

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editor: **Juan J. Picazo**

8.

Diagnóstico de laboratorio
de las infecciones por
herpesvirus

1 9 9 5

Coordinador: **José Luis Pérez Sáenz**

María de Oña Navarro
Concepción Gimeno Cardona
Joaquín Mendoza Montero

INDICE

Introducción.

Objetivos generales

Diagnóstico de los virus herpes simplex.

Diagnóstico serológico

Virus varicela-zoster.

Generalidades y necesidad del diagnóstico de laboratorio.

Técnicas diagnósticas

Aplicabilidad y condicionamientos prácticos de las técnicas.

Citomegalovirus.

Importancia de la infección por el citomegalovirus y objetivos del diagnóstico de laboratorio.

Diagnóstico de laboratorio.

Interpretación de resultados y aplicabilidad de las técnicas.

Virus de Epstein-Barr.

Introducción.

Mononucleosis infecciosa y virus epstein-barr.

Enfermedades tumorales.

Herpesvirus humanos 6 y 7.

Introducción y significado clínico.

Diagnóstico.

PCR y herpesvirus: año 1995.

Consideraciones generales.

PCR y virus herpes simplex.

PCR y virus varicela-zoster.

PCR y citomegalovirus.

PCR y virus Epstein-Barr.

PCR y herpesvirus humano tipo 6.

Sensibilidad a los antivirales: protocolos prácticos.

Ensayo de reducción de placas.

Ensayo de captación de colorante.

Ensayo rápido basado en la titulación del virus por efecto citopático (ECP) y posterior tinción vital.

Ensayo de sensibilidad para CMV en muestras sin celularidad.

Otros ensayos de sensibilidad.

Compuestos prácticos comentados.

Supuesto Nº 1.

Supuesto Nº 2.

Supuesto Nº 3.

Supuesto Nº 4

Supuesto Nº 5.

Bibliografía seleccionada.

8. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES POR HERPESVIRUS 1995

INTRODUCCION

La familia *Herpesviridae* comprende una serie de virus con DNA (tabla 1) cuya característica biológica más notable es su capacidad de producir latencia. Tras la infección primaria, sintomática o no, el virus permanecerá latente en diversos tipos celulares o tejidos que les son propios a cada miembro de la familia. Desde aquí, y sin que se conozcan bien los mecanismos íntimos y últimos que desencadenan el fenómeno, se van a producir reactivaciones con replicación y producción de nuevas partículas víricas. Además de las infecciones primarias y las reactivaciones, en algunos herpesvirus se ha demostrado la posibilidad de que un individuo sea infectado por una copia del mismo virus distinta a la que alberga de forma latente. Es el fenómeno conocido como reinfección, cuya extensión o importancia clínica no se conoce satisfactoriamente por el momento. En cualquiera de estas tres circunstancias es posible la aparición de síntomas clínicos relacionados con la infección.

Los estudios epidemiológicos demuestran que todos los virus de la familia *Herpesviridae* son extraordinariamente ubicuos y están ampliamente extendidos en la población general. Una sustancial proporción de adultos presentarán anticuerpos, reflejo de una primoinfección en una etapa previa de su vida y manifestación de la infección latente. Esto condicionará el diagnóstico serológico y la

interpretación de los resultados de otras pruebas diagnósticas de laboratorio.

En contraste con la gran prevalencia en la población general, la mayor parte de las infecciones, sean del tipo que sean, son asintomáticas. Cuando lo son, oscilan clínicamente desde las benignas a las que cursan con grave compromiso de la salud o la vida del paciente. Serán estas últimas, y no las primeras, las que motivarán el interés principal del diagnóstico de laboratorio, máxime teniendo en cuenta la inespecificidad de los signos y síntomas clínicos que se presentan.

En los últimos años se ha producido una serie de circunstancias que aconsejan la recopilación y análisis crítico de las técnicas diagnósticas, a saber:

a) El impacto que las nuevas tecnologías han tenido sobre las pruebas de laboratorio, o que se prevé tendrán en un futuro próximo. Es el caso de la disponibilidad de anticuerpos monoclonales que simplifican y generalizan el diagnóstico [herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), varicelazoster (VVZ)] o ayudan en la interpretación de resultados (CMV). También, claro está, las técnicas de biología molecular, y muy particularmente la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que será motivo de un apartado específico.

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

	Sinónimo	Abreviatura empleada en este número
Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i>		
Virus herpes simple tipo 1	Herpesvirus humano tipo 1	VHS-1
Virus herpes simple tipo 2	Herpesvirus humano tipo 2	VHS-2
Virus varicela-zóster	Herpesvirus humano tipo 3	VVZ
Subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i>		
Citomegalovirus humano	Herpesvirus humano tipo 5	CMV
Herpesvirus humano 6	Herpesvirus humano tipo 6	HVH-6
Herpesvirus humano 7	Herpesvirus humano tipo 7	HVH-7
Subfamilia <i>gammahepesvirinae</i>		
Virus de Epstein-Barr	Herpesvirus humano tipo 4	VEB

b) la descripción reciente de nuevos virus dentro de esta familia, como es el caso de los herpesvirus humanos tipos 6 y 7.

c) los nuevos cuadros clínicos asociados a los miembros, recientes o no, de la familia. Ejemplo de ello serían el exantema súbito [herpesvirus humano tipo 6 (HVH-6)] o los síndromes linfoproliferativos en inmunodeprimidos [virus Epstein-Barr (VEB)].

d) la creciente proporción de pacientes inmunodeprimidos atendidos en hospitales y en centros de asistencia primaria, bien a

consecuencia del avance de la medicina (trasplantados, mayor supervivencia de neoplásicos) o por razones coyunturales (fenómeno del SIDA). Es bien sabida la relación existente entre carencias inmunitarias e infecciones por herpesvirus.

e) la introducción en la práctica clínica de antivirales eficaces y seguros, con la consiguiente aparición de cepas resistentes, lo que supone un nuevo reto para el laboratorio.

OBJETIVOS GENERALES

En este número trataremos de dar respuesta a algunos de estos problemas o interrogantes. Los objetivos concretos serán:

- Revisión crítica de las técnicas disponibles en la actualidad, tanto de las clásicas (serología) como de las más actuales (PCR, detección de antígenos, etc.). Debido a su actualidad, las técnicas PCR se revisan en un apartado específico.
- Aplicación de las mismas a las diferentes situaciones clínicas.
- Interpretación de los resultados en función de cada situación concreta, completándola con casos diagnósticos comentados que sean ilustrativos, no tanto atípicos.

VIRUS HERPES SIMPLEX.

Los virus Herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1, VHS-2) fueron los primeros descritos y, al igual que el resto de virus del grupo afectan a un porcentaje muy elevado de la población general. La infección está mundialmente extendida y entre los 20-40 años prácticamente toda la población ha tenido contacto con el virus.

Son virus latentes, como el resto del grupo, y se pueden reactivar y ocasionar nuevas infecciones. Las reactivaciones por VHS-3 son 8-10 veces más frecuentes que las producidas por VHS-1,

teniendo una media de 4 recurrencias en un año después de la infección primaria.

La infección herpética afecta tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos, aunque en estos últimos la gravedad de los procesos es mayor. El 80% de pacientes inmunodeprimidos tienen reactivaciones por VHS, siendo las localizaciones periorales las más frecuentes. Un 10-15% de estas infecciones tienen diseminación hematológica y pueden provocar una afectación visceral.

El espectro clínico de las infecciones por los VHS es amplio, estando implicados en lesiones mucocutáneas locales o generalizadas, infección genital, infección ocular, infección congénita y neonatal, afectación neurológica (encefalitis) e infección visceral. La primoinfección herpética puede ser asintomática, pero también producir lesiones cutáneas en forma de exantema veliculoso (infección perioral, perigenital, neonatal). Ocasionalmente produce complicaciones neurológicas y viscerales en especial en pacientes inmunocomprometidos.

El diagnóstico virológico se puede realizar de varias formas dependiendo en cada ocasión de que haya o no vesículas, de las características del hésped (edad, inmunoprosucesión, etc.) y del momento en que se realice la toma de la muestra.

TABLA 2

Algunas situaciones que justifican el diagnóstico de laboratorio de los virus del herpes simple.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">* Diagnóstico diferencial en las infecciones congénitas y neonatales (herpes neonatal).* Prevención del herpes neonatal (<i>atención:</i> estrategias no bien definidas en la actualidad).* Diagnóstico etiológico de las infecciones del sistema nervioso central (encefalitis).* Diagnóstico de las infecciones generalizadas en inmunodeprimidos.* Establecer el diagnóstico diferencial en formas de presentación clínica inhabituales.* Diagnóstico etiológico del herpes genital y diagnóstico diferencial de úlceras genitales.* Pruebas de sensibilidad a los antivirales (en centros de referencia). |
|---|

DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS HERPES SIMPLEX

Atendiendo a los criterios anteriores, la estrategia diagnóstica será:

1.- En los **casos donde haya lesión vesiculosa** la técnica de elección es el diagnóstico directo a partir de improntas tomadas de la lesión. Los portaobjetos con las improntas se fijan en acetona fría durante 15 minutos y se tiñen después con anticuerpos monoclonales marcados, habitualmente con fluoresceína. La eficacia diagnóstica de esta técnica está en relación con el estado de lesión, variando desde el 100% en el caso de vesículas a un 25% cuando las improntas se realizan a partir de las costras. El diagnóstico puede obtenerse en 30 minutos.

Igualmente debe realizarse una toma de la lesión para cultivo de virus, utilizando para ello una torunda previamente humedecida en el medio de transporte de virus (solución tamponada con rojo fenol, antibióticos y una fuente proteica, como albúmina). Lo más conveniente es inocular la muestra inmediatamente, pero si no es posible, se puede almacenar a 4°C no más de 48 horas.

Los cultivos rápidos (*shell vial*) están indicados también para el diagnóstico precoz de la infección por VHS-1 y 2. Se realizan inoculando 200-300 µl de la muestra de la vesícula por centrifugación (700 X g, 45 min) sobre una monocapa de células susceptibles (MCR-5, VERO o BGM) previamente crecidas sobre un cubreobjetos circular. Después de retirar la muestra y añadir 1 ml de medio de mantenimiento,

se incuban a 37°C durante 24-48 horas. Posteriormente se tiñen los cubreobjetos con anticuerpos monoclonales frente a VHS-1 y VHS-2 marcados con fluoresceína y se observan al microscopio.

Los cultivos convencionales son necesarios para aislar las cepas y realizar ensayos de sensibilidad, que están indicados fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos. La inoculación de los cultivos convencionales se realiza por absorción de la muestra a la monocapa celular durante una hora a 37°C (también se puede realizar por centrifugación). Se retira la muestra y se añade medio de mantenimiento. Los tubos se incuban a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂ durante 14 días. Estos tubos se observan periódicamente para visualizar el efecto citopático característico de VHS. La identificación final se realiza con los anticuerpos monoclonales de tipaje por la técnica de IF directa anteriormente descrita, sobre las células de la monocapa desprendidas, lavadas y fijadas con acetona fría.

2.- Cuando **no existen lesiones vesiculosas externas** hay que distinguir, a su vez, cuatro circunstancias:

2.a) Procesos clínicos donde se produce excreción viral: faringitis, uretritis, cervicitis y neumonías (inmunodeprimidos). La detección del virus debe realizarse mediante cultivo rápido o convencional, siendo este último el método más sensible. Las muestras de elección son los exudados de la zona afectada (faringe, uretra, endocervix y lavados broncoalveolares en las neumonías). En algunos casos, como por ejemplo en los exudados faríngeos, el aislamiento ha descrito excreción del virus en un 2% de individuos asintomáticos. En los lavados broncoalveolares, su implicación como agente etiológico va ligada a la ausencia de otros patógenos.

2.b) Queratitis, esofagitis, proctitis. Las muestras de elección en estos casos son los raspados corneales o biopsias respectivas. En estos casos el diagnóstico se hace mediante IF sobre las improntas de las biopsias, cultivo (rápido y convencional), cocultivo y PCR. La PCR está indicada sólo cuando los cultivos son raspados y es fundamentalmente útil en los raspados corneales, donde el rendimiento del cultivo es menor. Además, se puede utilizar la secreción lagrimal del ojo afectado como muestra para el diagnóstico por PCR.

Para el cocultivo se ponen en contacto 15×10^4 células con el triturado de la biopsia en 1,5 ml de medio de mantenimiento, suplementado con 5% de suero bovino fetal. A las 24 horas y una vez formada la monocapa, se cambia el medio y se incuba a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂ durante 14 días observándolo periódicamente para visualizar el efecto citopático.

2.c) Encefalitis: debido a la eficacia y ausencia de reacciones adversas del tratamiento con aciclovir, no suele practicarse biopsia cerebral para el diagnóstico etiológico. Hoy día, la PCR realizada a partir del líquido cefalorraquídeo (LCR), técnica mucho menos agresiva, se ha convertido en la alternativa diagnóstica de elección. Suele utilizarse una técnica de doble PCR (*nested*) o, alternativamente, una PCR simple seguida de hibridación con sonda específica radiactiva o biotinada.

