principles laboratory diagnosis of viral infection. En E. H. Lennette and N. J. Schmidt (ed). 1979. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection*. 5th ed. American Public Health Association. Washington. D.C. 1979., pp. 3-48.
4. McLaren C, Ellis MN and Hunter GA. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex virus to antiviral agents. *Antiviral Res* 1983; 3:223-234.

Servicio de Microbiología	Detección directa del virus varicela-zóster en lesiones cutáneas mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-VIR-03	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el proceso para detectar la presencia de antígenos del virus varicela-zoster (VVZ) en muestras clínicas procedentes de lesiones cutáneas, mediante una tinción de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Este procedimiento se aplica en el laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología de este Hospital.

2. FUNDAMENTO

La infección de las células por el VVZ lleva consigo la expresión de ciertos antígenos propios del virus en diferentes localizaciones celulares que pueden detectarse con el empleo de anticuerpos monoclonales específicos y una técnica de IFI.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras.
- Manual de preparación de medios y reactivos.
- Normas de bioseguridad.
- Gestión de residuos.

4. TOMA DE LA MUESTRA

Las condiciones de toma de la muestra están descritas en el "Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras". Esta técnica se aplica básicamente al diagnóstico del VVZ en muestras de origen cutáneo, en las que se tiene una mayor experiencia. Alternativamente, podría aplicarse a cualquier otra muestra biológica con contenido celular. La eficiencia de la técnica está condicionada a una buena obtención de la muestra, esto es, a que contenga un componente celular mínimo.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tampón fosfato salino pH=7,2 (PBS), de procedencia comercial, según el suministrador habitual (concursos de suministros).
- Acetona, calidad reactivo.
- Anticuerpo monoclonal murino anti-VVZ (diferentes marcas). Está dirigido frente a una glucoproteína de la membrana.
- Conjugado anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína, de procedencia comercial. Sirve el que se incluye en otros sistemas comerciales (*kits*) de técnicas de IFI.

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Microcentrífuga para tubos de fondo cónico (tipo *Eppendorf*) y rotor angular, con velocidad de rotación mínima de 5.000 rpm (p.ej., Heraeus Biofuge 13 o similar).
- Agitador orbital tipo *vortex*.
- Secador de aire convencional para cabello.

- Microscopio de fluorescencia con filtro para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.

6.2. MATERIALES

- Hisopo (torunda) y medio de transporte para virus (MTV). Suele utilizarse un equipo comercial específico. Alternativamente, puede utilizarse un hisopo convencional y un tubo con medio de transporte y descontaminación de muestras para virus, preparado por el propio laboratorio.
- Pipetas Pasteur.
- Tubo de plástico de fondo cónico tipo *Eppendorf* de 1,5 ml.
- Porta de fluorescencia con varios pocillos. Alternativamente, podrían utilizarse portas convencionales, con pocillos marcados con un rotulador de laca o lápiz de cera.
- Recipientes para lavado de los portaobjetos.
- Cámara húmeda.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión sanguínea establecidas en el "Manual de bioseguridad".

7. PROCESAMIENTO

7.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORIGEN CUTÁNEO

- Se lleva a cabo con un hisopo de Dacron o de alginato y mango de plástico o aluminio, preferiblemente. Si la muestra no se va a utilizar también para cultivo de virus, sirve un hisopo convencional de algodón y mango de madera.
- Conviene insistir en que la toma de muestras debe hacerse raspando el material de la base de la lesión. Si hay vesículas, romper con una aguja la epidermis de estas, absorber el líquido con una torunda previamente y realizar el frotis a continuación. Cortar con tijeras el mango de la torunda, introducir en un tubo con MTV y cerrar bien.

7.2. PROCESAMIENTO PREVIO

- Agitar el tubo de MTV en un *vórtex* para liberar las células atrapadas en el material del hisopo.
- Con una pipeta Pasteur, pasar alrededor de 1,5 ml del MTV a un tubo de fondo cónico y centrifugar a una velocidad mínima de 5.000 rpm.
- Una vez centrifugado, eliminar el sobrenadante sobre recipiente con lejía dejando un pequeño volumen de líquido (alrededor de 50 µl) que se utilizará para resuspender el sedimento con ayuda de una pipeta Pasteur.

7.3. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Colocar una gota del sedimento bien resuspendido (aproximadamente 25-30 µl) en un porta con pocillos para fluorescencia. La prueba se hace por

Servicio de Microbiología	Detección directa del virus varicela-zóster en lesiones cutáneas mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-VIR-03	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 3 de 4

duplicado. Puede utilizarse un porta para varias muestras, si fuese preciso.

- Rotular el número de muestra en el porta, anotando los pocillos que corresponden a cada muestra.
- Dejar secar al aire o en el secador de preparaciones.
- Fijar el porta sumergiéndolo en acetona fría (-20°C, congelador de un frigorífico) durante 10 minutos. Una vez transcurridos, secar al aire.
- Los portas fijados pueden conservarse en congelador a una temperatura de -70°C o inferior durante 7 días.

7.4. TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Colocar una gota (20 µl son suficientes) del anticuerpo monoclonal anti-VVZ correspondiente sobre el pocillo con la muestra fijada.
- Incubar en cámara húmeda a 37±2°C durante 25-30 minutos.
- Lavar el porta sumergiéndolo en PBS dos veces.
- Dejar secar al aire o con ayuda de un secador, en frío.
- Añadir 20 µl de conjugado de cabra anti-ratón, el mismo que se utiliza en otras técnicas de IFI.
- Incubar durante 25-30 minutos en cámara húmeda, a 37±2 °C.
- Lavar dos veces (3-5 minutos) en PBS.

7.5. LECTURA E INTERPRETACIÓN

- Colocar una gota de líquido de montaje para fluorescencia (glicerina tamponada) y un cubre encima, y proceder a la lectura en el microscopio de fluorescencia. Puede hacerse un barrido con objetivo 20X y confirmar a mayor aumento en caso de duda.
- En caso de positividad, el reactivo monoclonal proporciona una fluorescencia de membrana, apreciándose el citoplasma celular contrastado en rojo (azul de Evans) rodeado de un reborde fluorescente verde manzana (ver ANEXO 1).
- La muestra se considerará positiva sólo cuando se aprecien, al menos, 3 células características entre los dos pocillos de la preparación.
- Las células que no expresan el antígeno vírico presentan una coloración roja uniforme.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Si se aprecia el mínimo de 3 células características, la prueba es positiva: expresarla como "Positiva".
- En caso contrario, expresarla como "Negativa".
- Cuando no se observen más de 10 células teñidas de rojo (contratinción con el azul de Evans), la prueba debe informarse como "Indeterminada" o "No valorable".

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: Supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- La detección directa de antígenos del VVZ se considera la prueba diagnóstica de referencia, pero su fiabilidad está condicionada a la obtención de una muestra de calidad.
- Los mejores resultados se obtienen sobre lesiones vesiculosas, recientes. Es recomendable tomar muestras de varias de estas lesiones.
- Habitualmente no se incluyen controles positivos ni negativos, ya que esto implicaría mantener cultivos con VVZ; si bien, su utilización cubriría la eventualidad de un fallo en la tinción o de una alteración del anticuerpo monoclonal.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Como se ha repetido, la calidad del resultado depende en gran medida de la presencia de celularidad en la preparación, esto es, de la calidad de la muestra.
- Es posible obtener resultados positivos a partir de lesiones evolucionadas (en fase de costra), pero la sensibilidad es menor (pero claramente superior al cultivo celular).
- Del mismo modo, el tratamiento antivírico (aciclovir o derivados) interfiere con los resultados, en tanto que mejoran las lesiones. Sin embargo, en estas circunstancias, la única posibilidad diagnóstica es la detección de antígeno, pues el cultivo es uniformemente negativo.

