

Utilidad de las técnicas de diagnóstico virológico en las infecciones respiratorias en pediatría

PILAR PÉREZ-BREÑA, FRANCISCO POZO E INMACULADA CASAS

Servicio de Virología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.
pperez@isciii.es; pacopozo@isciii.es; icasas@isciii.es

La infección respiratoria aguda (IRA) es causa de elevada morbilidad en niños y adultos. La gravedad de estas infecciones y la mortalidad asociada es mucho más elevada en los países pobres, pero incluso en los más desarrollados los costes en salud y absentismo laboral son enormes. Aunque, en general, evolucionan de forma benigna pueden producir fallecimientos en una serie de pacientes con problemas inmunológicos o con enfermedad de base. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹, alrededor del 20% de muertes en niños menores de 5 años se deben a IRA del tracto respiratorio inferior, como neumonía, bronquiolitis y bronquitis. Los agentes causales pueden ser bacterias o virus; es imposible diferenciar los 2 grupos de patógenos basándose sólo en

los signos clínicos o en la radiología. Sin embargo, hasta el momento, el diagnóstico habitualmente es clínico y se ve facilitado porque muchas de estas infecciones cursan en brotes en determinados meses del año. Según se observa en la figura 1, la relación de los virus con los cuadros respiratorios que producen no es biunívoca, sino que cada virus puede producir varios cuadros clínicos. Por otra parte, estos pueden ser parcialmente superponibles, y compartir signos y síntomas entre ellos. Todas estas razones hacen que el diagnóstico virológico se considere necesario, especialmente cuando hay que decidir el inicio de un tratamiento antiviral o la toma de medidas de aislamiento o protección, en algunos tipos de pacientes, en especial si están institucionalizados.

Puntos clave

- El diagnóstico virológico temprano es indispensable para decidir sobre el aislamiento de los casos confirmados, evitando brotes nosocomiales, o para la instauración de un tratamiento adecuado, evitando el uso de terapia antibiótica innecesaria.
- El diagnóstico virológico es indispensable para filiar los brotes institucionales y poder tomar medidas para su control. La toma de muestras debe efectuarse al comienzo de los síntomas, y su conservación y envío al laboratorio han de realizarse a 4 °C.
- El uso de los kits de diagnóstico rápido de virus respiratorios debe correr a cargo de personal suficientemente entrenado para su realización y su interpretación.
- El estudio serológico permite confirmar infecciones en las que no se ha podido demostrar el agente etiológico en la fase aguda.
- Ante la llegada de un nuevo virus respiratorio o la emergencia de un virus que pudiera infectar de forma masiva a la población, el diagnóstico virológico es esencial para el control de la alerta sanitaria, además de permitir caracterizar el nuevo agente y poder conocer aspectos de su biología.

Diagnóstico de laboratorio

La heterogeneidad de los agentes etiológicos de la IRA viral (fig. 1) hace que su diagnóstico sea complicado y condiciona la búsqueda de técnicas que permitan abarcar la detección de un número importante de virus. Los datos epidemiológicos y clínicos ayudan a estrechar el rango de los virus que deben buscarse. Los métodos se clasifican en “directos”, cuando permiten la detección del virus, sus antígenos o sus genes, o “indirectos”, basados en la determinación de anticuerpos específicos. Las muestras más adecuadas para el diagnóstico son las secreciones respiratorias, en especial el aspirado nasofaríngeo, tomadas durante los primeros 4 días de la enfermedad, aunque en los niños la excreción de virus es más larga que en los adultos. Debe tomarse con “medio de transporte de virus” y mantenerse a 4 °C hasta su análisis.

Aislamiento del virus en cultivo

Se trata de una técnica compleja que requiere aparatos caros y personal muy especializado. La adecuada selección de varias líneas celulares, utilizadas individualmente o en mezclas, permite abarcar el cultivo de un amplio espectro de virus². La inoculación ha de llevarse a cabo inmediatamente después de tomar la muestra, para que los virus no pierdan su capacidad infectiva. Los cultivos inoculados se incuban a 33-35 °C, y el

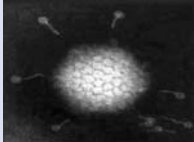


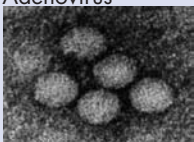
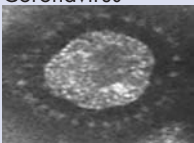
Síndrome	Más frecuente	Menos frecuente	Virus
Enfermedad respiratoria de vías altas	Rinovirus Coronavirus Adenovirus Parainfluenza 3	Gripe A o B Parainfluenza 1-2 VRS Enterovirus	Adenovirus 
Faringitis	Adenovirus Enterovirus	Gripe A o B VRS Parainfluenza 1-2 Rino y Coronavirus	Influenza A/B 
Crup (laringotraqueo-bronquitis)	Parainfluenza 1-2 Parainfluenza 3 Metapneumovirus	Gripe A VRS Coronavirus	Parainfluenza VRS, Metapneum 
Bronquiolitis	VRS Parainfluenza 3	Adenovirus Parainfluenza 1-2 Gripe A o B Rinovirus	Adenovirus 
Neumonía	VRS Parainfluenza 3 Adenovirus Gripe A	Parainfluenza 1-2 Rinovirus	Coronavirus 