La PCR múltiple, en la que se utiliza una mezcla de iniciadores de los diferentes herpesvirus, que posteriormente se identifican con unos segundos cebadores específicos para cada uno de ellos. Es una técnica que ha sido desarrollada recientemente y con resultados prometedores.

2.d) Procesos con clínicos que van acompañados de viremia (herpes neonatal, herpes generalizados y viscerales en inmunodeprimidos), en ausencia de lesiones cutáneas. En estos casos se puede detectar antígeno viral por IF directa o aislar el virus mediante cultivos a partir de leucocitos de sangre periférica. Para la IF directa, con objeto de evitar la contaminación con eritrocitos, la muestra se trata con NH₄Cl frío (5 minutos a -20°), antes de ponerla en el portaobjetos.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Su utilidad se circunscribe al diagnóstico de primoinfecciones y en estudios epidemiológicos. En las enfermedades del sistema nervioso central también se utilizan los índices de anticuerpos IgG totales y específicos LCR/suero, junto con el índice de albúmina (indicativo de barrera hematoencefálica intacta o alterada) para demostrar producción intratecal de anticuerpos específicos.

VIRUS VARICELA-ZOSTER

GENERALIDADES Y NECESIDAD DEL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

La infección primaria (varicela) es una enfermedad altamente contagiosa, con una alta tasa de ataque en la primera década de la vida. Sin embargo, una proporción variable de personas (entre el 4 y el 20%) alcanzará la edad adulta siendo todavía susceptible a la infección. La varicela cursa en el niño normal como una dolencia benigna, con infrecuentes complicaciones y fácilmente diagnosticable clínicamente. También suelen reconocerse con facilidad por sus manifestaciones clínicas las reactivaciones del virus (herpes zóster) en el huésped normal. Por contra, el paciente inmunodeprimido es un terreno abonado para la presentación de formas complicadas, incluso fatales, tales como la neumonitis o la encefalitis. También el cuadro clínico en la afección cutánea

tiende a ser atípico. El VVZ es un agente bien conocido de infección materna y neonatal, aunque infrecuente en términos absolutos y relativos. Aunque es posible la infección intrauterina en las primeras etapas de la gestación, con graves consecuencias para el feto, esta situación es extremadamente rara, siendo más frecuentes aquellas que se producen en el período próximo al parto, desde 7 días antes hasta 4-5 días después del mismo. Recientemente se ha introducido una vacuna de virus atenuados (cepa OKA) que modifica el curso de la infección hacia formas más leves, tanto en inmunodeprimidos como en pacientes normales, si bien las indicaciones no están bien establecidas.

De acuerdo con lo expuesto, los objetivos del diagnóstico de laboratorio serán (Tabla 3): a) diagnóstico diferencial rápido de las infecciones mucocutáneas en paciente inmunodeprimidos, b) diagnóstico de las formas clínicas graves y poco habituales, como la afectación del sistema nervioso central o la neumonitis, c) conocimiento del estado inmunitario en pacientes de alto riesgo presentar complicaciones, o de sus cuidadores sanitarios, y d) evaluación de la eficacia protectora de la infección natural y de la vacuna. Los dos primeros métodos de diagnóstico directo. Los últimos son tributarios del diagnóstico serológico.

TABLA 3
Objetivos y justificación del diagnóstico de laboratorio del virus varicela-zóster.

<ul style="list-style-type: none"> * Confirmación del diagnóstico clínico en formas inhabituales y/o graves de la infección (v.g., neumonía varicelosa del adulto) * Diagnóstico diferencial de las infecciones del sistema nervioso central * Diagnóstico rápido de las infecciones diseminadas (varicela o zóster) en inmunodeprimidos. * Diagnóstico rápido diferencial de las infecciones mucocutáneas (con frecuencia atípicas) de los pacientes inmunodeprimidos. * Determinación del <i>status</i> inmunitario en niños inmunodeprimidos por cáncer o neoplasias hematológicas, o por deficiencias congénitas o adquiridas. * Conocimientos de la susceptibilidad a la infección en mujeres en edad fértil. * Determinación del estado inmunitario en personal sanitario al cuidado de pacientes de riesgo susceptibles. * Selección de candidatos y determinación de la eficacia de la vacuna.
--

TECNICAS DIAGNOSTICAS

Métodos serológicos

De las diversas técnicas serológicas disponibles para el laboratorio (Tabla 4), la más clásica es la prueba de fijación de complemento. En la actualidad está siendo desplazada progresivamente en los laboratorios asistenciales debido a su laboriosidad, escasa flexibilidad y, sobretodo, a su falta de sensibilidad. No es apta, en consecuencia, para estudios seroepidemiológicos ni para la determinación del status inmunológico en pacientes de riesgo (ejemplo, niños con leucemia), ni tampoco para evaluar la susceptibilidad del personal sanitario o cuidadores.

Las pruebas ELISA son las más generalizadas. Existen reactivos comerciales que permiten la detección de anticuerpos de las clases IgG e IgM. Las técnicas ELISA han demostrado una gran sensibilidad, a veces comparable (98%) con el método de fluorescencia antimembrana (FALMA). También son buenos marcadores de susceptibilidad a la infección, y es probablemente aquí donde tendrán sus principales aplicaciones. Suelen positivizarse a los pocos días de la aparición del cuadro de varicela. En el herpes zóster se detectan concentraciones altas de anticuerpos en fases iniciales del cuadro. La

detección de IgM no permite diferenciar necesariamente la varicela del herpes zóster. Esta determinación, en cambio, podría ser útil con fines diagnósticos en la fase avanzada de las lesiones cutáneas (costras). Las pruebas ELISA son adaptables a las rutinas diagnósticas y son particularmente útiles para el trabajo en lotes, no son métodos flexibles. Es fundamental que cada laboratorio realice su propio control de calidad sobre los reactivos comerciales a utilizar.

Recientemente se ha comercializado una prueba de látex para detección de anticuerpos del VVZ. La sensibilidad puede ser mayor incluso que la de algunos ELISA comerciales para determinar el estado inmunitario frente al virus. La prueba es, por definición, muy sencilla de realizar y flexible. Suele presentar fenómeno de prozona, lo que obliga a realizar diluciones que multiplican su coste.

Los métodos FAMA y de fluorescencia anticomplemento deben considerarse como técnicas aplicables en laboratorios de referencia.

Tinciones convencionales: prueba de Tzanck

La prueba de Tzanck, esto es, la tinción convencional del material celular procedente del raspado de las lesiones es una prueba rápida y sencilla aplicable a las infecciones mucocutáneas.

En caso positivo se observa la presencia de células gigantes multinucleadas con Tzanck es sensible (hasta el 85%), pero no permite diferenciar el VVZ de los VHS.

Detección directa de antígeno de VVZ en raspados de lesiones.

Constituye en la actualidad el método de elección para las infecciones cutáneas. Además de su sencillez y flexibilidad, la sensibilidad del método puede alcanzar el 100% en las lesiones tempranas. Puede llevarse a cabo mediante inmunofluorescencia directa (más rápida) o indirecta (recomendable). Permite confirmar una sospecha diagnóstica en 1-2 horas, con elevada especificidad en manos de técnicos entrenados la especificidad cercana al 100%. Si se utilizan anticuerpos monoclonales no hay reactividad cruzada con los VHS. La detección directa puede efectuar el diagnóstico en lesiones de más de 5 días de evolución, e incluso si se toman en los 3 primeros días de tratamiento antiviral.

Métodos basados en el cultivo

El VVZ es un virus muy asociado a los sistemas celulares y que pierde fácilmente viabilidad. Incluso en las condiciones más óptimas, la

sensibilidad del cultivo convencional en tubo no supera el 60% si lo comparamos con la detección de antígeno por inmunofluorescencia. El tiempo de evolución afecta negativamente al aislamiento del virus en cultivo (no suele aislarse en muestras obtenidas después de los 5 días desde el inicio del cuadro), al igual que el tratamiento antiviral. No existen muchos sustratos celulares que soporten bien el crecimiento del VVZ. En general, las células diploides de pulmón embrionario humano, como los fibroblastos MCR-5, dan resultados satisfactorios y pueden obtenerse de fuentes comerciales. El efecto citopático característico no suele aparecer antes de los 4 días de inoculados los tubos y la media se sitúa en torno a una semana. El método de cultivo en *shell vial* utiliza anticuerpos monoclonales frente al VVZ para detectar los cultivos positivos antes que el efecto citopático sea evidente. Con ello se adelanta el diagnóstico a las 24-48 h. Aunque la sensibilidad frente al cultivo en tubo es ligeramente mayor, no supera a la detección directa de antígeno. En la experiencia de los autores no muestra ventajas definitivas.

TABLA 4
Técnicas diagnósticas disponibles para el virus varicela zóster

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Diagnóstico serológico			
Fijación de complemento	Métodos habituales en el laboratorio	Laboriosa Poco sensible	Progresivamente en desuso
Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	Antígenos comerciales Metodología habitual	Poco flexible	Determinación de estado inmunológico
	Antígeno comercial	Contrastar la eficacia de reactivos comerciales	Soporte de algunos diagnósticos clínicos
	Trabajo en lotes Sensibilidad Detección IgG e IgM	Reacciones heterotípicas con el VHS	
Aglutinación con látex	Sencillez, flexibilidad	Precio comercial	Susceptible a la infección
	Sensibilidad Comercializado	Fenómeno prozona	Cribaje de vacunación
Fluorescencia antimembrana (FAMA)	Máxima sensibilidad	Muy laborioso	Encuestas serológicas de referencia
	Correlación susceptibilidad a la infección	Experiencia Cultivos celulares Centros de referencia	Susceptibilidad a la infección Confirmación de algunos diagnósticos
Detección de antígeno	Rapidez, sencillez	Cierta experiencia	Diagnóstico etiológico en casos atípicos (pacientes HIV, etc)
	Sensibilidad, especificidad Diagnóstico en pacientes tratados	Correcta toma muestras Sólo infección cutánea	Diagnóstico diferencial con otros herpesvirus
Método de cultivo			
Cultivo en tubo		Experiencia en cultivos Deficiente sensibilidad	Confirmación en casos atípicos Diagnóstico diferencial con otros herpesvirus
	Especificidad	Afectada por tratamiento Momento de la muestra Tardanza en resultados	
Cultivo en <i>shell vial</i>	Rapidez	Cultivos celulares	Confirmación casos atípicos
	Especificidad	Afectada por tratamiento Correcta toma muestras Experiencia	Diagnóstico diferencial
Amplificación ADN (PCR)	Sensibilidad	Laboriosidad Contaminaciones Experiencia	Diagnóstico de infecciones del SNC

APLICABILIDAD Y CONDICIONAMIENTOS PRACTICOS DE LAS TECNICAS

La detección de anticuerpos puede aplicarse, en teoría, tanto al diagnóstico de las infecciones activas como a la determinación del estado

inmunitario de una persona frente al VVZ. Para lo primero, la serología tropieza con tres obstáculos: a) las reacciones heterotípicas que se producen por el estímulo de los antígenos comunes del VVZ y los VHS (ambos virus guardan notable similitud

biológica), b) en el retraso en la producción de anticuerpos en la infección primaria, siendo necesario obtener muestras de suero de las fases aguda y de convalecencia (no menos de 2 semanas después), y c) la respuesta serológica puede verse alterada en los pacientes inmunodeprimidos.

Recomendamos reservar las pruebas serológicas sobretodo para conocer el estado inmunitario frente al virus. Aquí son posibles varias situaciones a las que se adaptan las diversas pruebas. En las encuestas seroepidemiológicas, serán aplicables las pruebas ELISA de calidad contrastada porque son aptas para el trabajo en lote y de lectura objetiva. Cuando se desee conocer la susceptibilidad al virus en pacientes de alto riesgo (niños con cáncer candidatos a quimioterapia o radioterapia, por ejemplo) se optará por una prueba ELISA o un látex, con preferencia por esta última en caso de necesitar un resultado inmediato. A resaltar que la inmunodepresión puede enmascarar el resultado. También puede ser interesante conocer el estado inmunitario frente al VVZ en el personal sanitario, cuidadores o familiares que atienden a los pacientes de alto riesgo y en la embarazada expuesta a un contacto con varicela zóster.

En este sentido, es obligado recordar que la existencia de antecedentes de haber pasado la infección es un marcador fiable de protección, por lo que no se necesitará ninguna acción adicional en caso afirmativo. Si no es así realizaremos pruebas de ELISA o de látex, sobretodo si la gestación está en sus 2-3 últimas semanas, aunque la prueba con látex se adapta mejor al diagnóstico individual.