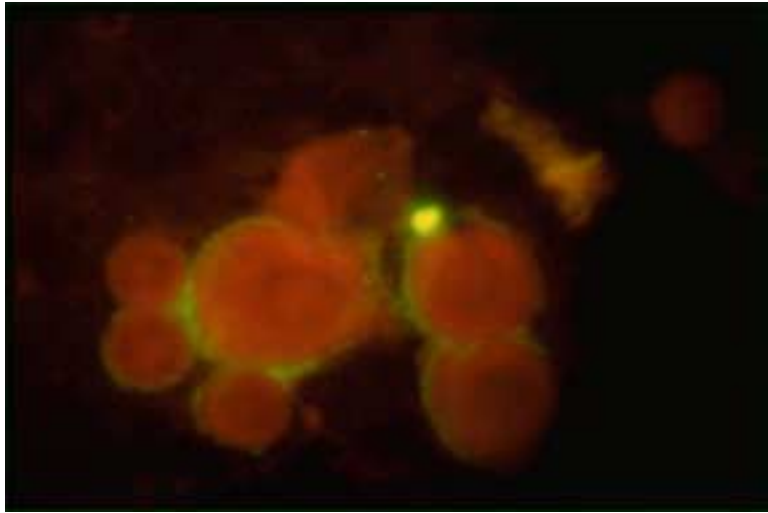
12. BIBLIOGRAFÍA

1. Geshon AA, LaRussa P, Steinberg SP. Varicella-zoster virus. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology (8ª ed). Washington: ASM Press 2003; pp. 1319-1330.
2. Pérez JL, García A, Niubò J, Salvà J, Podzamczar D, Martín R. Comparison of techniques and evaluation of three commercial monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of varicella-zoster mucocutaneous infections. J Clin Microbiol 1994; 32:1610-1613.

Servicio de Microbiología	Detección directa del virus varicela-zóster en lesiones cutáneas mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-VIR-03	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 4

13. ANEXOS

ANEXO 1. Imagen de un célula que expresa el antígeno del VVZ (muestra positiva).



Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos en cultivo (<i>shell vial</i>) para el citomegalovirus y para otros virus	Fecha: PNT-VIR-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo que persigue esta técnica es detectar la presencia de un antígeno inmediato-precoc del citomegalovirus (CMV) en los cultivos celulares de fibroblastos infectados con muestras en las que se sospecha la presencia del virus. Con las variaciones pertinentes, la prueba también es aplicable como procedimiento de detección e identificación a otros virus que crezcan en este substrato celular, como el virus varicela zóster.

Se aplica sobre muestras de todo tipo remitidas al laboratorio de virología del Servicio de Microbiología de este hospital, en las que se solicite la detección por cultivo del CMV (o de otros virus, con las variaciones correspondientes).

2. FUNDAMENTO

Los métodos convencionales de cultivo del CMV basados en el desarrollo del efecto citopático tienen el inconveniente de retrasar la obtención de los resultados. La detección de los antígenos inmediato-precoc mediante técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales aplicadas a cultivos sobre viales (*shell vial*) permite observar la presencia del CMV en los cultivos tras 18 horas de incubación, con lo que se adelanta el diagnóstico. Por otra parte, la detección de antígenos en cultivos *shell vial* puede aplicarse a la identificación de los cultivos convencionales del CMV, y también a cualquier otro virus que crezca en este substrato o, con las variaciones pertinentes, en otros cultivos celulares.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras
- Manual de preparación de medios y reactivos del laboratorio de virología
- Preparación de tubos y viales con cultivos celulares
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. TOMA DE LA MUESTRA

La prueba se aplica, como procedimiento de detección e identificación, a cualquier muestra clínica. Antes, deben ser sometidas a un procesamiento previo acorde con el tipo de muestra de que se trate. Como procedimiento de identificación, la prueba *shell vial* se aplica sobre cualquier cultivo en el que se detecte un efecto citopático compatible con un CMV y que se pretenda identificar o tipificar.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. CULTIVOS CELULARES

- Viales de plástico de fondo plano, de 15 mm de diámetro externo (5-6 ml de capacidad aproximada), con tapón, conteniendo una monocapa confluyente de fibroblastos humanos

(MRC-5, WI-38, o equivalentes), formada sobre un cubreobjetos redondo de 12 mm de diámetro.

Estos viales se preparan normalmente en el propio laboratorio de virología (al menos 72 horas antes), según lo establecido en el procedimiento "Preparación de tubos y viales con cultivos celulares", a razón de 50.000 células/ml. También son aceptables los cultivos *shell vial* de procedencia comercial y calidad controlada por el fabricante y el laboratorio de virología.

5.2. REACTIVOS

Deben seguirse las instrucciones oportunas contenidas en los documentos correspondientes.

- Medio de crecimiento de virus (alternativamente, medio de mantenimiento de virus).
- Tampón fosfato salino (PBS) de pH=7,2, de procedencia comercial, estéril.
- Metanol 98-100% V/V.
- Resina histológica Entellan® (Ref. Merck 7960) o similar (DPX, Renhistol, etc.).
- Azul de Evans al 1:50.000 en PBS.
- Anticuerpo monoclonal murino frente al antígeno inmediato-precoc del CMV de 72 kD. Se utilizará aquél que se haya adjudicado en el suministro. La dilución de trabajo será la determinada previamente por el laboratorio para cada lote (sobre azul de Evans 1:50.000 en PBS). Se reparte en alícuotas de 300 µL y se conserva a -20 °C.
- Anticuerpo anti-ratón (IgG) conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Algunos sistemas comerciales lo incluyen en un equipo diagnóstico. Son válidos los conjugados fluorescentes incluidos en estos equipos, siempre que tengan reactividad anti-ratón. La dilución de trabajo será la determinada previamente por el laboratorio para cada lote.
- Glicerina tamponada pH=8.

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de flujo laminar vertical, de nivel de bioseguridad tipo 2.
- Centrífuga con cestillos y adaptadores para los viales, hasta 4.000 x g.
- Estufa de CO₂, o convencional.
- Incinerador de asas bacteriológicas.
- Secador de aire convencional para cabello.
- Microscopio de fluorescencia con filtros para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.

6.2. MATERIALES

- Pipetas Pasteur estériles.
- Aguja enmangada con hilo de *nichrom*.
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubreobjetos de vidrio.
- Recipientes para lavado de los portaobjetos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos en cultivo (shell vial) para el citomegalovirus y para otros virus	Fecha: PNT-VIR-04
		Edición Nº 01 Página 3 de 5

- Cámara húmeda.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión sanguínea establecidas en el documento "Manual de bioseguridad". Muy en particular, hay que usar guantes durante la manipulación de las muestras o cualquier material en contacto con éstas.
- El desecho de residuos debe realizarse de acuerdo con lo establecido en el documento "Gestión de residuos"

7. PROCESAMIENTO

7.1. INOCULACIÓN DE LOS VIALES

- Rotular los viales con el número de laboratorio y la fecha de inoculación. Si se dispone de ellas, utilizar preferentemente las etiquetas adhesivas creadas por el sistema informático del Servicio de Microbiología.
- Antes de inocular, eliminar el medio MEM de los viales.
- Se inoculan 0,2 ml de las muestras pre-procesadas (8 gotas de pipeta Pasteur aprox.).
- El número de viales a sembrar será de 2. En algunos casos, según las características clínicas y a juicio del facultativo responsable del laboratorio, se podría incrementar el número de viales.
- Centrifugar a 3.300 x g durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Alternativamente, también puede utilizarse un programa de 700 x g durante 45 minutos.
- Mantener en adsorción 1 hora a 37±2 °C. Eliminar el resto de la muestra.
- Añadir 2 ml de medio de crecimiento (preferiblemente) o de mantenimiento e incubar a 37±2 °C, en la estufa de CO₂ con los tapones parcialmente abiertos, o cerrados si se utiliza una estufa convencional. Proceder a la fijación y posterior lectura de los viales al cabo de 16-18 horas (primer vial) o de 48 horas (segundo vial).

7.2. FIJACIÓN DE LOS VIALES

- Tras la incubación, sacar los viales de la estufa y desechar el medio de cultivo sobrenadante.
- Lavar cada vial con 1 ml de PBS pH=7,2, dejar humedecer 15 segundos y desechar.
- Repetir el proceso anterior dos veces más.
- Añadir 1 ml de metanol absoluto y mantenerlo durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
- Eliminar el metanol y lavar tres veces con PBS, como en los pasos anteriores. Desechar el líquido del último lavado.
- Guardar los viales en nevera a 2-8 °C si no se va a proceder a su tinción.