No está muy clara la estrategia para selección de candidatos a la vacuna. Probablemente deberá hacerse primero un despistaje de personas con antecedentes históricos de la infección. Cuando no existan, las pruebas más idóneas serán los ELISA. El diagnóstico de las infecciones (primarias o no) localizadas en piel o mucosas debe estar restringido a las situaciones con presentación clínica atípica o cuando haya que establecer un diagnóstico diferencial, como suele ocurrir en los pacientes inmunodeprimidos. La técnica de elección será aquí la detección directa de antígeno viral, pero su eficiencia dependerá en gran medida de la correcta toma de muestra. Es necesario frotar vigorosamente la base de la lesión para obtener material celular. La detección directa también puede aplicarse a biopsias por punción y a cortes histológicos. Si se dispone de cultivo, deberá intentarse para cubrir la eventualidad de un muestreo deficiente.

En los pacientes inmunodeprimidos puede observarse la infección diseminada con afectación del sistema nervioso y, a veces, debe hacerse el diagnóstico diferencial con otros neuropatógenos.

El rendimiento del cultivo sobre muestra de LCR es muy bajo. Lo recomendable en esta situación es realizar una amplificación por PCR (ver más adelante) en un centro que disponga de esta técnica.

CITOMEGALOVIRUS

IMPORTANCIA DE LA INFECCION POR EL CITOMEGALOVIRUS Y OBJETIVOS DEL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Se calcula que en torno al 80% de la población adulta en nuestro país está infectada por el CMV. Buena parte de estas infecciones se contraen durante la gestación, la lactancia o en la edad preescolar o escolar. El virus puede transmitirse con gran probabilidad por la saliva y por vía sexual (picos de incidencia en guarderías infantiles y en adultos jóvenes) y, con toda certeza, a través de la sangre, de sus derivados y de los órganos trasplantados. La infección activa por el CMV, esto es, la existencia de replicación vírica, puede ser reflejo de una infección primaria, de la reactivación de una cepa latente o de la reinfección en el hésped normal suele ser asintomática. Cuando existen síntomas, se manifiesta como un síndrome mononucleósico y, más raramente, bajo la forma de hepatitis.

La situación es muy diferente en el paciente inmunodeprimido que tiene alteradas sus defensas celulares, como los trasplantados de órgano sólido o de médula ósea, los neoplásicos, los que son tratados con sustancias que deprimen la inmunidad celular (corticoides, ciclosporina, etc.) y los pacientes infectados por el VIH. En ellos las infecciones activas son muy frecuentes, por lo general debidas a reactivaciones de un virus latente. El espectro clínico variará mucho, desde las formas asintomáticas a las que cursan con grave compromiso de la vida del paciente; en cualquiera de los casos con manifestaciones clínicas inespecíficas. No todas las infecciones activas que se producen en estos pacientes se asociarán necesariamente a manifestaciones clínicas (enfermedad por CMV), circunstancia que plantea retos diagnósticos adicionales.

El CMV es la causa más frecuente de infecciones congénitas y neonatales. Se calcula que entre el 0,5 y el 2,5% de los recién nacidos vivos contraen durante el parto o por la lactancia materna (hasta un 40% de niños infectados durante el primer año de vida.). Por suerte, la mayor parte de infecciones congénitas y sólo una mínima proporción de los restantes presentará un cuadro grave de enfermedad citomegálica con afectación neurológica. Incluso en los casos más desfavorables, raramente el recién nacido presentará síntomas en el momento del nacimiento. De nuevo los síntomas son poco

específicos y obligan al diagnóstico diferencial con otras etiologías bacterianas y víricas. Las pruebas de laboratorio se justifican con arreglo a las siguientes líneas generales: a) determinación del estado inmune frente al virus, b)

diagnóstico de la infección activa, c) investigación de marcadores pronósticos para la enfermedad por CMV, y d) detección de la resistencia a los antivirales en uso (Tabla 5).

TABLA 5
Necesidad del diagnóstico de laboratorio del citomegalovirus humano

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">*Conocimiento del <i>status</i> inmune de la población o de ciertos grupos (encuestas seroepidemiológicas).*Determinar la susceptibilidad al virus en los pacientes de alto riesgo (trasplantados).*Determinación del estado inmunitario en donantes de órganos sólidos o médula ósea.*Diagnóstico diferencial de la infección en el neonato.*Diagnosticar las infecciones activas (primoinfecciones o reactivaciones) en los pacientes con riesgo de desarrollar infecciones sintomáticas.*Diagnóstico diferencial de la infección sintomática (enfermedad por CMV) en los pacientes infectados.*Establecer un pronóstico en las personas de riesgo, con el fin de guiar la terapia antiviral.*Detección de la resistencia a los antivirales. |
|---|

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En la tabla 6 se resumen las principales ventajas e inconvenientes del amplio abanico de técnicas disponibles.

TABLA 6
Técnicas aplicables al diagnóstico de la infección y la enfermedad y la enfermedad por el citomegalovirus humano

Técnica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Diagnóstico serológico			
Fijación de complemento	Detección de aumento del títulos de anticuerpos	Laboriosa Insuficiente sensibilidad	No se recomienda hoy como técnica de partida
Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	Antígenos comerciales Metodología familiar Disponibile en el mercado	Controlar la eficiencia de los reactivos comerciales Poco flexible	Determinación de estado inmunológico Soporte de algunos diagnósticos clínicos
Aglutinación con látex	Elevada sensibilidad Sencillez, flexibilidad	Interpretación subjetiva Fenómeno prozona	Serología pretrasplante de donante y receptor Susceptibilidad a la infección
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Sensibilidad Detecta IgG e IgM Flexibilidad	Escasa especificidad en la detección de IgG	Detección de IgM, en ciertas condiciones (suero absorbido)
Prueba de fluorescencia anticomplemento (ACIF)	Sensibilidad	Laboriosidad Experiencia técnica Cultivos celulares Sólo detecta IgG	Centros de referencia
Histopatología	Técnicas habituales Buena correlación con las manifestaciones clínicas	Sensibilidad insuficiente	Diagnóstico de la afectación focal por el CMV
Detección de antígeno			
Prueba de antigenemia (extractos de leucocitos)	Mayor sensibilidad Especificidad Rapidez, sencillez Cuantificable	Estandarización Experiencia propia para su interpretación	Control en trasplantados Diagnóstico de enfermedad
En otras muestras	Detección <i>in situ</i>	Sensibilidad variable	Lavado broncoalveolar Inmunohistoquímica
Método de cultivo			
Cultivo en tubo	Especificidad	Experiencia en cultivos Insuficiente sensibilidad	Diagnóstico de la infección congénita Confirmación en casos atípicos
Cultivo en <i>shell vial</i>	Rapidez Especificidad Sensibilidad	Tardanza en resultados Disponer de cultivos celulares Experiencia	Seguimiento de trasplantados Diagnóstico rápido diferencial en diferentes tipos de muestras
Amplificación ADN (PCR)	Sensibilidad	Dificultad técnica	Infecciones del SNC

Pruebas serológicas

De las diversas técnicas serológicas para CMV, las más utilizadas son la aglutinación pasiva con látex, la fijación de complemento (FC), las técnicas de inmunofluorescencia y los métodos inmunoenzimáticos (ELISA). Aunque estas últimas se han impuesto en la mayoría de laboratorios por razones de tipo práctico (familiaridad con la metodología, existencia de reactivos comerciales de calidad contrastada, posibilidad de realizar el diagnóstico en un amplio número de muestras a la vez, etc.), la elección de la técnica a emplear dependerá de condicionamientos propios de cada laboratorio.

La técnica de FC es el método clásico de determinación de anticuerpos anti CMV. Pone de manifiesto anticuerpos de la clase IgG y se aplica a la determinación del nivel basal, al diagnóstico de seroconversión y a la demostración de títulos crecientes de anticuerpos. La prueba FC detecta sólo cantidades notables de anticuerpos y, en general, presenta insuficiente sensibilidad. En algunos estudios no alcanza el 65% comparada con otros métodos, lo que se traduce en dificultad para detectar seroconversión o aumento del título de anticuerpos. Debido a su laboriosidad técnica, no es recomendable para aquellos laboratorios que se inicien en la detección de anticuerpos anti-CMV.

Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) utilizan como fuente de antígeno un microcultivo de CMV en fibroblastos humanos y son aptas para detectar anticuerpos de las clases IgG e IgM. La sensibilidad es mayor que la de la prueba de FC. El mayor problema de la técnica estándar fluorescente es su baja especificidad, con falsos positivos que alcanzan hasta el 34% en la detección de anticuerpos IgG. Ello se debe a que el CMV induce receptores Fc en el citoplasma de los fibroblastos que reaccionan inespecíficamente con inmunoglobulinas de la clase IgG. La variante conocida como inmunofluorescencia anti-complemento (ACIF) permite eliminar muchos falsos positivos y la especificidad puede alcanzar el 98% en la detección de IgG, pero sólo es aplicable en laboratorios de referencia.

Hay en el mercado reactivos que detectan anticuerpos frente a CMV mediante la aglutinación pasiva de partículas de látex sensibilizadas. Esta técnica es rápida (5-10 min), sencilla de realizar y de lectura fácil. La sensibilidad es elevada, superior a la inmunofluorescencia y algo menor que los métodos ELISA y su especificidad supera el 95% en los distintos estudios. Estas características convierten a la prueba látex en una técnica de gran utilidad en el cribaje pretrasplante de donantes y receptores, así como para conocer el estado inmune de los pacientes. La aglutinación con látex presenta fenómeno de prozona, lo que implica realizar diluciones del suero problema, a la

vez que una cierta tardanza en positivizarse tras la primoinfección. La variante cuantitativa no está bien evaluada.

Las técnicas ELISA han supuesto también un gran avance en el diagnóstico serológico de CMV. Son razonablemente rápidas (3-4 h), automatizables, de lectura objetiva y los reactivos están comercializados. El equipamiento es común a otros patógenos y familiar a los laboratorios actuales. Pueden ser cuantitativas y detectar anticuerpos de las clases IgG e IgM. Los métodos ELISA son también los más sensibles, comparables a la técnica ACIF en laboratorios de referencia. Salvo ciertas experiencias puntuales negativas -aunque ilustrativas- con reactivos comerciales, la especificidad en la detección de anticuerpos IgG es muy elevada, por encima del 98%. De nuevo hay que subrayar la necesidad de que cada laboratorio evalúe en su medio la utilidad real de los sistemas comerciales ELISA.

La detección de anticuerpos IgM específicos de CMV por IF o ELISA constituye un apartado de particular importancia en este virus, pues permite *a priori* establecer diagnósticos de infección reciente. Las técnicas indirectas presentan falsos negativos por competición específica entre IgG e IgM por el antígeno viral, lo que ocurre en presencia de títulos altos de las primeras. Los falsos positivos se producen por la presencia de factor reumatoide que reacciona inespecíficamente con otras IgG. Para obviar estos problemas pueden seguirse diversos métodos de absorción de las IgG o del factor reumatoide. Son muy recomendables las técnicas ELISA de captura.

En la práctica real, el mayor interés de los métodos serológicos se centra sobretodo en la detección del estado inmune de los pacientes trasplantados y sus donantes. Las pruebas de elección serán aquellas que muestren mayor sensibilidad. A falta de otras técnicas, la serología podría aplicarse también al diagnóstico de las primoinfecciones sintomáticas en el huésped normal. Tanto la seroconversión como la determinación de IgM específica conducirían al diagnóstico en este caso. Por razones prácticas, recomendamos un método ELISA de calidad contrastada y debidamente controlado o la aglutinación pasiva con látex, de sencilla y flexible realización para la determinación de anticuerpos IgG. Para la determinación de IgM es recomendable utilizar un método ELISA de captura para evitar falsos positivos.

Al margen de los problemas técnicos, las pruebas serológicas muestran varias limitaciones en el diagnóstico de la infección activa por CMV. Los pacientes inmunodeprimidos pierden capacidad para desarrollar una respuesta inmune adecuada, lo que hace que sea difícil detectar la primoinfección (seroconversión) o la reactivación

(aumento en el título de anticuerpos). Con todo, la mayor desventaja de la determinación de anticuerpos IgG es la tardanza en obtener resultados, lo que les resta interés en el manejo de los pacientes de riesgo. Las pruebas que detectan IgM son más rápidas pero, además de otros problemas ya apuntados, pueden dar falsos positivos biológicos por el estímulo antigénico policlonal de los VEB y VVZ. Tampoco permite distinguir la primoinfección de la reinfección en los inmunodeprimidos (como los trasplantados). Algunos autores han referido una adecuada sensibilidad para el diagnóstico de la infección activa así, la respuesta es tardía, fuera del período <<clínicamente útil>>.