7.3. TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

- Con la ayuda de la aguja enmangada, que se ha puesto al rojo con el incinerador, pinchar el fondo del vial para que se separe el cubreobjetos redondo que contiene la monocapa. Si se pincha en el centro es más probable la rotura accidental del cubreobjetos.
- Retirar cuidadosamente el cubreobjetos con unas pinzas. Secar completamente con el secador (aire frío), procurando dañar lo menos posible la monocapa.
- Marcar el portaobjetos con el número de las muestras (utilizar un lápiz de grafito, nunca rotuladores). Poner una gota de resina Entellan®.
- Pegar los cubreobjetos sobre la gota de resina de los portaobjetos, con la capa de células hacia arriba. Una manera práctica de conocer cuál es la cara que contiene la monocapa es observando el reflejo del filamento de una bombilla sobre el cubreobjetos (el lado de la monocapa es mate). Dejar que la resina seque bien (al menos 20 minutos).
- Añadir 30 µL de la solución de trabajo de monoclonal sobre cada cubreobjetos. Repartir cuidadosamente sobre toda la monocapa.
- Incubar los portaobjetos (con sus cubreobjetos correspondientes pegados) a 37±2 °C en una cámara húmeda, durante 45 minutos.
- Lavar con PBS introduciendo los portas durante 3 minutos. Secar con el secador frío.
- Añadir 30 µL de conjugado anti-IgG de ratón y extenderlo sobre toda la superficie del cubreobjetos.
- Incubar los portaobjetos a 37±2 °C durante 30 minutos.
- Después de esta segunda incubación, lavar dos veces con PBS durante 3 minutos.
- Secar con un secador frío y montar las preparaciones con una gota de glicerina tamponada.

7.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

- Observar la preparación en un microscopio de fluorescencia, a un aumento total aproximado de 200X (objetivos de 16X-20X). Confirmar, si es necesario, con el objetivo 40X.
- Barrer completamente la preparación, de arriba abajo y de izquierda a derecha. Para el CMV, se considera positiva si se observa, al menos, un núcleo de fibroblasto con fluorescencia verde-manzana y morfología ovalada característica.
- Para otros virus distintos del CMV, el patrón de fluorescencia dependerá del tipo de antígeno que detecte el anticuerpo monoclonal en cuestión.
- En el ANEXO 1 se incluyen imágenes microscópicas con ejemplos de patrones de fluorescencia para diferentes virus.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos en cultivo (shell vial) para el citomegalovirus y para otros virus	Fecha: PNT-VIR-04	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

7.5. PUNTOS CRÍTICOS EN LA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

No existen puntos especialmente críticos, fuera de la realización escrupulosa de toda técnica de virología. Se deben manipular con cuidado los cubreobjetos para que no se rompan, se dañe la monocapa o se eliminen con el secador.

7.6. CONTROL DE CALIDAD

- El habitual de control de los reactivos.
- Cada nuevo lote de viales de fibroblastos deberá ser contrastado con un control positivo (un cultivo del CMV), según se establece en el documento "Preparación de tubos y viales con cultivos celulares". El resultado se consignará en el registro de control de calidad de reactivos correspondiente.
- Mantenimiento y reposición de la lámpara de fluorescencia del microscopio cada 3.000 horas. Conviene comprobar el centrado de la lámpara a intervalos regulares, dependiendo del uso que se le dé al microscopio.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Para ser valorable, la preparación debe mantener, al menos, un 20% de la superficie de la monocapa celular. Si no es así, el resultado se debe expresar como "Muestra tóxica: resultado no valorable", excepto si, aún en estas condiciones, se observara una imagen microscópica típica (ANEXO 1), lo que indicaría positividad de la prueba (resultado cualitativo).
- Si es positiva, referir el resultado semicuantitativamente, según el siguiente esquema:

Cuantificación	Resultado
1-foco	Positivo (+)
10-20 focos	Positivo (++)
> 20 focos	Positivo (+++)

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.

- Facultativo responsable: Supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La positividad de la prueba *shell vial* de CMV indica la presencia de viriones en la muestra, esto es, demuestra que el paciente sufre una infección activa, con replicación del virus. La infección activa no supone necesariamente que el virus sea responsable del cuadro clínico del paciente: deberán valorarse conjuntamente otros datos clínicos y virológicos, como las características del paciente, manifestaciones clínicas, tipo de muestra, etc.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La mayor limitación de la prueba *shell vial* es que exacerba la toxicidad de las muestras sobre la monocapa celular. Esto es especialmente cierto en muestras como la sangre (fracción leucocitaria, biopsias y muestras de tejidos, precisamente aquéllas en las que mayor significado clínico tiene la detección del virus.
- La sensibilidad de este método es insuficiente para llevar a cabo la estrategia de prevención de la enfermedad por CMV conocida como "tratamiento preventivo" (*preemptive therapy*), aunque hay una cierta correlación entre la semicuantificación y el riesgo de desarrollo próximo de la enfermedad. Si se adopta esta estrategia preventiva, es obligado disponer de otras técnicas de detección de la carga vírica del CMV (pruebas de antigenemia o moleculares)

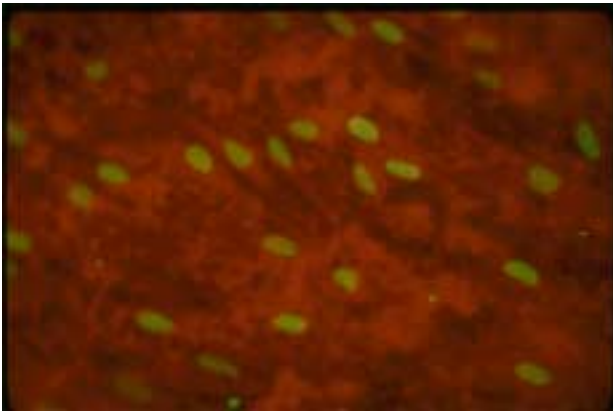
12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19:917-919.
2. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21:217-221.
3. Mendoza J, Navarro JM, De la Rosa M. Utilización de la técnica de centrifugación-cultivo para el diagnóstico rápido de citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989; 7:403-407.
4. Rabella N, Drew WL. Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 1990; 28:806-808.

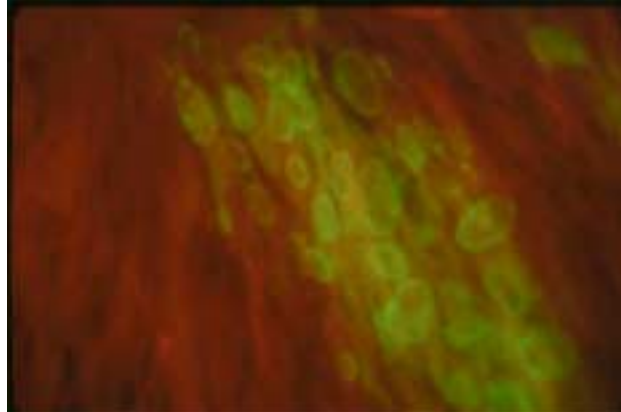
Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígenos en cultivo (<i>shell vial</i>) para el citomegalovirus y para otros virus	Fecha: PNT-VIR-04	
Edición N° 01		Página 5 de 5	

13. ANEXOS

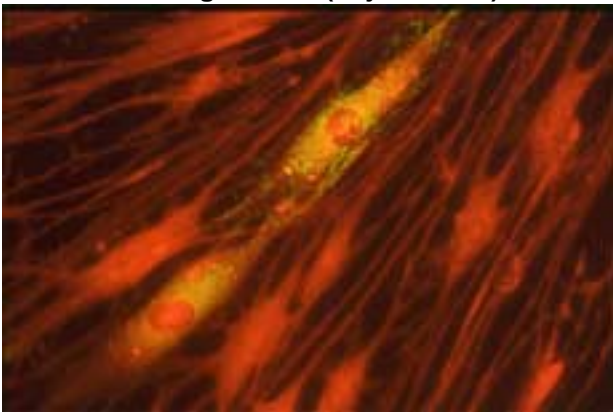
ANEXO 1. Microfotografías de fluorescencia con imágenes de virus en *shell vial*.



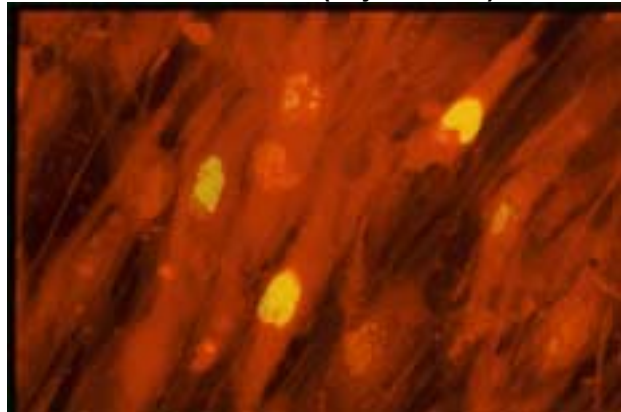
Citomegalovirus (objetivo 40X)



Varicela-zóster (objetivo 63X)



Virus respiratorio sincitial (objetivo 100X)



Adenovirus (objetivo 63X)

Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo que persigue esta técnica es detectar presencia del antígeno pp65 del citomegalovirus (CMV) en los leucocitos de sangre periférica y cuantificar así la carga vírica.