Técnicas histológicas y detección de antígenos

Las tinciones convencionales pueden aplicarse al diagnóstico de CMV en muestras de tejidos (pulmón, hígado, cerebro, biopsias del tracto digestivo, etc.), así como a preparaciones procedentes de lavados broncoalveolares (LBA). En estos casos es posible observar la presencia de inclusiones intranucleares basófilas de cromatina viral rodeadas de un halo que margina la cromatina celular al borde de la membrana nuclear (imagen en <<ojo de búho>>). Aunque, siendo estrictos, las imágenes podrían confundirse con las producidas por otros herpesvirus, el mayor problema estriba en la insuficiente sensibilidad. La aplicación de los anticuerpos monoclonales en técnicas de inmunohistoquímica confiere una mayor especificidad, pero no aumenta la sensibilidad. Las tinciones inmunofluorescentes o inmunoenzimáticas con monoclonales se han aplicado con buenos resultados de sensibilidad y especificidad al diagnóstico de la neumonitis en pacientes de alto riesgo, sobre muestras de LBA. Los monoclonales más aptos con este fin son los dirigidos frente a antígenos tardíos estructurales.

Prueba de antigenemia CMV

Esta técnica ha demostrado ser un avance significativo en el diagnóstico y seguimiento de pacientes de riesgo. Consiste en detectar la presencia de antígenos del virus en los leucocitos extraídos de sangre periférica, por tinción fluorescente o inmunoenzimática. La antigenemia presenta una serie de ventajas teóricas como son la sencillez de realización, la accesibilidad a muchos laboratorios, la familiaridad con la metodología y la rapidez en obtener resultados: es posible detectar la presencia del CMV en el sangre en 4-5 horas. Es factible cuantificar la presencia de células que expresan el antígeno, 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, puede alcanzar el 120%. Al rebajar el umbral de detección del virus en sangre permite adelantarse en una media de siete días al diagnóstico por cultivo. La mayor sensibilidad no se traduce en inespecificidad tras un mínimo adiestramiento. Para conseguir la mayor fiabilidad y reproductividad es preciso realizar la técnica en condiciones al lector a revisiones documentadas. En síntesis, el antígeno viral más idóneo para la detección es, por el momento, la fóstoproteína de matriz *pp65*. Existen en nuestro país diversos anticuerpos monoclonales frente a esta proteína de calidad contrastada. La fijación de las preparaciones con acetona. El antígeno muestra labilidad, por lo que el procesamiento de la muestra de sangre no se demorará más allá de las 18 horas, preferiblemente en las 4 primeras horas.

Cultivo convencional y método *shell vial*

El CMV humano es un virus con gran especificidad de especie y sólo las células diploides humanas son capaces de soportar su crecimiento *in vitro*. Existen diversas líneas de este tipo que pueden adquirirse comercialmente; de ellas, los fibroblastos de pulmón embrionario humano MCR-5 o WI-38 son las más utilizadas. En nuestro país pueden ser suministradas en tubos o viales listos para su inoculación, lo que facilita el acceso a estas técnicas por parte de laboratorios con limitaciones estructurales. La forma más habitual de cultivar el virus es mediante tubos y la positividad se detecta por la presencia de un efecto citopático característico. El CMV es uno de los herpesvirus con tiempo más largo de replicación, lo que se traduce en la tardanza de desarrollar el efecto citopático (y en confirmar el diagnóstico). En la práctica, éste se observa, por término medio, al cabo de 10 días, plazo incompatible con la terapéutica específica. En la infección congénita, los neonatos suelen excretar el virus en orina y otras secreciones en concentraciones muy elevadas, lo que se traduce en el desarrollo de un efecto citopático muy precoz, incluso a los dos días de incubación, siendo el cultivo de orina el método de referencia. Otro problema del cultivo es la labilidad del virus que restringe la posibilidad de remitir las muestras a centros de referencia. En ciertos tipos de muestras (LCR, etc.) la sensibilidad del cultivo resulta insuficiente.

El método de cultivo conocido como técnica *shell vial* (SV) ha permitido obviar algunos de los inconvenientes del cultivo en tubo y supuso en su día un avance significativo en el diagnóstico del CMV. Detecta los antígenos inmediato-tempranos virales producidos en el cultivo mediante anticuerpos monoclonales. La sensibilidad se incrementa por centrifugación de la muestra sobre monocapas de fibroblastos formadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio colocados en el

fondo de un vial redondo (de ahí el nombre de la técnica). En la práctica, el método SV permite realizar diagnósticos tras incubación durante 24-48 horas. Se puede adquirir el material de suministradores comerciales. Para la detección en SV se emplean tinciones fluorescentes o enzimáticas. Existen diversos monoclonales o mezclas de varios comercializados en nuestro país. Aunque la elección dependerá de las condiciones individuales de cada laboratorio, hay que señalar que, al menos, deben contener un anticuerpo dirigido contra un antígeno inmediato-temprano. No son aptos los reactivos contra antígenos tardíos, como los utilizados en las pruebas de detección directa. La técnica SV ha demostrado tener una buena sensibilidad, permitiendo ampliar el diagnóstico en un 15-20% respecto al cultivo convencional en tubo. Existe unanimidad entre los diferentes laboratorios cuando se trata de muestras de orina, orofaríngeas y respiratorias. Algunos laboratorios refieren menor sensibilidad que el cultivo con las muestras de sangre, pero no es ésta la experiencia de todos los autores. Salvo errores de tipo técnico, la especificidad es casi completa.

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y APLICABILIDAD DE LAS TECNICAS

Debido a las particularidades biológicas del CMV, la interpretación de los resultados de laboratorio presenta dificultades. Con ánimo simplificador, consideraremos a las pruebas serológicas como los métodos idóneos para documentar una infección pasada (determinación del estado inmune frente al virus) y a las técnicas de cultivo o detección de antígeno como las más apropiadas para establecer una infección actual.

Problemas diagnósticos y pronósticos en el embarazo

El diagnóstico en la mujer gestante y su utilidad práctica representa un reto no resuelto por las técnicas de laboratorio, y ello por varias razones: a) el riesgo de complicaciones significativas para el recién nacido es muy bajo en caso de una reactivación materna o de una primoinfección fuera del primer trimestre de embarazo; b) no es posible identificar los casos concretos con riesgo de presentar complicaciones graves en el nacimiento, ni siquiera dentro de las que adquieren la infección durante el primer trimestre; c) es difícil, en la práctica, determinar el momento preciso de adquisición de la infección primaria en la madre; d) probablemente, muchos fetos gravemente afectados por el virus conducen a aborto espontáneo. En consecuencia, las pruebas de laboratorio actuales son incapaces de orientar actuaciones terapéuticas definidas, razón por la que no se recomienda el cribaje sistemático de anticuerpos anti-CMV en la embarazada. Si es

recomendable, con carácter general, conservar un suero obtenido durante el embarazo, con el fin de ayudar en el diagnóstico diferencial de una hipotética infección congénita clínicamente manifiesta en el recién nacido.

Diagnóstico de la infección congénita

El aspecto más importante para la prueba de laboratorio en este contexto es establecer un diagnóstico inequívoco. En estos casos los cultivos de orina o saliva (que suelen ser positivos y con un elevado inóculo viral), conducen a un diagnóstico de confirmación rápido que puede ser facilitado por la técnica *shell vial*. También puede llegarse por detección de anticuerpos IgM mediante un ELISA de captura o con absorción de factor reumatoideo. La detección de IgG carece de interés en estos supuestos. Lo más habitual es que la necesidad de un diagnóstico diferencial se presente más allá de los tres meses de vida. En ese momento, la positividad de un cultivo o de una determinación de IgM no conduce a diferenciar si se trata de una infección congénita o perinatal (lo más frecuente y con escasas repercusiones, por otra parte). Si se dispone de sueros maternos obtenidos durante la gestación y tras el parto, es posible que nos aclaren la situación, pero sólo si demuestra seroconversión o presencia de IgM en la gestación (confirma la adquisición congénita) o la seronegatividad tras el parto (la excluye).

Diagnóstico en el paciente inmunodeprimido

Ya nos hemos referido en apartados anteriores al escaso interés de las pruebas serológicas para el diagnóstico y pronóstico de las infecciones en este tipo de pacientes, lo que es particularmente cierto en los pacientes con SIDA. Los métodos recomendados aquí serán el cultivo (o el *shell vial*) y la detección de antígeno. Un aspecto importante es el tipo de muestra a analizar. El seguimiento de trasplantados suele incluir muestras seriadas de sangre, saliva y orina en los 2-3 primeros meses postrasplante, el período de mayor riesgo de complicaciones significativas. Estudios recientes demuestran el mayor interés de la detección en sangre, por varias razones: a) con los métodos actuales, la sangre es un marcador de infección tan sensible o más que la orina o saliva, b) la detección en sangre suele preceder en el tiempo a las otras muestras y, más importante, c) la detección en sangre se asocia con mayor riesgo de presentar infección sintomática (enfermedad por CMV). A favor del cultivo de orina está el ser una buena fuente de inóculo viral para realizar pruebas de sensibilidad. Así, en ciertas condiciones, podría suprimirse el seguimiento en orina y saliva de los trasplantados, centrándose en las determinaciones en sangre. La recomendación de no utilizar la saliva o la orina para el diagnóstico

de los pacientes infectados con el VIH es casi definitiva.

El valor de la detección del virus o sus antígenos en muestras procedentes del lugar de la infección, como las biopsias, se asocia con gran probabilidad de que el cuadro esté causado por el CMV, sobretodo si se acompaña de histopatología compatible. Un caso particular es el lavado broncoalveolar. En los pacientes con SIDA tiene bajo o nulo valor predictivo. En los trasplantados de pulmón, por contra, tiene una gran significación. En los trasplantados de médula ósea la detección de CMV no establece necesariamente el diagnóstico actual de neumonitis, pero es un claro factor de riesgo para su desarrollo futuro.

El mayor reto de las pruebas diagnósticas en los pacientes inmunodeprimidos es diagnosticar la infección sintomática. Más interesante aún sería disponer de marcadores pronósticos que identificasen aquellos pacientes con riesgo de presentar complicaciones graves. Las técnicas con alta sensibilidad para detectar la infección activa - como la prueba de antígenemia cualitativa y la PCR- tendrán menor valor predictivo positivo para la enfermedad. Sin embargo, como las infecciones sintomáticas se asocian con una mayor carga viral, la cuantificación de la antígenemia ayuda mucho en el diagnóstico diferencial en un contexto de manifestaciones clínicas inespecíficas. La experiencia demuestra que la presencia de cifras altas de antígenemia se asocia con los síntomas. No está del todo definido el valor pronóstico de esta prueba.

La técnica PCR es excesivamente sensible y su positividad no se correlaciona con la sintomatología clínica. Por ahora, las variantes cuantitativas no están al alcance de los laboratorios diagnósticos. Mientras no dispongamos de ellas -o de otras equivalentes- la recomendación de la PCR queda restringida al diagnóstico sobre muestras de LCR de las infecciones del sistema nervioso central en los inmunodeprimidos.

VIRUS DE EPSTEIN-BARR

INTRODUCCION

Como los demás miembros del grupo herpes, el virus de Epstein-Barr (VEB) produce una infección que persiste durante la vida del individuo. La infección primaria es habitualmente asintomática en la infancia, mientras que se manifiesta como mononucleosis infecciosa en dos terceras partes de los adolescentes. Además, el VEB se implica cada vez más en la patogénesis de las diferentes neoplasias, como son la forma endémica del linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y los síndromes linfoproliferativos postrasplante. También se han relacionado con el VEB los linfomas tipo Hodgkin y no-Hodgkin del sistema

nervioso central en SIDA. Recientemente se le ha implicado en la patogénesis de tumores de músculo liso en inmunodeprimidos y en carcinoma gástrico.

La infección se adquiere por transmisión oral -saliva- y, tras una fase de multiplicación en las células de la orofaringe, se produce la infección de los linfocitos tipo B, en los que se inicia una fase de latencia. En los ciclos líticos se produce replicación, síntesis protéica y génesis de nuevos virus, mientras que en fase de latencia se producen sólo algunas proteínas y no se desarrollan viriones. Al contrario que el resto de los herpesvirus, probablemente el VEB es más peligroso en la fase de latencia, pues en este estadio inmortaliza a las células que infecta, lo que podría intervenir en la patogénesis de algunos tumores. El ADN viral es lineal en las partículas virales, pero existe en las células infectadas.

En cualquiera de los dos ciclos virales -el lítico y el transformante- se produce una notable variedad de proteínas cuyo conocimiento es fundamental no sólo para la patogénesis, sino para comprender las pruebas diagnósticas. Se conocen dos ARN nucleares (EBER) que se expresan a muy altos niveles en todas las células tumorales infectadas por el VEB. Entre los antígenos que se expresan en las células infectadas de forma latente figuran los seis del tipo EBNA, las tres proteína latentes de membrana detectable en linfocitos (LYDMA). Entre los que son producidos en las fases líticas, además de los anteriores, figuraran los precoces (EA) y el antígeno de la cápside (VCA). Los antígenos EA pueden aparecer como difusos (EAd) con un patrón de tinción citoplasmático y nuclear o restringidos (EAR) con patrón de tinción citoplasmático perinuclear.

MONONUCLEOSIS INFECCIOSA Y VIRUS EPSTEIN-BARR

La mononucleosis infecciosa es una de las patologías más comunes y que a la vez alarman más al paciente y al médico que lo atiende. Es, por tanto, muy importante aplicar técnicas que den un diagnóstico certero en el menor tiempo posible. El estudio serológico de las infecciones por VEB es de gran utilidad en el laboratorio de Microbiología pues permite el diagnóstico de la enfermedad en fase aguda sin tener que esperar, como ocurre en otras infecciones, a la recuperación del enfermo para realizar el diagnóstico. La mononucleosis infecciosa se diagnostica serológicamente pues las técnicas de cultivo celular, por su dificultad y lentitud, no tienen apenas aplicación en un contexto clínico. Tampoco pensamos que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR, tengan ninguna utilidad en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa.

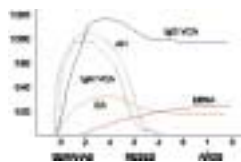
Al inicio de la infección aparecen anticuerpos tipo IgM contra el VCA que se mantienen aproximadamente unos tres meses en el suero; simultáneamente con la IgM, aparecen IgG que se detectan durante toda la vida, e IgG contra el EA en un 90% de los individuos, persistiendo durante unos tres meses, aunque en un 4-20%, estos anticuerpos son positivos por tiempos más prolongados. Los anticuerpos IgG frente al EA aparecen en la convalecencia, fundamentalmente tras la infección crónica y en el linfoma de Burkitt. Aunque los EBNA son las primeras proteínas que se expresan en las células infectadas, los anticuerpos frente a estas proteínas no aparecen en la infección primaria sino unos meses más tarde y se detectan de por vida (Figura 11).

La determinación de anticuerpos heterófilos es precoz, sensible y específica de la mononucleosis por VEB, pero tiene el inconveniente de ser negativa al menos en un 50% de los niños menores de 5 años. Los anticuerpos heterófilos aparecen en el 90% de los enfermos adultos con mononucleosis por VEB. La prueba Paul-Bunnell-Davidsohn mide anticuerpos heterófilos que aparecen en otras enfermedades por ser absorbidos por hematíes de buey, pero no por células de riñón de cobaya. Frecuentemente, la prueba se realiza en forma de técnica spot de forma cuantitativa pero, alternativamente, puede cuantificarse fácilmente utilizando diluciones en microplaca. No se recomienda utilizar la prueba sin realizar absorción o empleando para la detección de anticuerpos heterófilos otro tipo de hematíes diferentes a los de caballo. La determinación de anticuerpos heterófilos puede hacerse con látex sensibilizado con antígenos de hematíes altamente purificado, lo que hace innecesario la absorción de anticuerpos tipo Forssman.

Las pruebas serológicas que miden anticuerpos específicos frente al VEB son esenciales en los casos de mononucleosis infecciosa con anticuerpos heterófilos negativos, también en los casos con anticuerpos heterófilos positivos y que presentan síntomas clínicos poco característicos.

Gracias a su gran sensibilidad y especificidad, las pruebas de inmunofluorescencia son el método de elección en la detección de anticuerpos frente al VEB. De las diferentes determinaciones de anticuerpos frente a este virus, sin lugar a duda la más útil en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa es la detección de IgM anti-VCA, pues es positiva al menos en el 90% de los enfermos. La infección aguda se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra el VCA y la ausencia de anticuerpos dirigidos frente al complejo EBNA, fundamentalmente frente a EBNA-1. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la IgM puede no aparecer o persistir durante meses o incluso años y, por otro lado, la respuesta inmune al antígeno EBNA-1 puede no aparecer nunca o volverse negativa en el caso de inmunodepresión. No puede deducirse en modo alguno que estamos en presencia de una infección reciente por muy alto que sea el título de IgG anti-VCA obteniendo. Los obtenidos a partir de células infectadas dan sensibilidades y especificidades no muy altas, lo que ha impedido su generalización. Para la detección de anticuerpos de ELISA dan unos buenos resultados empleando antígenos recombinantes (tabla 7 y 8).

Mientras que en la mayor parte de las determinaciones virales se estudian dos sueros y se comparan títulos para realizar el diagnóstico, en la infección por el VEB habitualmente sólo se utiliza una sola muestra de suero, pues ya en la fase aguda de la enfermedad es posible detectar IgM a títulos altos y generalmente no es posible detectar seroconversión IgG cuando se emplea un suero convaleciente. La determinación de IgM anti-VCA debe realizarse tras separar la fracción IgM del suero anti-IgG que elimine este tipo de inmunoglobulinas, puesto que de otra forma conducirá a una falta de sensibilidad (competencia con las IgM) y de especificidad en presencia de factor reumatoideo. Un inconveniente de la determinación de IgM de VCA es que puede ser positiva en enfermos con infección por CMV, por estímulo parcial.



ENFERMEDADES TUMORALES

En las neoplasias asociadas al VEB pueden ser útiles las pruebas serológicas, las técnicas de inmunohistoquímica y los métodos de biología molecular. Todas ellas tropiezan con la dificultad de la alta prevalencia de la infección y con la necesidad de cofactores externos para desarrollar

su capacidad transformante. Más aún, los pacientes que sufren estos procesos, o son inmunodeprimidos o lo estarán como consecuencia, cabe esperar en estos pacientes una respuesta serológica anómala. Por ejemplo, los anticuerpos anti-EBNA no siempre aparecen, la respuesta de IgM y a EA tampoco es clara; por

lo que la mayor parte de de los autores miden la infección por cambios en la IgG anti-VCA. En estos pacientes la IgM anti-VCA sólo aparece en el 50% de las infecciones primarias y puede incluso presentarse en las reactivaciones. Cuando se trata de una primoinfección en este grupo la serología (cambios en la IgG) es útil, pero en las reactivaciones es mucho más complejo su diagnóstico serológico; en estas circunstancias se utilizan fundamentalmente los cambios en los títulos de anticuerpos frente al EA. En cualquier caso es necesario tener en cuenta que, en las

determinaciones de anticuerpos específicos, existe una gran variabilidad de títulos en la población, en función de la edad o de la funcionalidad de su sistema inmune. En el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y en inmunodeprimidos se encuentran títulos altos frente al VCA y el EA. La respuesta frente al EA está dirigida al EAr en el linfoma de Burkitt y en los inmunodeprimidos y frente al EAd en el carcinoma de nasofaringe (tabla 7).

TABLA 7
Marcadores serológicos en la infección por el virus Epstein-Barr(abreviaturas en el texto).

	Anticuerpos Heterófilos	Anticuerpos anti-VCA			Anti-Ead	Anti-EAr	Anti-EBNA
		IgG	IgM	IgA			
Mononucleosis Infecciosa	+	+	++	±	+	-	-
Infección antigua	±	+	-	-	-	-	+
Infección crónica activa	-	+++	-	±	+	++	±
Procesos Linfoproliferativos	-	++	-	±	+	+	±
Linfoma de Burkitt	-	+++	-	-	±	++	+
Carcinoma nasofaríngeo	-	+++	-	++	++	±	+

TABLA 8
Técnicas de inmunofluorescencia para medir anticuerpos dirigidos contra proteínas del virus Epstein-Barr (ver abreviaturas en el texto).

Antígeno	Tipo de células	Procedimiento de fijación	Técnica
VCA	P ³ HR ¹	Acetona	IFI
EAr	Raji	Acetona	IFI
EAd	Raji	Metanol-acetona	IFI
EBNA	Raji	Metanol-acetona	IFI anti C-3

La detección de niveles anormales elevados a algunas de las proteína del VEB tiene impacto en el diagnóstico precoz de algunos de los tumores asociados a este virus y en su tratamiento. La mayor parte de enfermos con carcinoma nasofaríngeo desarrollan respuesta de IgA a diferentes proteínas del VEB. Las pruebas serológicas más utilizadas en el carcinoma de nasofaringe son la determinación de IgA frente a VCA y EA, presentando la primera una sensibilidad cercana al 100% y la segunda una

especificidad también cercana al 100%. El carcinoma nasofaríngeo es uno de los tumores más fácilmente tratables si se realiza un diagnóstico precoz por lo que, dada la fiabilidad de las determinaciones serológicas, se está realizando detección en masa en las zonas endémicas de este tumor. Estas pruebas pueden tener valor también en el seguimiento de los enfermos, pues se ha demostrado que los títulos estables o descendentes se correlacionan con un buen pronóstico. Se ha utilizado un ELISA para

detectar anticuerpos anti-EBNA 1, encontrándose resultados positivos en el 91% de los enfermos de carcinoma de nasofaringe. Los títulos elevados a VCA y EA tienen valor pronóstico en el linfoma de Burkitt.

El otro tipo de técnicas que tiene aplicación - fundamentalmente en laboratorios de investigación- en los carcinomas asociados al VEB son la determinación de antígenos virales en los tejidos y la detección del ADN del virus. Los antígenos se expresan en tan poca cantidad en las células que hay que recurrir a técnicas de inmunofluorescencia anticuerpo para poder demostrar su presencia. La determinación de antígenos como el EBNA o las LMP requiere que la conservación y la preparación de la muestra sea muy buena. Para demostrar el ADN en tejidos se ha empleado el *southern blot*, el *dot blot*, la PCR y la hibridación *in situ*. Debido a la contaminación de la muestra con linfocitos, las técnicas *southern blot*, *dot blot* y PCR son menos específicas que la hibridación *in situ*, que es, sin embargo, menos sensible. En cualquier caso no es necesario remarcar de nuevo que estas técnicas no deben emplearse en rutina debido a su complejidad y falta de estandarización. Aunque la presencia del virus puede ser secundaria al proceso tumoral, el ADN viral no se encuentra en los tejidos linfoides de enfermos con neoplasias no asociadas al VEB cuando se emplean técnicas de hibridación. La utilización de sondas dirigidas a los EBER incrementa la sensibilidad de las técnicas de demostración de ADN.

En algunos individuos la infección queda crónicamente activa, con títulos elevados a las proteínas de la fase replicativa del ciclo. Aparecen síntomas persistentes, tales como esplenomegalia y se produce un patrón recurrente que dura meses o años, que se manifiesta, por ejemplo, con pancitopenia. Aunque la patogenia es desconocida, aparecen anomalías del sistema inmune, como inversión del cociente CD4/CD8, hipergammaglobulinemia y baja tasa de células *natural Killer*. En estos enfermos suelen detectarse títulos elevados de anticuerpos anti-VCA y anti-EA sin presencia concomitante de anti-EBNA.

HERPES VIRUS HUMANOS 6 y 7

INTRODUCCION Y SIGNIFICADO CLINICO

El HVH-6 fue aislado por primera vez a partir de linfocitos de sangre periférica en seis pacientes con síndromes linfoproliferativos, dos de ellos coinfectados con el VIH. Recientemente se han diferenciado dos subespecies o variantes denominadas, respectivamente, A y B. El HVH-6 es un virus linfotropo y citopático que ha sido implicado en numerosos cuadros clínicos y también como cofactor en la progresión de SIDA. Actualmente, se le considera el agente etiológico

del exantema súbito (*roseola infantum*), la manifestación clínica de la infección primaria. También es responsable de hepatitis activa en pacientes con un cuadro semejante a la mononucleosis, en algunos casos es el único agente encontrado en una mononucleosis infecciosa. No está clara su implicación en otros cuadros como el síndrome de fatiga crónica, diversos síndromes linfoproliferativos, encefalitis, etc.

Tampoco lo están los mecanismos de transmisión. Tras la infección primaria (en la primera infancia), el HVH-6 persiste en diversas células y tejidos, como las glándulas salivales. Es muy probable que la saliva ocupa un papel central en la transmisión. La consecuencia final es la elevada seroprevalencia en los adultos, por encima del 70%.

El HVH-7 es el más reciente de los herpesvirus que afectan al hombre. Se aisló en 1989 a partir de linfocitos de sangre periférica, en condiciones de activación de células T, células para las que presenta tropismo. A destacar que presenta homología con el HVH-6, lo que determina reacciones cruzadas entre ambos virus, pero no protección de uno frente al otro. La seroprevalencia es muy elevada, del orden del 80% o superior en adultos. El HVH-7 se ha aislado de saliva en un porcentaje elevado de adultos sanos seropositivos, lo que indica que es un habitante frecuente en esta localización y permite delinear sus mecanismos de transmisión aunque representa una dificultad añadida a la hora de conocer su significación clínica. Se le ha implicado, de nuevo, en el síndrome de fatiga crónica, así como en algunos procesos febriles y en cuadros exantemáticos infantiles.