Se aplica sobre las muestras de sangre anticoagulada remitidas al laboratorio de virología del Servicio de Microbiología de este hospital, en las que se solicite la prueba de antigenemia pp65 de CMV.

2. FUNDAMENTO

La infección por el CMV (primaria o reactivación) puede cursar con la presencia de un antígeno tardío (*late*), llamado pp65, en los leucocitos de sangre periférica. La técnica consiste en extraer los leucocitos y, una vez lavados, contarlos, y depositar una cantidad conocida de ellos en un portaobjetos. Luego, éste se tiñe con un anticuerpo monoclonal anti-pp65 por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y se lee en el microscopio de fluorescencia. El número de leucocitos que expresan dicho antígeno se correlaciona con la carga vírica sanguínea y con la presencia de síntomas (enfermedad por CMV). Por lo tanto, la prueba de antigenemia pp65 tiene valor diagnóstico y puede utilizarse como criterio de la eficacia del tratamiento.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras
- Manual de preparación de medios y reactivos
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. TOMA DE LA MUESTRA

Las condiciones de la muestra están descritas en el "Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras". La prueba se aplica normalmente sobre sangre completa anticoagulada con EDTA. Se requieren 10 ml de sangre. Son aceptables las muestras de sangre remitidas con otros anticoagulantes, como heparina o citrato sódico.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Para la preparación de reactivos propios del laboratorio deben seguirse las instrucciones específicas de preparación, control, conservación, etc., consignadas en el documento "Manual de preparación de medios y reactivos".

- Solución de dextrano al 6% P/V en suero fisiológico (NaCl al 0,9% P/V en agua), estéril.
- Solución de cloruro amónico al 0,8% P/V en agua destilada, estéril.
- Tampón fosfato salino (PBS) de pH=7,2, de procedencia comercial, estéril.
- Solución de formaldehído 5%-sacarosa 2% en PBS; no requiere esterilidad.
- Anticuerpo monoclonal murino anti-pp65, de procedencia comercial. Se utilizará aquel que, en

ese momento se haya adjudicado comercialmente, previa evaluación de la calidad. La dilución de trabajo será la especificada en el producto comercial vigente en ese momento o determinada por la evaluación previa.

- Anticuerpo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Algunos sistemas comerciales lo incluyen en un equipo diagnóstico, junto con el anticuerpo primario anti-pp65. Se seguirán las instrucciones del fabricante para obtener la dilución de trabajo.
- Glicerina tamponada pH=8.

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Centrífuga de tubos convencional.
- Citocentrífuga Shandon Cytospin 3. Alternativamente, pueden emplearse otros modelos de la misma marca y que utilicen los embudos de citocentrifugación que se describen a continuación.
- Agitador orbital tipo *vortex*.
- Contador hematológico (Servicio de Hematología), o cámara hematocimétrica (tipo Neubauer o Fuchs-Rosentäl).
- Secador de aire convencional para cabello.
- Microscopio de fluorescencia con filtros para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.

6.2. MATERIALES

- Tubos estériles de plástico de fondo cónico, de 10 ml de capacidad.
- Tubos estériles de un volumen mínimo de 5 ml, con tapón.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubreobjetos de vidrio.
- Embudos de citocentrifugación para la centrífuga Shandon (ref. Shandon 5991040).
- Recipientes para lavado de los portaobjetos.
- Cámara húmeda.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión sanguínea establecidas en el documento "Manual de bioseguridad". Muy en particular, hay que usar guantes durante la manipulación de las muestras de sangre y los extractos leucocitarios.
- El formaldehído es un compuesto altamente tóxico. No debe entrar en contacto con la piel ni las mucosas. Debe eliminarse de acuerdo con lo establecido por el Plan de Residuos vigente en el hospital y por el documento "Gestión de residuos".

7. PROCESAMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DE LOS LEUCOCITOS

- En un tubo estéril con fondo cónico, de 10 ml, añadir 1 ml de solución salina de dextrano.

Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 3 de 7

Atemperar a 37 ± 2 °C en estufa durante 15-20 minutos.

- Añadir 3-6 ml de la muestra de sangre, también atemperada a 37 ± 2 °C.
- Homogeneizar y dejar en reposo en posición vertical, en estufa a 37 ± 2 °C y con el tapón algo flojo, durante 30 minutos aproximadamente.
- Recoger 2-3 ml del sobrenadante (plasma + leucocitos) en un tubo con 5 ml de PBS.
- Centrifugar a 1.000 rpm, 5 minutos, a temperatura ambiente. Este programa puede estar registrado en la memoria de algunas centrifugas. En este caso, asegurarse que este programa cumple las especificaciones.
- Retirar el sobrenadante por inversión del tubo.
- Añadir a los leucocitos sedimentados 2 ml de cloruro amónico al 0,8 % frío para lizar los eritrocitos residuales. Agitar en *vortex* para resuspenderlos. El tiempo de contacto de las células con este reactivo debe ser de 2-4 minutos sin sobrepasarlo nunca.
- Añadir 3 ml de PBS sobre la suspensión y centrifugar en las condiciones anteriores.
- Retirar el sobrenadante por inversión y resuspender el sedimento en 2 ml de PBS por agitación en *vortex*. Repetir el proceso de lavado y centrifugado de las células 2 veces más.
- Contar el número de leucocitos en el contador hematológico y ajustar la suspensión con PBS hasta 1×10^6 células/ml. El ajuste del recuento se facilita siguiendo el ANEXO 1 de este procedimiento.
- Citocentrifugar 200 µl de esta suspensión (200.000 leucocitos) a 700 rpm durante 7 minutos en una centrífuga Shandon® sobre portas limpias y previamente rotulados. Si el recuento inicial es muy bajo (muestras leucopénicas) se pueden alcanzar las 2×10^5 células mediante el ajuste del volumen de suspensión a centrifugar (ANEXO 1). En cualquier caso, el número mínimo de células en la preparación no será inferior a 10^5 leucocitos. Si no se puede realizar la citocentrifugación de inmediato, es necesario guardar la suspensión de leucocitos en hielo o en nevera a 2-8 °C.
- Dejar secar los portas al aire después de centrifugar.

7.2. FIJACIÓN DE LAS PREPARACIONES

- Sumergir los portas durante 10 minutos en una solución de formaldehído-sacarosa-PBS.
- Lavarlos durante 3 minutos en PBS.
- Secar con secador de aire frío. **Atención:** no hay que utilizar nunca el secador en posición de aire caliente.

7.3. TINCIÓN POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

- Cubrir el depósito celular de la preparación con una gota de anticuerpo monoclonal murino frente a la fosfoproteína de matriz pp 65.

- Incubar las preparaciones 30-45 min a 37 ± 2 °C, en cámara húmeda.
- Lavar 5 minutos en PBS.
- Secar con secador de aire frío.
- Cubrir con una gota de conjugado fluorescente (anticuerpos anti-ratón marcados con fluoresceína).
- Incubar 30 minutos a 37 ± 2 °C en cámara húmeda.
- Lavar las preparaciones en PBS durante 3 minutos.
- Secar con secador de aire, en frío.
- Montar las preparaciones con glicerina tamponada pH=8.

7.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

- Observar la preparación en un microscopio de fluorescencia, a un aumento total aproximado de 200X (objetivos de 16X-20X). Confirmar, si es necesario, con el objetivo de 40X.
- Barrer completamente la preparación, de arriba abajo y de izquierda a derecha. Se considera positiva si se observa, al menos, un núcleo con fluorescencia verde-manzana con morfología característica de leucocito polimorfonuclear (ANEXO 2).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si la prueba es positiva, contabilizar el número de células positivas y referir la cifra sobre 10^5 leucocitos totales.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: Supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La cifra de antigenemia se correlaciona con la carga vírica, y ésta con la presencia de síntomas. Sin embargo, la interpretación de los resultados está sometida al conocimiento y la experiencia de cada centro.

En general, no se incluyen controles positivos ni negativos en la realización de esta técnica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La leucopenia, lo que es más frecuente en los transplantados de precursores hematopoyéticos, puede limitar la realización de la técnica y la precisión del resultado obtenido.

Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 4 de 7

- Muchas infecciones activas por el CMV cursan en ausencia de sintomatología clínica: es posible obtener pruebas de antigenemia positivas (infección) sin que se presenten síntomas (enfermedad).
- El valor de antigenemia se correlaciona con la enfermedad, pero el valor umbral que diferencia infección de enfermedad se debe obtener en función del tipo de paciente, la potencia del régimen de inmunosupresión y las características de realización de la técnica en cada centro. Los valores de otros laboratorios sólo se pueden utilizar como guía preliminar.
- Algunos cuadros de enfermedad focal por CMV pueden cursar con cifras de antigenemia baja: retinitis en los pacientes con SIDA, enfermedad gastrointestinal.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:533-534.
2. Grossi P, Minoli L, Percivalle E, Irish W, Viganò M, Gerna G. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation* 1995; 59:847-851.
3. Niubò J, Pérez JL, Martínez-Lacasa JT *et al.* Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24:19-24.
4. Pérez JL, Salvà J, Niubò J. La prueba de antigenemia para citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:251-269.
5. The TH, Van der Ploeg M, Van den Berg AP, *et al.* Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes. A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54:193-198.

Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 7

13. ANEXOS

- ANEXO 1. Ajuste de la concentración leucocitaria para la citocentrífuga.
- ANEXO 2. Microfotografía de fluorescencia de una muestra positiva.

ANEXO 1. Ajuste de la concentración leucocitaria para la citocentrífuga.

Recuento Leucocitario (x10⁶)	Volumen de PBS (µL)	Volumen suspensión (µL)	Volumen citocentrífuga (µL)
0,5	--	--	400
0,6	--	--	333
0,7	--	--	286
0,8	--	--	250
0,9	--	--	222
1,0	--	--	200
1,1	--	--	200
1,2	100	500	200
1,3	200	700	200
1,4	200	500	200
1,5	100	200	200
1,6	300	500	200
1,7	200	300	200
1,8	400	500	200
1,9	200	200	200
2,0	200	200	200
2,1	200	200	200
2,2	600	500	200
2,3	900	700	200
2,4	700	500	200
2,5	300	200	200
2,6	800	500	200
2,7	500	300	200
2,8	200	100	200
2,9	200	100	200
3,0	200	100	200
3,1	200	100	200
3,2	200	100	200
3,3	700	300	200
3,4	500	200	200
3,5	500	200	200
3,6	500	200	200
3,7	800	300	200
3,8	300	100	200
3,9	300	100	200
4,0	300	100	200
4,1	300	100	200
4,2	300	100	200
4,3	1000	300	200
4,4	700	200	200

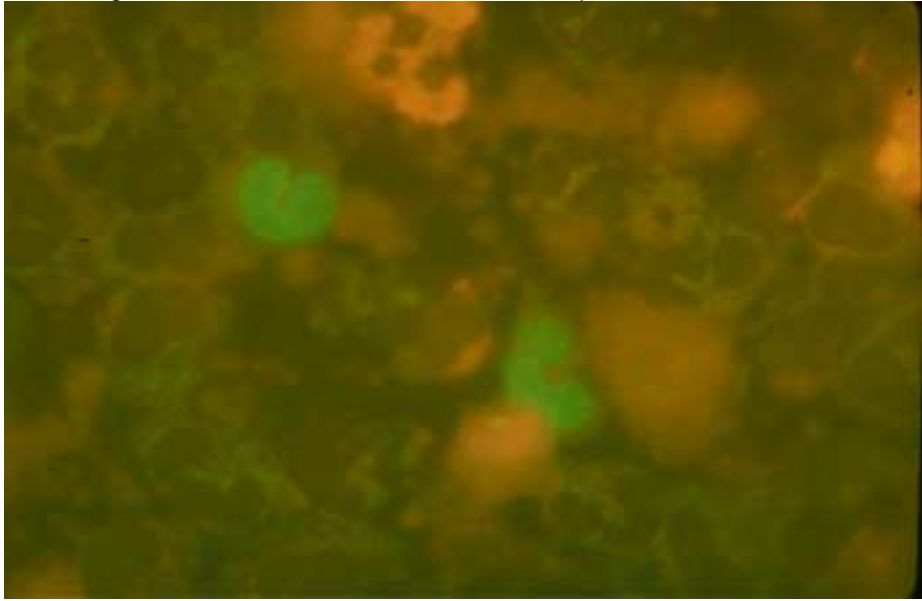
Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 6 de 7

ANEXO 1. Ajuste de la concentración leucocitaria para la citocentrífuga (continuación).

Recuento leucocitario ($\times 10^6$)	Volumen de PBS (μL)	Volumen suspensión (μL)	Volumen citocentrífuga (μL)
4,5	700	200	200
4,6	700	200	200
4,7	1100	300	200
4,8	400	100	200
4,9	400	100	200
5,0	400	100	200
5,1	400	100	200
5,2	400	100	200
5,3	1300	300	200
5,4	900	200	200
5,5	900	200	200
5,6	900	200	200
5,7	1400	300	200
5,8	500	100	200
5,9	500	100	200
6,0	500	100	200
6,1	500	100	200
6,2	500	100	200
6,3	1100	200	200
6,4	1100	200	200
6,5	1100	200	200
6,6	1100	200	200
6,7	1100	200	200
6,8	600	100	200
6,9	600	100	200
7,0	600	100	200
7,1	600	100	200
7,2	600	100	200
7,3	1300	200	200
7,4	1300	200	200
7,5	1300	200	200
7,6	1300	200	200
7,7	1300	200	200
7,8	700	100	200
7,9	700	100	200
8,0	700	100	200
8,1	700	100	200
8,2	700	100	200

Servicio de Microbiología	Prueba de antigenemia pp65 de citomegalovirus	Fecha: PNT-VIR-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 7 de 7

ANEXO 2. Microfotografía de fluorescencia de una muestra positiva.



Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de la avidéz IgG anti-VCA del virus de Epstein-Barr	Fecha: PNT-VIR-06	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de esta técnica es determinar el índice de avidéz de los anticuerpos IgG anti-VCA (complejo antigénico de la cápside vírica) del virus de Epstein-Barr (VEB).

La prueba se lleva a cabo con suero obtenido de forma convencional, remitido al laboratorio de serología del Servicio de Microbiología de este hospital junto a un volante de petición en que se solicite la prueba mencionada.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de la primoinfección sintomática (mononucleosis infecciosa) por el VEB se lleva a cabo mediante procedimientos serológicos (determinación de anticuerpos heterófilos y de anticuerpos específicos frente a distintos complejos antigénicos del VEB); ocasionalmente estos métodos no permiten alcanzar un diagnóstico incontrovertible de la enfermedad. El conocimiento del índice de avidéz (IA) de las IgG anti-VCA permite inferir el tiempo de evolución de la infección y, en consecuencia, ayuda a establecer el diagnóstico de primoinfección. El procedimiento aludido se basa en lo siguiente: (i) durante la respuesta inmunológica primaria frente a un agente infeccioso cualquiera se generan IgGs cuya avidéz (fuerza con que se unen a un antígeno) aumenta a medida que aquélla madura; (ii) los inmunocomplejos formados por un antígeno e IgGs de baja avidéz se desunen con facilidad en presencia de agentes caotrópicos (urea). El IA suele determinarse mediante ELISA, aunque puede obtenerse también mediante inmunofluorescencia (IF). En ambos casos el suero del enfermo se incuba en duplicado con el antígeno elegido; después de lavar, se añade a una de las reacciones una solución de urea 6-8 M (a la otra, suero fisiológico). Finalmente se compara la "reactividad" del suero problema tratado y sin tratar con urea.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras
- Normas de bioseguridad
- Gestión de residuos

4. TOMA DE LA MUESTRA

Las condiciones de la muestra están descritas en el procedimiento de "Recogida y procesamiento de muestras". La prueba se lleva a cabo sobre muestra de suero. Se requieren 10 ml de sangre.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Para la preparación de reactivos propios del laboratorio deben seguirse las instrucciones específicas de preparación, control, conservación, etc., consignadas en el documento "Manual de preparación de medios y reactivos".