DIAGNOSTICO

No es difícil adivinar que el diagnóstico de ambos virus es complejo. Por lo que respecta al HVH-6, hay que diferenciar los **pacientes inmunocompetentes** de los que no lo son. En los primeros, el cuadro clínico más frecuente es el exantema súbito en niños y, muy raramente, la mononucleosis infecciosa y la hepatitis. En muchos casos, la confirmación diagnóstica es innecesaria. Cuando no es así, se lleva a cabo por serología, mediante técnicas de IF y de ELISA comerciales. La aparición de IgM se asocia a la fase aguda de la infección. Las IgG aparecen algo después, siendo diagnósticas la seroconversión o la presencia de títulos elevados en una sola muestra. Deben destacarse simultáneamente otros agentes etiológicos de mononucleosis y hepatitis. También tendremos muy en cuenta la existencia de reacciones cruzadas con el HVH-7, por lo que es conveniente absorber los sueros antigénico de este virus. Este caso no se lleva a cabo con los métodos comerciales actuales, por lo

que no pueden descartarse esos falsos positivos. El aislamiento del virus a partir de saliva es teóricamente posible durante la infección activa y también durante la fase de latencia. Este hecho, unido a la dificultad metodológica, hace que no se recomiende en el diagnóstico de rutina. Las infecciones por HVH-6 **en inmunodeprimidos** (neumonitis, encefalitis) pueden diagnosticarse serológicamente en ciertos casos, siguiendo los criterios anteriores. A causa de la escasa respuesta de anticuerpos que puede presentarse en estos pacientes, es posible que debamos recurrir a otras técnicas, como la amplificación por PCR sobre suero, plasma o LCR. Se recomienda derivar estas muestras a centros de referencia.

Por lo que respecta al HVH-7, al no estar bien definida su significación clínica, **no se recomienda** su investigación rutinaria. El diagnóstico deberá estar restringido a fines de investigación en centros especializados.

PCR Y HERPESVIRUS: AÑO 1995

CONSIDERACIONES GENERALES

La detección de genoma tras amplificación mediada por la creacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido una alternativa valiosa para el diagnóstico de algunas infecciones en las que los métodos disponibles eran ineficaces. Además, está sirviendo para conocer la patogenia de las misma, que había sido imposible antes de disponer de esta metodología. Los herpesvirus no han sido una excepción. Sin embargo, todavía no se conoce su <<lugar>>, debiendo usarse sólo cuando se agoten las posibilidades de las técnicas convencionales.

La característica fundamental de la PCR es su elevada sensibilidad. En algunos cuadros clínicos asociados a herpesvirus ha llegado a ser el *gold standard* y es aquí donde se encuentran sus aplicaciones más definidas. La sensibilidad puede verse afectada por diversos factores: tipo de iniciadores, el método de extracción y por las sustancias inhibitoras de la Taqpolimerasa presentes en la muestra clínica. La extrema sensibilidad es también un arma de doble filo, pues nos puede plantear problemas de interpretación de los resultados, algunos herpesvirus constituyen un ejemplo paradigmático. La especificidad es también muy elevada,

dependiendo de la adecuada selección de los iniciadores y del uso de una técnica depurada que evite contaminaciones de amplificados (*carry over*). Está fuera del ámbito de este protocolo la descripción detallada de los aspectos técnicos que condicionan la calidad de los resultados, remitiendo a lector a manuales específicos.

Como norma general aplicable a los herpesvirus, la introducción de una técnica de PCR en un determinado laboratorio con fines diagnósticos debe llevar aparejada una puesta a punto previa muy rigurosa. Deben incluirse numerosos controles y, sobretodo, el microbiólogo deberá estar seguro del significado de sus posibles resultados. Estas son las razones que limitan hoy en día la aplicación de las técnicas de PCR en el campo que nos ocupa. En la tabla 9 resumimos algunas aplicaciones definidas y otras situaciones en las que **no** debe emplearse la PCR. Hacemos la observación de que los avances técnicos obligan a revisar conceptos de forma continua: de ahí el título del presente apartado.

PCR Y VIRUS HERPES SIMPLEX

De las diversas aplicaciones de la técnica PCR en las infecciones por los VMS, es el diagnóstico de las encefalitis la única aceptada de forma unanime. Como norma general, la PCR es más sensible que el cultivo, sobretodo en aquellos casos en los que hay pocas partículas víricas en la muestra (menor umbral de detección). Esto ocurre sólo en determinadas ocasiones con los VMS y es una consideración fundamental a la hora de aplicar la PCR.

Existen en la literatura numerosos protocolos de amplificación del ADN de los VHS. Se han utilizado multitud de iniciadores, algunos comunes a los dos tipos, otros específicos de cada virus. La tendencia actual es la de utilizar iniciadores que amplifiquen los dos tipos a la vez y que permitan su detección específica, bien por la longitud del amplificado o tras restricción del mismo con endonucleasas. Suelen amplificarse secuencias de los genes de la ADN polimerasa viral, así como de las glucoproteínas B y G.

*Síndromes neurológicos

Representan la indicación más aceptada. tanto en las encefalitis (VHS-I, sobretodo)

TABLA 9
Recomendaciones de la PCR en el diagnóstico de infecciones por herpesvirus (año 1995)

Virus ^a	Aplicable	No recomendable
VHS	Encefalitis y meningitis (sobre LCR*) Herpes neonatal sin lesiones cutáneas (LCR)	Infección cutánea en pacientes normales Cribado pre-parto de embarazadas Cribado de implantes corneales

VVZ	Infecciones cutáneas en inmunodeprimidos ^b Síndromes neurológicos en inmunodeprimidos (LCR) Neumonitis ^b Diagnóstico diferencial de retinitis en SIDA	Infección cutánea en inmunocompetentes
CMV	Infecciones del SNC ^a en pacientes con SIDA (LCR)	Otras infecciones en pacientes con SIDA ^b Infección congénita Infecciones en trasplante, salvo SNC Mononucleosis infecciosa
VEB	Afectación del SNC, sobre LCR, en SIDA Investigación de la patogenéstitis	
HVH-6	Con fines de investigación	Infección cutánea en pacientes normales
^a SNC: Sistema nervioso central; resto de abreviaturas, en el texto		
^b posibilidad de aplicación condicionada a casos en los que las técnicas habituales sean insuficientes		

como en la meningitis (VHS-2, predominantemente) en algunas ocasiones este último cuadro se asocia con lesiones genitales, pero no siempre. En ambos casos, es posible detectar los VHS en muestra de LCR en estadios iniciales de la enfermedad, lo que permite instaurar una terapéutica precoz que tiene gran importancia en el pronóstico. Por supuesto, pueden detectarse los virus en tejido cerebral, pero la práctica de biopsia con estos fines ha quedado en desuso ante la eficacia del aciclovir.

* Infecciones congénitas y neonatales por los VHS

El herpes neonatal se presenta como a) un cuadro que afecta a piel, b) encefalitis, y c) infección diseminada. Se asocia sobretodo al VHS-2 y, a veces, estos cuadros están superpuestos. Cuando existen lesiones cutáneas, no está indicada la PCR; hasta el cultivo a la detección directa de antígeno. No es infrecuente la afectación neurológica del neonato en ausencia de lesiones dérmicas. En este caso, la PCR sobre LCR es el método de elección porque no suele detectarse genoma en la sangre o suero del paciente.

Debido a su rapidez y su sensibilidad algunos autores han propuesto a la PCR como método de despistaje de VHS en embarazadas en momentos cercanos al parto. Como la técnica puede detectar excreción asintomática, no es posible adoptar medidas activas (v.g. parto por cesárea). Por lo tanto, no se recomienda la PCR con estos fines.

* Lesiones dérmicas y corneales

La técnica de PCR tampoco es recomendable como método diagnóstico de las infecciones cutáneas. Aquí el cultivo y la detección de un tígeno ofrecen resultados razonablemente rápidos y son más sencillos de realizar. Sólo cuando fallen estos métodos y en casos muy concretos de pacientes inmunodeprimidos debemos plantearnos utilizar la PCR.

En las lesiones corneales, puede fallar el cultivo a causa de la dificultad en obtener la muestra; la PCR parece una opción razonable. Por otra parte,

se ha implicado a los VHS en el rechazo a mal prendimiento de trasplantes de córnea. Sin embargo, los estudios no son concluyentes por lo que no recomendamos la puesta a punto de la PCR como técnica previa al trasplante de córnea.

PCR Y VIRUS VARICELA-ZOSTER

La PCR es mucho más sensible que el aislamiento en cultivo del VVZ, sobretodo debido a la labilidad del mismo y a que, en ocasiones, la carga viral es muy escasa en determinadas muestras. Actualmente se reconoce su mayor sensibilidad y rapidez diagnóstica en líquidos de vesículas, costras, muestras respiratorias, líquido articular y cefalorraquídeo, humos vítreo, etc. A pesar de ello, las aplicaciones concretas en el diagnóstico deben matizarse.

Desde el punto de vista de investigación, la PCR ha permitido avances notables en el conocimiento de la patogenia de la infección primaria y en las recurrencias (fases de viremia, afectación de sistema nervioso central, mecanismos de transmisión, etc.). También permite distinguir entre las infecciones naturales y las producidas por el virus atenuado (cepa OKA) de la vacuna actual.

Técnicamente, la PCR puede llevarse a cabo por varios métodos, pero es recomendable seguir un protocolo de doble (*nested*) PCR o de amplificación seguida de hidratación con sonda (hasta ahora con ³²P) ya que las principales indicaciones se centran en muestras con bajo contenido de ADN viral. Existen diversos iniciadores descritos en la literatura, presentando todos ellos buena sensibilidad y extrema especificidad, por lo general. Así pues, podemos considerar actualmente a la PCR útil en el diagnóstico de los siguientes procesos causados por el VVZ:

* **Infección primaria o reactivaciones en inmunodeprimidos**, donde es necesario el diagnóstico diferencial con las infecciones diseminadas causadas por los VHS debido a su semejanza clínica y a la diferente sensibilidad a

los antiviricos que muestra cada virus. Es posible su detección en líquido vesicular y en leucocitos de sangre periférica. La PCR se utilizará sólo cuando sean insuficientes otras técnicas más sencillas como la detección de antígenos o el cultivo como, por ejemplo, cuando las lesiones están muy evolucionadas, cuando media el tratamiento o cuando la muestra deba remitirse a otro laboratorio para cultivo (labilidad del virus).

En los pacientes inmunocompetentes, definitivamente, **no** esta indicado el uso de la PCR para el diagnóstico de las infecciones cutáneas puesto que los cuadros clínicos son típicos y presentan un curso benigno y autoalimitado.

* **Complicaciones neurológicas** (encefalitis, meningoencefalitis, meningitis, mielitis, etc). Es una recomendación indiscutible en estas situaciones, puesto que el cultivo carece de rentabilidad diagnóstica. La PCR, llevada a cabo sobre LCR permite el diagnóstico de estas infecciones y la instauración de la terapia adecuada.

* **Complicaciones respiratorias** (neumonitis), a partir de lavado broncoalveolar u otras muestras respiratorias profundas, limitada a pacientes inmunodeprimidos y cuando no sean viables otros métodos, como la detección de antígeno en lesiones cutaneas o el diagnóstico serológico.

* **Complicaciones retinianas en pacientes con SIDA**, cuando deba establecerse diagnóstico diferencial con el CMV que conduzca a terapia antiviral específica. Se han descrito casos sin presencia de lesiones cutáneas. La muestra adecuada es el humor vítreo.

PCR Y CITOMEGALOVIRUS

Las técnicas de PCR actuales encuentran un obstaculo adicional en el diagnóstico de las infecciones por el CMV: la facilidad con que el virus reactiva y se replica sin dar lugar a enfermedad dificulta su valoración. Con carácter general sólo debe aplicarse a casos en los que es necesario disponer de métodos con la máxima sensibilidad. Aunque, en teoría puede utilizarse en el diagnóstico de múltiples infecciones por CMV en inmunodeprimidos, debemos realizar las consideraciones siguientes:

* **Infecciones del sistema nervioso central** (encefalitis, polirradiculitis, mielitis, etc.) Este tipo de afectación suele aparecen en pacientes con SIDA. La detección de genoma en LCR es el método de elección. Se correlaciona con los estudios histopatológicos y con las manifestaciones clínicas. Es mucho más sensible que el cultivo, a la vez que rápido y no invasivo.

* **Otras infecciones por CMV en pacientes con SIDA** (retinitis, esofagitis, duodenitis, colitis, etc.). De ellas, la más frecuente es la retinitis, que suele diagnosticarse por exploración oftalmológica. En algunos casos seleccionados, cabe la necesidad de un diagnóstico diferencial (v.g, con el VVZ). En estos casos, la confirmación se llevará a cabo sobre humor vítreo. No debe aplicarse sobre otras muestras, como orina, sangre, etc., que no confirmarían el diagnóstico etiológico de retinitis por CMV. El resto de cuadros se diagnostica por cultivo o *shell vial*. La PCR es aquí una técnica alternativa cuando estos se muestren insuficientes. El valor de la PCR sobre suero en pacientes con SIDA y afectación visceral no esta por completo establecido, por lo que sólo se recomienda con fines de investigación.