- Kit ELISA comercial (anticuerpos IgG anti-VCA del VEB)
- Solución de urea 8 M en tampón fosfato salino (PBS) –pH=7,2-.

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Centrífuga de tubos convencional.
- Espectrofotómetro convencional

6.2. MATERIALES

- Estufa de 37 °C
- Puntas de micropipeta estériles
- Micropipetas calibradas

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión sanguínea establecidas en el documento "Manual de bioseguridad".

7. PROCESAMIENTO

7.1 PROCEDIMIENTO

Se emplea un *kit* ELISA comercial (IgG anti-VCA), por tanto han de seguirse escrupulosamente las instrucciones del fabricante.

- Diluir convenientemente el suero problema y dispensar el volumen requerido en duplicado. Añadir los controles positivos y negativos proporcionados por el fabricante así como un suero control de baja avidéz IgG anti-VCA y otro de alta avidéz previamente caracterizados.
- Incubar a 37°C el tiempo recomendado por el fabricante
- Lavar 3 veces con el tampón de lavado suministrado en el *kit*.
- Añadir a uno de los dos pocillos problema 200 µl de una solución 8 M de urea en PBS e incubar durante 5 minutos a 37°C. Añadir al otro pocillo 200 µl de PBS (en vez de PBS con urea).
- Lavar 3 veces con tampón de lavado.
- Añadir el conjugado e incubar el tiempo requerido.
- Lavar como se indicó anteriormente.
- Añadir el sustrato e incubar a temperatura ambiente en lugar oscuro durante 30 minutos.
- Añadir la solución de parada.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Leer las absorbancias en espectrofotómetro (450 nm).
- El IA se calcula del siguiente modo:

$$IA = \frac{\text{Absorbancia suero problema con urea}}{\text{Absorbancia suero problema sin urea}} \times 100$$
- La interpretación es la siguiente:
 - IA=<50%: infección reciente. Apoya el diagnóstico de primoinfección.
 - IA=50-80%: indeterminado.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de la avidéz IgG anti-VCA del virus de Epstein-Barr	Fecha: PNT-VIR-06	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- IA=>80%: infección pasada, primoinfección poco probable.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

No procede.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La información obtenida mediante la prueba de la avidéz IgG anti-VCA complementa la conseguida mediante los métodos serológicos clásicos (anticuerpos heterófilos y anticuerpos IgG e IgM anti-VCA e IgG anti-EBNA1); esta prueba no debe efectuarse, por tanto, de forma aislada.

- La cinética de maduración de la respuesta humoral primaria varía individualmente, lo que condiciona el valor absoluto de la prueba.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Andersson A, Vetter V, Kreutzer L, Bauer G. Avidities of IgG against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol* 1994; 43:238-244.
2. Gray JJ. Avidity of EBV VCA-specific IgG antibodies. Distinction between recent primary infection, past and reactivation. *J Virol Methods* 1995;52:95-104.
3. Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U, Hickie I, Lloyd A. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 2003; 70:617-23.
4. Shubert J, Zens W, Weissbrich B. Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections. *J Clin Virol* 1998; 11:161-172.

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el proceso para detectar la presencia de ADN de algunos de los virus de la familia *Herpesviridae* implicados en procesos neurológicos en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y, de forma alternativa, en otras muestras, mediante una PCR múltiple, utilizando iniciadores específicos para amplificar el ADN de los virus del herpes simple tipos 1 y 2 (VHS1 y VHS2), virus varicela-zoster (VVZ), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipo 6 (HVV6) y del virus de Epstein Barr (VEB).

Este procedimiento se aplica en el laboratorio de microbiología molecular del Servicio de Microbiología de este hospital.

2. FUNDAMENTO

La infección por los virus de la familia *Herpesviridae* lleva consigo la replicación del ADN de dichos virus, que puede detectarse con el empleo de una técnica de doble amplificación (*nested*) utilizando una mezcla de iniciadores específicos frente a los virus VHS1 y VHS2, VVZ, CMV, HVH6 y VEB. La diferencia en el tamaño del fragmento de ADN amplificado permite su detección en un gel de agarosa en el que se visualizan los diferentes amplificados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento de recogida y procesamiento de muestras.
- Manual de preparación de medios y reactivos.
- Normas de bioseguridad.
- Gestión de residuos.
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos (centrífuga, baño, termociclador, centrífuga de vacío, fuente y cubetas de electroforesis)
- Protocolo de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. TOMA DE LA MUESTRA

Las condiciones de las muestras están descritas en el procedimiento de "Recogida y procesamiento de muestras". Esta técnica se aplica básicamente al diagnóstico de los virus antes reseñados en LCR. Alternativamente, podría aplicarse a cualquier otra muestra biológica con contenido celular (líquido vesicular, plasma, orina, exudado genital, raspado de úlceras, humor vítreo, etc.). La eficiencia de la técnica está condicionada a una buena obtención de la muestra, y fundamentalmente al uso de un procedimiento de extracción de ADN adecuado al tipo de muestra, esto es, más agresivo cuanto más componentes celulares o proteicos tenga la muestra.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS

- **Iniciadores:**

Virus	Secuencias iniciadores	Tamaño amplicones (pb)
VHS1 y VHS2 1ª ampl	<i>Sense</i> - CGCATCATCTACGGGGACACGGA <i>Antisense</i> - ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT	194
VHS1 y VHS2 2ª ampl	<i>Sense</i> - GTGTTGTGCCGCGGTCTCAC <i>Antisense</i> - GGTGAACGTCTTTTCGAACTC	120
VVZ 1ª ampl	<i>Sense</i> - AAGGTTATATATGGAGATACGGA <i>Antisense</i> - ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT	194
VVZ 2ª ampl	<i>Sense</i> - TGAGGGGATAGCTAAAATCG <i>Antisense</i> - TATAAAAGTTTTTTCACACTC	98
CMV 1ª ampl	<i>Sense</i> - AAGGTCATCTACGGGGACACGGA <i>Antisense</i> - ACTTTGCCGATGTAACGTTTCTT	194
CMV 2ª ampl	<i>Sense</i> - GGGCCAGCCTGGCGCACTA <i>Antisense</i> - GACGAAGACCTTTTCAAACCTC	78
HVH6 1ª ampl	<i>Sense</i> - GAGGTAATTTATGGTGATACGGA <i>Antisense</i> - TGTCTACCAATGTATCTTTTTTTT	194
HVH6 2ª ampl	<i>Sense</i> - GCCAAACATATCACAGATCG <i>Antisense</i> - ACATAAAATCTTTTCAAACCTC	66
VEB 1ª ampl	<i>Sense</i> - CGAGTCATCTACGGGGACACGGA <i>Antisense</i> - AGCACCCCCACATATCTTCTTCTT	194
VEB 2ª ampl	<i>Sense</i> - ACCCGCAGCCTGTTTGTAGC <i>Antisense</i> - GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC	54
Betaglobina	5'- CAT GCC TCT TTG CAC CAT TC-3' 5'- TGG TAG CTG GAT TGT AGC TG-3'	150

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Herpesviridae</i> en LCR y otras muestras mediante PCR múltiple	Fecha: PNT-VIR-07	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

• **Tampón de lisis 2X**

- KCL 1 M..... 5 ml
 - Tris-HCL 1 M pH=8,3..... 1 ml
 - MgCl₂ 0,2 M 0,75 ml
 - Nonidet-P40 0,1 ml
 - Tween 20 0,5 ml
 - Agua bidestilada 42,75 ml
- Proteínasa K (20 mg/ml)
 - Fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1) (comercial, conservado en nevera y protegido de la luz; manipular en cabina de gases).
 - Acetato amónico 7,5 M.
 - Etanol absoluto frío (- 40°C).
 - Etanol al 70% frío (- 40°C).
 - Taq polimerasa (5 U/μl).
 - Tampón TBE 10X.
 - Bromuro de etidio (10mg/ml; manejar con precaución, es mutágeno y tóxico).
 - Tampón de carga de gel (azul de bromofenol/xilencianol comercial).
 - Agarosa al 4% en tampón TBE 1X (disolver 4 g en 100 ml de tampón TBE).
 - ADN ladder 100 pb (Invitrogen®)

5.2.- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRE O STOCK

- Proteínasa K (20 mg mL): Si el vial es de 100 mg, resuspender en 5 ml de agua bidestilada estéril y hacer alícuotas de 45 μl. Mantenerlas congeladas a -20°C.
- EDTA 0,5 M pH=8,0: Disolver 186,1 g de Na₂EDTA.2H₂O en 700 ml de agua bidestilada. Ajustar a pH=8,0 con NaOH 10 M y añadir agua bidestilada hasta 1 l. Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.
- Acetato amónico 7,5 M: Disolver 288,75 g de acetato en 500 ml de agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Conservar en nevera.
- Cloruro potásico 1M: Disolver 7,46 g de KCl en 80 ml de agua bidestilada. Completar a un volumen final de 100 ml con agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.
- Tris-HCL 1M pH=8,3: Disolver 121,1 g de Tris base en 800 ml de agua bidestilada. Ajustar al pH deseado con HCl concentrado. Agregar aproximadamente 42 ml para un pH de 8,3. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente antes de ajustar el pH final. Mezclar y añadir agua bidestilada hasta 1 l. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.
- Cloruro de magnesio 25 mM: disolver 5,07g de MgCl₂·6H₂O en 80 ml de agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente. Es un producto muy higroscópico, por lo que se recomienda comprar frascos pequeños y no conservar los frascos usados mucho tiempo.
- Cloruro de magnesio 0,2 M: Disolver 4,06 g de MgCl₂·6H₂O en 80 ml de agua bidestilada y

esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente. Es un producto muy higroscópico, por lo que se recomienda comprar frascos pequeños y no conservar los frascos usados mucho tiempo.

- Tampón TBE. Solución original 10X: Disolver los siguientes componentes para preparar 1 litro:
 - 108 g Tris base.
 - 55 g de ácido bórico.
 - Autoclavar y añadir 40 ml de EDTA 0,5M pH=8.
- Hidróxido sódico 10 M: Disolver 400 g de NaOH en 450 ml de agua bidestilada y añadir agua bidestilada hasta 1 litro.

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Microcentrífuga para tubos de fondo cónico (tipo *Eppendorf*) y rotor angular, con velocidad de rotación mínima de 13.000 g.
- Agitador orbital tipo *vortex*.
- Termociclador.
- Fuente y cubeta de electroforesis para geles de agarosa.
- Baño de agua caliente con termostato.
- Balanza de precisión.
- Secadora de vacío (opcional).
- Espectrófotómetro.
- Microondas para fundir la agarosa o placa calefactora o mechero Bunsen con rejilla de amianto y pinzas de madera.

6.2. MATERIALES

- Tubo Vacutainer estéril o tubo con tapón de rosca para recogida de LCR.
- Hisopo (torunda) y un tubo *Eppendorf* con 500 μl de agua destilada para resuspender la muestra tomada con el hisopo (exudado genital, raspado vesicular, líquido vesicular).
- Tubo Vacutainer con anticoagulante PPT o EDTA para obtención de plasma tras centrifugación de la sangre.
- Tubo de plástico de fondo cónico tipo *Eppendorf* de 1,5 ml para humor vítreo.
- Tubo de plástico estéril de boca ancha para recogida de orina.
- Tubo de plástico de fondo cónico tipo *Eppendorf* del tamaño adecuado al termociclador (generalmente 0,2 ml).
- Micropipetas automáticas con émbolo o con puntas con filtro.
- Botellas esterilizadas mediante calor seco para preparar tampones.
- Matraz de 200 ml para preparar geles de agarosa.
- Probetas y matraces de vidrio.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión sanguínea

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Herpesviridae</i> en LCR y otras muestras mediante PCR multiple	Fecha: PNT-VIR-07	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

establecidas en el documento "Manual de bioseguridad".

7. PROCESAMIENTO

7.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Según las normas documentadas en el procedimiento de "Recogida y Procesamiento de Muestras" para la toma de muestras de LCR, sangre, orina y humor vítreo.
- En el caso de exudado genital, y líquido y raspado vesicular se utiliza un hisopo de Dacron® o de alginato y mango de plástico o aluminio, preferiblemente. Sirve también un hisopo convencional de algodón y mango de madera. Se introduce en un tubo Eppendorf con agua destilada y se resuspende, presionando sobre las paredes del tubo.
- Conviene insistir en que la toma de muestras debe hacerse raspando el material de la base de la lesión. Si hay vesículas, romper con una aguja la epidermis de estas, absorber el líquido con una torunda previamente a realizar el frotis. Cortar el mango de la torunda, e introducir en un tubo *Eppendorf*.

7.2.- TRANSPORTE AL LABORATORIO

El transporte de las muestras al laboratorio debe ser rápido y, si es posible, refrigerado. No necesita medio de transporte especial, y si se demora mucho tiempo el traslado de la muestra al laboratorio, es conveniente que se congele al menos a -20°C .

7.3.- PROCESAMIENTO

7.3.1.- **Controles positivo y negativo y de amplificación**

Extraer y amplificar siempre al menos una muestra positiva de virus herpes simple y de citomegalovirus (pueden proceder de muestras positivas previamente analizadas o de cultivos celulares en los que se han replicado dichos virus). Amplificar siempre una muestra negativa, es decir los 2 μl de muestra se sustituyen por agua bidestilada estéril.

Para confirmar que existen células en las muestras, que el ADN se ha extraído correctamente y sin pérdidas durante el proceso de extracción y que no existen inhibidores en la muestra que impidan el proceso de amplificación, debe amplificarse el gen de la betaglobina en cada una de las muestras.

7.3.2.- **Extracción de ADN de la muestra**

Para la extracción de ADN de las muestras pueden utilizarse diferentes métodos, dependiendo de la cantidad de proteínas y mucina que contenga la muestra. Así, es recomendable usar métodos poco agresivos sencillos, utilizando únicamente proteinasa K para destruir las proteínas que hay en la muestra (método de la proteinasa K) para los LCR, exudados y raspados vesiculares, genitales y humor vítreo. Para otras muestras con un gran contenido proteico (plasma y orina), es recomendable utilizar otros métodos que además de destruir las proteínas,

purifican el ADN de la muestra, como por ejemplo el método de fenol-cloroformo, método de Boom (sílice) o extracción y purificación con columnas. Tanto el método de Boom como las columnas, están comercializadas con protocolos que dependen de la firma que los comercializa, por lo que describiremos el método de la proteinasa K y el de fenol-cloroformo (éste último cada vez más desplazado por la facilidad de uso de los métodos comerciales).

En ambos métodos se trata previamente con tampón o solución de lisis, de forma que la muestra se diluye en la proporción 1,8 partes de muestra con 2 partes de la solución de lisis 2X. Los volúmenes más frecuentemente usados son 180 μl de la muestra y 200 μl de la solución de lisis 2X. Una vez la muestra está diluida con la solución de lisis, puede conservarse congelada durante un tiempo prolongado (mayor cuanto más baja es la temperatura).

• **Método de la proteinasa K**

Cuando se va a proceder a la extracción, a la mezcla anterior (400 μl) se le añaden 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml), o en la proporción adecuada según la cantidad de muestra utilizada para la extracción. Agitar en vórtex e incubar en baño termostático a 56°C durante 2 horas y calentar posteriormente a 95°C durante 10 minutos (este calentamiento puede hacerse en un bloque térmico o en un baño preparado para tal uso). Usar este extracto para la amplificación.

• **Método de extracción con fenol-cloroformo.**

1. Transcurrida la incubación anterior, añadir 400 μl de la solución fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1).
2. Homogeneizar por inversión repetida del tubo.
3. Centrifugar a 13.000 g durante 15 minutos.
4. Recoger la fase acuosa superior, evitando la contaminación con la fase fenólica inferior. Transferir a un nuevo tubo *Eppendorf* estéril.
5. En las muestras que contienen gran cantidad de proteínas, puede aparecer una interfase blanquecina, fácil de arrastrar al aspirar la fase acuosa. En tales casos, debe efectuarse una nueva extracción con fenol:cloroformo:isoamilalcohol, adicionando un volumen igual a la muestra recogida y repitiendo los pasos anteriores. Deben repetirse las extracciones hasta que la interfase esté completamente limpia.
6. Añadir 125 μl de una solución de acetato amónico 7,5M a 250 μl de la muestra extraída.
7. Homogeneizar por inversión.
8. Añadir dos volúmenes de (800 μl) de etanol absoluto frío (-40°C).
9. Mantener las muestras a -40°C durante varias horas (incluso toda la noche) o durante 1 hora a -80°C .
10. Centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos.
11. Retirar el sobrenadante con la precaución de no arrastrar el ADN precipitado (puede ser visible como un punto pequeño blanquecino),

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Herpesviridae</i> en LCR y otras muestras mediante PCR multiple	Fecha: PNT-VIR-07	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

para lo cual es conveniente dejar unos 20 µl de líquido. Debe aspirarse lentamente colocando la punta de la pipeta en el lado opuesto del precipitado. Debido a que este precipitado no siempre es visible, es conveniente colocar siempre del mismo modo los tubos en la centrífuga (con el pico de la tapa hacia fuera, pues el precipitado estará siempre en el fondo del tubo en ese lado).