* Infecciones congénitas y neonatales.

Puede detectarse ADN de CMV en suero y LCR de neonatos con infección congénita. Sin embargo, **no** se recomienda realizarla, ya que la infección congénita grave se diagnostica fácilmente por cultivo. Recientemente se ha descrito que los infectados con detección de genoma en LCR se correlacionan con retraso en el desarrollo neurosensorial. Si se confirman estos datos, podría constituir una aplicación de la PCR en un futuro próximo.

* **Infecciones en trasplantados.** Aunque se ha estudiado profundamente en estos pacientes la PCR no tiene por ahora un lugar en el diagnóstico en este tipo de pacientes. La PCR es muy sensible y puede predecir precozmente el riesgo de reactivación, lo que no quiere decir enfermedad. **No** se recomienda llevarla a cabo sobre leucocitos de sangre periférica o muestras de orina o saliva. No obstante, aunque no estén bien definidas sus aplicaciones quizá los trasplantados de médula ósea o pulmonares sean los grupos con indicaciones futuras más precisas.

Algunos estudios han mostrado que en detección en suero o plasma o la PCR cuantitativa sobre leucocitos se correlacionan bien con la aparición de síntomas asociados al CMV y con la evolución favorable del tratamiento antiviral. Lo mismo puede decirse con la amplificación de ARNm en leucocitos o plasma. Por ahora, la información de que disponemos es limitada y no permite establecer una recomendación definitiva.

PCR V VIRUS DE EPSTEIN-BARR

La PCR para detectar el VEB es actualmente la que menos aplicación diagnóstica tiene en la práctica diaria. Se ha utilizado para la investigación de la implicación patogénica en determinados procesos linfoproliferativos y por confirmar su papel en otros ya conocidos, así como para diferenciar los subtipos virales. **No**

tiene utilidad diagnóstica en los síndromes agudos producidos por el VEB, como la mononucleosis infecciosa, puesto que hay métodos serológicos más probados y confirmados actualmente. Es posible detectar genoma viral en los linfocitos de pacientes seropositivos sin enfermedad por el VEB. Aunque hay asociación entre síntomas y cantidad de genoma presente en la muestra, la utilidad de las técnicas cuantitativas de PCR no ha quedado establecida por el momento. También está pendiente de confirmación el empleo de la PCR como marcador precoz en los síndromes linfoproliferativos asociados al VEB. En estos momentos, la aplicación queda técnicamente establecida en el diagnóstico de la afectación del sistema nervioso central en pacientes con SIDA, a partir de muestra de LCR.

PCR Y HERPESVIRUS HUMANO TIPO 6

Las principales aplicaciones de la PCR en el HVH 6 se han centrado en la investigación de la patogenia de este virus. En el exantema súbito se detecta genoma en linfocitos, suero y plasma durante la fase aguda, persistiendo en aquellos durante la fase de convalecencia. También puede detectarse en saliva, con preferencia en la fase convaleciente, no tanto en la fase aguda. Con posterioridad es posible poner de manifiesto el virus de forma intermitente. No parece justificado utilizar una técnica como PCR para diagnosticar una enfermedad benigna.

En el resto de cuadros asociados al HVH-6 (síndromes linfoproliferativos, hepatitis, etc.) el conocimiento de su importancia patógena no está suficientemente aclarado. Para resumir no se recomienda la PCR como técnica diagnóstica por el momento. Tal vez esta técnica encuentre su aplicación, caso de confirmarse la implicación del virus en cuadros de encefalitis en niños.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIVIRALES: PROTOCOLOS PRACTICOS

Actualmente disponemos de terapia eficaz frente a algunos herpesvirus: aciclovir para los VHS y el VVZ, ganciclovir para CMV. El foscarnet está indicado principalmente en infecciones por CMV, aunque también se utiliza en infecciones por VHS y VVZ cuando no hay respuesta al aciclovir. A pesar de su eficacia, ya se han descrito resistencias a los antivirales de elección. El fenómeno es excepcional en los pacientes inmunocompetentes (no alcanza el 1%). Es más preocupante en los inmunodeprimidos, sometidos a tratamientos intermitentes y prolongados, en los porcentajes de resistencia oscilan entre 15-40%. Aunque se han descrito recidivas por cepas resistentes. La relación entre resistencia y recurrencia no está aún demostrada. La profilaxis antiviral no parece seleccionar cepas resistentes.

El incremento de numerosas drogas efectivas y la aparición de cepas resistentes crea la necesidad de disponer de ensayos rápidos y sencillos para la detección de la sensibilidad a los antivirales. Aunque se hacen notables avances, todos los métodos son laboriosos y complejos. Por esa razón, las pruebas de sensibilidad deben estar restringidas a casos con sospecha fundada.

La técnica estándar para determinar la sensibilidad de los virus citopagénicos a las drogas en el ensayo de reducción de placas, pero están surgiendo métodos más rápidos y sencillos, que están desplazando a los ensayos clásicos para evaluar la sensibilidad de los aislamientos.

ENSAYO DE REDUCCION DE PLACAS

Se basa en la capacidad de inhibir la formación de placas en presencia de la droga, partiendo de una cantidad de virus conocido. Previo al ensayo se titula el inóculo en unidades formadoras de placas por μl (UFP/ μl), que produce el virus en una monocapa celular permisiva.

- Se inocula una dilución de virus conocida (100-200 UFP en 500 μl) en 5 pocillos de una placa de 24 con monocapa de células susceptible (Vero, BGM o MRC-5 para VHS; MRC-5 para CMV y VVZ).

-Después de una incubación de 1 hora para permitir la absorción del virus, se retira el inóculo y se añade 1 ml medio de mantenimiento (MEM con L-glutamina y antibióticos) y al que se añade un 0,6% de agar o 1-2% de metilcelulosa (o bien antisuero específico frente al virus que se estudie) y distintas concentraciones de la droga, dependiendo del antiviral. Un pocillo sirve como control y no lleva antiviral. La adición de metilcelulosa, agar o antisueros impide la liberación al medio del virus, provocando la formación de placas por contacto. En el caso de que estos reactivos inhiban el crecimiento viral, se puede añadir al medio sulfato de protamina.

-Los cultivos se incuban 72 horas a 37°C y una atmósfera de 5% de CO_2 , en el caso de los VHS. Cuando se ensayan cepas de CMV y VVZ, debido a que su crecimiento es más lento, es necesario incubar durante 7 días. También se requiere la extracelularidad de la cepa a ensayar, que se consigue con 6-7 pases del cultivo convencional del CMV o VVZ.

- Posteriormente, se tiñen los pocillos con cristal violeta (1% de cristal violeta, 10% formalina, 5% ácido acético, 60% metanol, 25% agua) y se incuban una hora a temperatura ambiente, se lavan con agua y se cuentan las placas en cada pocillo con y sin droga, hallando el porcentaje de reducción de cada dilución de la droga con respecto al pocillo control y extrapolando la dosis inhibitoria al 50% (ID_{50})

El ensayo es sencillo cuando se manejan pocas muestras, pero resulta tedioso, consume mucho tiempo, se necesita gran cantidad de virus, células y droga y es difícil de automatizar. Por otra parte, el número de placas que se puede contar está limitado por el tamaño de la placa de cultivo usada, por la distribución del virus en la placa y por las características biológicas del sistema virus/célula. Una modificación rápida del ensayo es utilizar (3 µg/ml para aciclovir y VHS) como dilución límite. La reducción de más del 50% se considera cepa sensible, la reducción de menos del 10% se considera resistente, y la reducción entre el 10-50% se considera indeterminado.

ENSAYO DE CAPTACION DE COLORANTE

Desarrollado originalmente para medir la actividad de interferón, se basa en la captación de un colorante, como el rojo neutro, por células vivas. Así es posible conocer, por espectrofotometría, el porcentaje de células vivas en un sistema celular inoculado con un determinado virus y al que se le añade antiviral, a la vez que la inhibición del antiviral. Para ello se utiliza un aislado viral de título conocido previamente, aunque se puede realizar la titulación a la par que el ensayo antiviral. Se procede como sigue:

- Se inocula una cantidad conocida de virus (100 TCID₅₀) diluida en 100 µl de medio de mantenimiento en 24 pocillos de una placa de 96. Otros 24 pocillos se dejan como control a los que se añade 100 µl de medio de mantenimiento. En todos los pocillos se añaden 25000 células Vero en 100 µl de medio de mantenimiento suplementado con 5% de suero fetal bovino.

A cada 8 pocillos, 4 con dilución viral y otros 4 sin dilución viral, se añaden 50 µl de las distintas diluciones de la droga en concentración 5 veces la requerida. Se dejan 8 pocillos de control sin antiviral: 4 con suspensión viral y 4 como control de células, todos con 50 µl de medio de mantenimiento.

- Las placas se incuban durante 72 horas a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Pasando ese tiempo se añaden 50 µl de una solución de rojo neutro al 0,15% en tampón fosfato monobásico de sodio 0,1 M (pH 6) y se incuban a 37°C durante 45 min en CO₂.

- Posteriormente, se invierte la placa y se rellena con PBS, para lavar. Se retira el medio y se añaden 150 µl de tampón de elución (fosfato monobásico de sodio 0.1 M y etanol al 95% a partes iguales). Se determina la densidad óptica de la solución 550 nm en un espectrómetro.

- Se asigna el valor 0 a la media de la densidad óptica de los 4 pocillos con los controles de células y el valor 100 a la media de la densidad óptica de los 4 pocillos con virus y sin antiviral. Se aplica la siguiente fórmula para conocer la concentración de la droga y de ahí deducir la reducción:

$$\% \text{ crecimiento} = ((CC_{ac} - X_{ac}) / (CC - Y)) \times 100$$

CC_{ac}: Densidad óptica media (DOM) del control de células con la dilución de la droga correspondiente.

XX_{ac}: DOM de los pocillos con virus a esa dilución de la droga

CC: DOM de control de células sin droga.

Y: DOM de densidad óptica de los pocillos con virus sin antiviral.

A partir de aquí, se puede calcular mediante una recta de regresión la ID₅₀ de la droga ensayada. Este método permite una automatización del sistema. Además permite detectar pequeñas cantidades de virus resistentes a aciclovir en una población viral heterogénea.

Como en el método anterior, cuando se ensayan cepas de CMV o VVZ, el tiempo de incubación es de 7 días variando también las concentraciones de las drogas, así como el sustrato (células MRC-5).

ENSAYO RAPIDO BASADO EN LA TITULACION DEL VIRUS POR EFECTO CITOPATICO (ECP) Y POSTERIOR TINCION VITAL.

Este método consiste en valorar la diferencia de título viral obteniendo mediante la visualización del ECP y complementando con tinción de rojo neutro, cuando se inocula la cepa del virus a ensayar en monocapas celulares tratadas o no con antiviral.

Para ello se utiliza una dilución única de la droga (4,4 µM de aciclovir en el caso de HSV-1, 8,8 µM de aciclovir en el caso de HSV-2, 11,1 µM para ganciclovir y 300 µM para foscarnet). A partir de una cepa aislada y con ECP que afecte al 70-90% de la monocapa celular donde crece, se realiza el ensayo de titulación del virus como sigue:

- Se realizan 6 diluciones seriadas en base 10 del sobrenadante del cultivo (en el caso de HSV) o en base 4 y células tripsinadas (para CMV).

- Se inoculan 100 µl de cada dilución viral en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos, sobre los que previamente se haya formado una monocapa de células permisivas. Se dejan 8 pocillos como control de células a los que se les añaden 100 µl de medio de mantenimiento. Se centrifuga la placa durante 45 minutos a 1800 rpm.

- Se retira el inóculo y se añaden 200 µl de medio de cultivo a 4 de los 8 pocillos de cada dilución viral y a 4 de los 8 pocillos control. A los 4 pocillos restantes con cada dilución viral y a los otros 4 pocillos control se les añade 200 µl de medio con la concentración de la droga que se le ensaya.

- Las placas se observan a los 2 los 4 días en los ensayos con HSV y hasta 7 días en el caso de CMV, y se determina el título de la cepa sin y con antiviral por la fórmula de Kärber.

Se considera que la cepa estudiada es sensible a la droga ensayada cuando la diferencia encontrada en los títulos es igual o mayor a 2 unidades (diluciones en base 10), o 3,3 veces en diluciones en base 4. En estas condiciones, la ID₅₀

del antiviral ensayado será menor que la diferencia es inferior a 2 (o 3,3), se realiza una tinción con rojo neutro como en el ensayo anterior. Se considera una cepa sensible si a la dilución del virus que se emplean 100 TCID₅₀, aplicando la fórmula anteriormente citada, el crecimiento no supera el 50%. En cualquier caso, es aconsejable que cepas comprendidas entre el 40-60% de crecimiento se ensayen de nuevo con todas las diluciones de la droga para conocer su ID₅₀. Este método es rápido, sencillo y económico que combina la titulación del virus, la formación de ECP y la tinción de células vivas para una correcta evaluación de la sensibilidad de unas cepas. El inconveniente evidente y de relativa trascendencia es el desconocimiento de la ID₅₀.