12. Añadir 1 ml de etanol al 70% frío para lavar el sedimento.
13. Centrifugar a 13.000g durante 15 minutos.
14. Eliminar el sobrenadante, retirando el etanol al máximo.
15. Repetir dos veces más el lavado con etanol frío al 70%.
16. Secar las muestras en una secadora o en estufa de 37°C durante dos horas o hasta que se haya secado el sedimento.
17. Resuspender con 200 µl de agua bidestilada estéril y conservar a +4°C hasta su cuantificación en espectrofotómetro (ajustar a una concentración de 50ng/ml).
18. Para resuspender de forma rápida, colocar a 56°C durante un mínimo de 10 minutos.
19. El ADNA extraído puede usarse para la amplificación.

7.3.3.- Amplificación y reamplificación del ADN extraído

7.3.3.1.- Primera amplificación: añadir 2 µl del ADN extraído a un tubo *Eppendorf* en el que previamente se han depositado 25 µl de mezcla 2X de amplificación y 23 µl de agua bidestilada. La mezcla de amplificación se prepara con:

- Tampón Tris 10X 10 µl
(concentración final 10 mM)
- MgCl *36 µl
(concentración final 2 mM)
- dNTPs (25 mM de cada uno)** 1 µl
(concentración final 0,25 mM)
- Mezcla de iniciadores (100 µM)*** 2,2 µl
(10 picomoles de cada uno)
- Tap polimerasa 5U/µl 0,8 µl (concentración final 2U)

Notas:

*La solución de MgCl 2 mM se prepara añadiendo a 28,4 µl de agua bidestilada a 7,6 µl de MgCl 25 mM.

**Los dNTPs se mezclan para conseguir una solución final conteniendo 25 mM de cada uno de ellos.

***Los iniciadores se preparan a partir del tubo original para obtener una concentración de 100 µM y se mezclan en un tubo *Eppendorf*. Se conservan a -40°C congelados en alícuotas de 20 µl.

Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen amplificar. Se colocan en el termociclador que se ha programado previamente para 40 ciclos. Cada ciclo consta de 30 segundos a 96°C para la desnaturalización del ADN, 1 minuto a

52°C para el alineamiento, 1 minuto a 72°C para la extensión y 10 minutos a 72°C de extensión final.

A partir de esta primera amplificación, puede cargarse un gel de agarosa (ver apartado 7.3.4) y si se observa la banda del amplificado de 150 pb (betaglobina) y la banda correspondiente a 194 pb (en caso de que la muestra contenga ADN de alguno de los virus problema), se confirma que la muestra no contiene inhibidores y que se ha amplificado uno de los genes de alguno de los virus correspondientes a los iniciadores utilizados. En ambos casos (tanto si se observa banda como si no) se procede a la reamplificación, si es positivo, para conocer qué virus hay en la muestra y en caso negativo, para aumentar la sensibilidad de la técnica.

7.3.3.2.- Reamplificación: añadir 2 µl de la primera amplificación a 25 µl de la mezcla 2X de amplificación (la misma que para la primera amplificación pero con los iniciadores correspondientes a la segunda amplificación) y a 23 µl de agua bidestilada estéril. Se amplifica durante 40 ciclos (96°C durante 30 segundos, 47°C durante 1 minutos y 1 minuto a 72°C con autoextensión de 10 minutos a 72°C).

7.3.4.- Preparación de un gel de agarosa al 4% y observación de los amplicones

- Pesar 4 g de agarosa en 100 ml de tampón TBE 1X (preparar la cantidad necesaria según el número de muestras y por tanto según el tamaño del gel necesario).
- Disolver por calor (microondas o mechero) hasta que la solución esté transparente.
- Añadir 5 µl de la solución de bromuro de etidio. Agitar para homogeneizar.
- Volcar sobre el molde de la cubeta de electroforesis (elegir el molde adecuado al número de muestras que se haya amplificado)
- Colocar un peine adecuado al número de muestras.
- Dejar solidificar.
- Retirar el peine.
- Colocar en la cubeta de electroforesis.
- Añadir tampón TBE1X de forma que se llenen las cubetas laterales y que se cubra el gel.
- Cargar el gel, para ello, extender un trozo de *Parafilm* sobre la mesa de trabajo y depositar tantas gotas de 5 µl de tampón de carga como muestras se vayan a cargar.
- Mezclar 10 µl de una de las muestras con una de las gotas depositadas en el *Parafilm*. Cargar cada muestra en uno de los pocillos del gel. Repetir este último paso con cada una de las muestras amplificadas.
- Una de las carreras debe utilizarse para colocar el marcador de ADN (ADN *ladder*)
- Colocar la tapa de forma que el electrodo negro (cátodo) quede cerca de los pocillos y por tanto el ADN (cargado negativamente a pH neutro) migrará hacia el ánodo (electrodo rojo).
- Conectar la fuente de electroforesis de manera que no se sobrepasen 5 V/cm (considerando la

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Herpesviridae</i> en LCR y otras muestras mediante PCR multiple	Fecha: PNT-VIR-07	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

distancia más corta entre los electrodos). Lo habitual es que se conecte a 100 V.

- Desconectar la fuente y quitar la tapa cuando el colorante azul de bromofenol esté aproximadamente a la mitad del gel (aproximadamente 1 hora).

7.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

- Manipular (siempre con guantes) el molde de la cubeta con el gel y depositar sobre un transiluminador con luz ultravioleta en un lugar oscuro.
- Para validar los resultados del ensayo, en la carrera del control negativo no debe aparecer ninguna banda, en la del control positivo de VHS debe aparecer una banda de 120 pb y en la del control positivo de CMV una de 78 pb. Para poder interpretar si ha habido amplificación en las muestras, debe aparecer en cada una de ellas la banda de 150 pb correspondiente al amplificado del gen de la betaglobina.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Si aparece una banda de 120 pb se considera que la muestra contiene ADN de VHS (VHS1 o VHS2) y se informa como "Positiva" para dicho virus. En caso contrario, se debe informar como "Negativa".
- Si aparece una banda de 98 pb se considera que la muestra contiene ADN de VVZ y se informa como "Positiva" para dicho virus. En caso contrario, se debe informar como "Negativa".
- Si aparece una banda de 78 pb se considera que la muestra contiene ADN de CMV y se informa como "Positiva" para dicho virus. En caso contrario, se debe informar como "Negativa".
- Si aparece una banda de 66 pb se considera que la muestra contiene ADN de HVH6 y se informa como "Positiva" para dicho virus. En caso contrario, se debe informar como "Negativa".
- Si aparece una banda de 54 pb se considera que la muestra contiene ADN de VEB y se informa como "Positiva" para dicho virus. En caso contrario, se debe informar como "Negativa".

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.

- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- La detección de ADN se considera la prueba diagnóstica de referencia para las infecciones del sistema nervioso central por virus de la familia *Herpesviridae*.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Como se ha repetido, la calidad del resultado depende en gran medida de la presencia de celularidad en la preparación, esto es, de la calidad de la muestra. De ahí que no se den como válidas las amplificaciones de las muestras que no amplifiquen el gen de la betaglobina, indicando que la muestra no contiene suficiente cantidad de células.
- Es posible obtener resultados positivos a partir de infecciones de varios días de evolución, pero la sensibilidad es menor.
- De la misma manera, el tratamiento antivírico (aciclovir o derivados) interfiere con los resultados. De manera que en algunos estudios, se ha publicado que la prueba se negativiza a las 48 horas de la administración del aciclovir.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Querada C, Corral I, Laguna F, Valencia ME, Tenorio A, Echevarría JE, *et al.* Diagnostic utility of a multiplex Herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3061-3067.
2. Tenorio A, Echevarría JE, Casas I, Echevarría JM, Tabarés E. Detection and typing of human herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 44: 261-269.
3. Saiki RK. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
4. Boom R, Sol CJA, Saliman MMM *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.