ENSAYO DE SENSIBILIDAD PARA CMV EN MUESTRAS SIN CELULARIDAD

El ensayo permite una detección rápida de cepas sensibles o resistentes a ganciclovir o foscarnet. Se realiza a partir de 300 µl de orina, previamente centrifugada, e inoculada en un *Shell vial*. Cuando a las 17 horas este se tiñe con anticuerpos monoclonales frente al antígeno temprano (E13) del CMV y se observa al menos 1 unidad formadora de antígeno (una célula positiva) (UFA/µl, se realiza el estudio de sensibilidad como sigue:

-Se ajusta la concentración viral de la muestra a 1-3 UFA/µL, inoculando posteriormente 300 µl por centrifugación en seis viales con células MRC-5 por cada antiviral ensayado.

-Se retira la muestra y se añade 1 ml de medio de mantenimiento con concentraciones crecientes de ganciclovir y de foscarnet. Se inocula también un control sin antiviral.

-A las 96 horas se fijan los viales con acetona fría, y se realiza una inmunofluorescencia indirecta para detectar antígeno tardío de CMV, y determinar la reducción del 50% de UFA, así como la ID₅₀.

El método es rápido y sencillo, pero requiere de una liberación grande de virus en la orina, y resulta caro al utilizar anticuerpos monoclonales para su identificación final.

OTROS ENSAYOS DE SENSIBILIDAD

En el caso de HSV también se estudia la capacidad de fosforilar productos como el aciclovir por cepas de HSV aisladas de un cultivo convencional, por métodos radiactivos, en un medio celular carente de TK (células 143 B). También se puede estudiar la cinética enzimática de la TK en sobrenadantes de aislados virales crecidos en las células anteriormente mencionadas con un sustrato radiactivo a fosforilar. En cualquiera de los dos métodos el inconveniente primordial es la utilización de material radiactivo y

deben considerarse como técnicas de investigación.

Otros ensayos que están en proceso de estudio son los métodos moleculares, por medio de hibridación con sondas específicas y posterior cuantificación de los duplex, o por medio de la amplificación genómica (PCR), con el estudio de los mutantes que provocan la resistencia, como en el caso del VIH. Sin embargo, estos estudios necesitan mayor elaboración, son más caros y aún no están al alcance de todos los laboratorios.

SUPUESTOS PRACTICOS COMENTADOS

SUPUESTO Nº 1

Una mujer de 34 años acude al Servicio de Urgencias de Ginecología por presentar lesiones ulcerosas y dolorosas en labio menor. El facultativo avisa al laboratorio para que realice una toma de muestra tratamiento antiviral si procede. Las vesículas, además de estar rotas, están localizadas en un zona de difícil acceso para realizar una impronta directa con el porta, por lo que se toma la muestra con una torunda, haciendo a continuación varias improntas perpendiculares al porta (no por extensión). Se tiñeron por inmunofluorescencia directa con monoclonales frente a VHS-1 y VHS-2, con resultados negativos para ambas.

Comentario. Los VHS deben ser considerados en el diagnóstico diferencial de las úlceras genitales, junto con otros patógenos bacterianos (*Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*) o víricos (VVZ, enterovirus). La negatividad de la técnica directa de detección de antígeno de los VHS no descarta esta etiología, sobretodo si existe dificultad en obtener una buena muestra, como es el caso. Por ello es necesario realizar un cultivo. La torunda se introducirá en un medio de transporte específico para virus. Se aconseja no demorar la inoculación más de 24 horas, si se envía a un laboratorio de referencia. El cultivo puede llevarse a cabo por la técnica rápida (método *shell vial*) aunque las ventajas frente al cultivo en tubo no son tan claras como en otros herpesvirus. En el caso presente, tanto el vial teñido con anticuerpos anti-VHS-2 como el cultivo pusieron de manifiesto la presencia de este virus.

SUPUESTO Nº 2

Una mujer embarazada se ve expuesta a uno de sus hijos que presenta varicela. ¿Cómo proceder en los siguientes supuestos?: a) los padres de la embarazada recuerdan que sufrió la varicela siendo niña; b) no lo recuerdan, y la mujer se encuentra en segundo trimestre de la gestación; c) no hay antecedentes y se encuentra en las dos últimas semanas de embarazo.

Comentario. En el supuesto a) no habrá que hacer nada. Los antecedentes históricos son suficientemente fiables y la paciente estará protegida frente a la infección con gran probabilidad. En el caso b) será apropiado realizar una determinación serológica, por ejemplo mediante un ELISA fiable. El resultado ayudará a tranquilizar a la paciente pues en la mayor parte de las ocasiones presentará anticuerpos a causa de una infección no advertida, pero no condicionará ninguna actitud preventiva. Por último, en el supuesto c) es posible adoptar medidas caso de ser susceptible. Entre ellas la vigilancia y el aislamiento de la gestante de posibles pacientes de riesgo (prematuros, inmunodeprimidos), también la administración profiláctica de inmunoglobulina anti-VVZ al recién nacido si la madre desarrolla la varicela en la semana anterior al parto. Para conocer el estado inmunitario de la madre es recomendable realizar una prueba ELISA o un látex para VVZ, ofreciendo esta última un resultado inmediato.

SUPUESTO Nº 3

Un paciente con SIDA presenta unas lesiones vesiculosas en disposición metamérica en región vecina al glúteo, de 48 horas de evolución. ¿Cómo realizar el diagnóstico diferencial?

Comentario. La presentación de las lesiones sugieren herpes zóster, pero convendría hacer el diagnóstico diferencial con otros herpesvirus, sobretodo en los pacientes inmunodeprimidos que pueden presentar formas atípicas, como es el caso. La prueba más indicada será aquí la detección directa de antígeno de VVZ en raspados de la lesión. Si está al alcance, habrá que complementarla con el cultivo viral. Hay que asegurarnos que se hace una buena toma de muestras, a ser posible por parte del personal del laboratorio. En estas condiciones, si es positiva, confirma el diagnóstico de zóster y, si es negativa, lo excluye con mucha probabilidad. El supuesto aquí presentado está adaptado de un caso real en el que se aisló un VHS tipo 2 en cultivo, siendo la detección directa de antígeno de VVZ negativa.

SUPUESTO Nº 4

Un recién nacido de quince días de edad desarrolla, tras una gestación y un parto normal, un cuadro de ictericia con hepatoesplenomegalia y alteraciones neurológicas, sin manifestaciones cutáneas. Se le cursa una serología de CMV que resulta positiva para IgG. Se desconoce el estado inmunitario de la madre durante el embarazo. En estas condiciones, ¿queda establecido el diagnóstico de infección congénita? Si no es así, ¿qué pruebas serían recomendables para llegar a un diagnóstico tipo definitivo?

Comentario. La detección de anticuerpos anti-CMV de la clase IgG no demuestra la presencia de

una infección congénita, pues buena parte de los recién nacidos presentan serología positiva a consecuencia de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos. El cuadro podría ser debido a diversos agentes etiológicos, víricos y bacterianos. Para llegar al diagnóstico es conveniente realizar cultivos bacterianos convencionales y practicar otras pruebas en el suero existente. Si se tiene acceso, es muy recomendable remitir cultivos para virus de orina y saliva. El aislamiento del CMV en cualquiera de estas muestras confirma el diagnóstico de infección congénita y no plantea especiales dificultades técnicas. Una prueba de IgM anti-CMV positiva también lo confirmaría, siempre que se lleve a cabo por una técnica que controle la presencia de factor reumatoideo.

SUPUESTO Nº 5

Se trata de un varón de 4 años de edad que presenta un cuadro clínico y analítico compatible con el diagnóstico de mononucleosis infecciosa. Se solicita al laboratorio serología de mononucleosis infecciosa y se remiten tres muestras de orina para el cultivo de CMV. En el laboratorio se realiza una determinación de anticuerpos heterófilos mediante una prueba *spot* y esta resulta negativa. Se lleva a cabo también una determinación de IgM contra VCA, sin tratamiento previo del suero para retirar las IgG y se obtiene también un resultado negativo. Después de tratar al suero de enfermo con una anti-IgG, se repite la prueba y se detecta IgM anti-VCA. Las tres muestras de orina son negativas para CMV utilizando la técnica rápida de *shell vial*.

Comentario. En el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa es muy importante conocer la edad del enfermo, pues si es un niño pequeño debemos realizar serología específica del VEB y, si es una persona mayor de 25 años, lo más probable es que sufra una infección por el CMV. Aunque casi el 90% de los casos de mononucleosis infecciosa están causados por el VEB, existen un porcentaje pequeños atribuible a otras etiologías, como el CMV (5-7%), *Toxoplasma gondii* (1%), VIH, adenovirus; algunos casos son de etiología desconocida. En el diagnóstico serológico de la infección se emplea la detección de anticuerpos heterófilos y las determinaciones de anticuerpos dirigidos contra los antígenos VCA, EA y EBNA, ya que éstos presentan patrones diferentes según el momento de evolución de la infección, permitiendo determinar serológicamente el estadio de ésta. Dentro de las pruebas específicas, la determinación de IgM anti-VCA es claramente la prueba recomendada.

Es muy importante el tratamiento del suero para separar IgG que puede competir con la IgM y originar un resultado falsamente negativo. La

presencia de factor reumatoideo es también fuente de error, pues puede determinar la obtención de un resultado positivo falso. Existe una importante reacción cruzada entre el VEB y el CMV, lo que lleva, en ocasiones a considerar como infecciones por VEB las causas por el segundo. Para diferenciar estas situaciones, es útil medir anticuerpos a EBNA y tener en cuenta que los anticuerpos heterófilos no aparecen en la infección por CMV.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos hacer patente el agradecimiento a los Dres. Santiago Melón y Jordi Niubó por sus aportaciones en la obtención de algunos datos necesarios para la elaboración del presente texto. También por sus opiniones respecto a la orientación y contenidos de la monografía.

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA

1. Connolly MG Jr, Baughman RP, Dohn MN, Unnemann CC Jr. Recovery of viruses other than cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1994; 105: 1775-1781.
2. Gershon AA, Steinberg Sr, Schmidt NJ. Varicella-Zoster virus. En: Ballows A, Tenover FC, Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology* (5th ed). Washington DC, American Society for Microbiology, 1991; 838-846.
3. Sterner G, Forsgren M, Enocksson E, Grandien M, Granstrom G. Varicella-zoster infections in late pregnancy. En: Sterner G, (ed.). *Guidelines for management of pregnant women and with infections at delivery, and care of their newborns*. *Scand J Infect Dis* 1990; (sup 71): 30-35.
4. Shehab Z, Brunnell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for susceptibility to varicella. *J Infect Dis* 1983; 148: 472-476.
5. Schirm J, Meulenbergh JJM, Pastoor GW, Van Voorst Vader PC, Schreuder UP. Rapid detection of varicella-zoster virus in clinical specimens using monoclonal antibodies on shell vials and smears. *J Med Virol* 1989; 28:1-6.
6. Stagno S, Britt WJ, Pass RF. Cytomegalovirus. En: Schmidt NJ, Emmons RW, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. Washington DC, American Public Health Association, 1989; 321- 378.
7. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson CR. 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.
8. Grimths PD. Cytomegalovirus. En: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. *Principles and practice of clinical virology* (2a ed). Chichester, John Wiley and Sons, 1990; 69- 102.
9. The TH, Van der Ploeg M, Van den Berg AP, Vlieger AM, Van der Giessen M, Van Son WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes. A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54:193-198.
10. Klevjer-Anderson P. Diagnostic significance of CMV serology. *Clin Microbiol Newsletter* 1987; 9: 36-38.
11. Crawford PH. Epstein-Barr virus. En: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. *Principles and practice of clinical virology* (3a ed). West Sussex, John Wiley and Sons, 1995; 109-134.
12. Liebowitz P. Epstein-Barr virus. An old dog with new tricks. *N Eng J Med* 1995; 332: 55-57.
13. Okano M, Thiele GM, Davis JR, Grierson HL, Purtilo DT. Epstein-Barr virus and human diseases: recent advances in diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 300-312.
14. Straus SE, Cohen JI, Tosato C, Meier J. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 1993; 118:45-58.
15. Sumaya CV, Jenson RB. Epstein-Barr virus. En: Rose NR, Conway de Macarolo F, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. *Manual of clinical laboratory immunology* (4d ed). Washington, American Society for Microbiology, 1992: 568-575.
16. Pepin JM, Simon F, Dussault A, Collin C, Daza MC, Brun-Vezinet F. Rapid determination of human cytomegalovirus susceptibility to ganciclovir directly from clinical specimen primocultures. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2917-2920.
17. Safrin S, Elbeik T, Phan I, Robinson P, Rush J, Elbaggari A. Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1246-1250.