Figura 1. Relación entre los cuadros clínicos comprendidos en el síndrome de la infección respiratoria aguda (IRA) y los virus respiratorios que se consideran agentes causales de cada uno de ellos. En el panel de la derecha se muestran las micrografías electrónicas de cada uno de los grupos más importantes de estos virus. VRS: virus respiratorio sincitial.

crecimiento del virus se identifica por observación de su efecto citopático (CPE), consistente en la aparición de células alteradas en la monocapa celular (fig. 2). A veces, es difícil diferenciar el CPE, por lo que siempre deben utilizarse pruebas de identificación específica, como la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos (AcM) monoclonales o la amplificación de ácidos nucleicos (reacción en cadena de la polimerasa [PCR]). Para acortar el tiempo de identificación del virus se utilizan técnicas de cultivo rápido como el *shell vial*, que lo detectan entre 1 y 3 días postinoculación, incluso antes de que aparezca su CPE. La principal ventaja de esta técnica es que es la única que permite disponer del virus para efectuar análisis posteriores. Éstos son esenciales para su conocimiento en profundidad, tanto antigénica como genéticamente y, en el caso de los virus de la gripe, para poder realizar el diseño de las vacunas para la temporada siguiente.

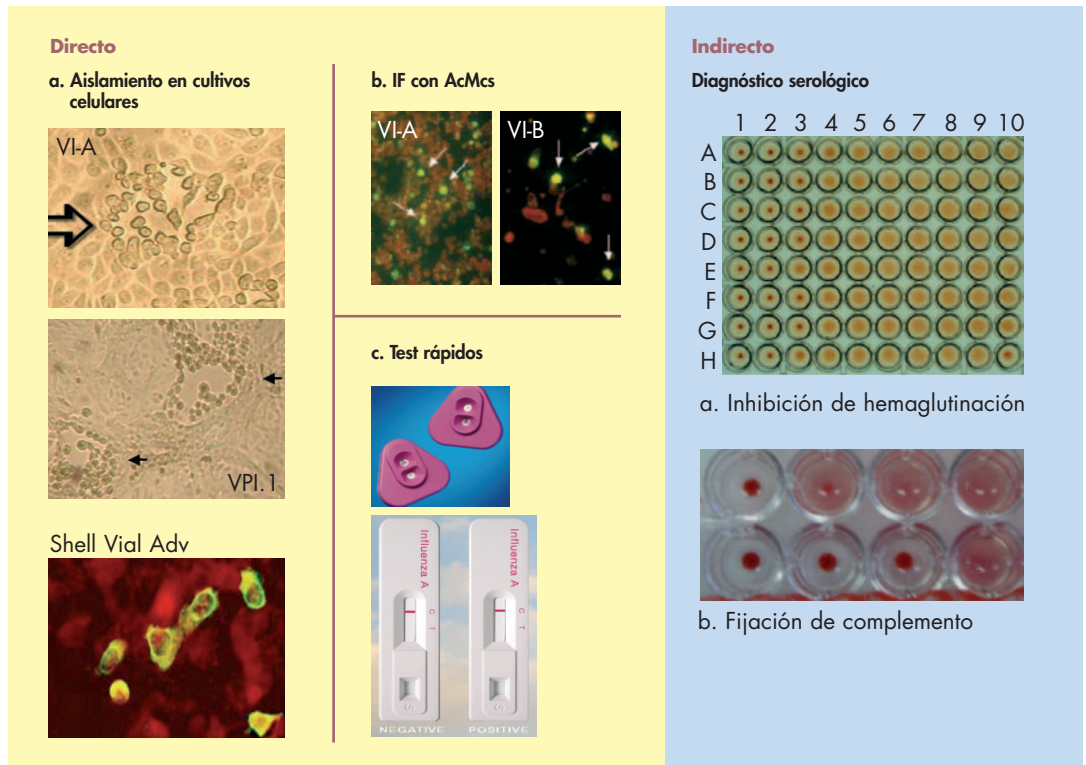
Detección de los antígenos virales

Se lleva a cabo mediante técnicas inmunológicas que incluyen la IF o el enzimoimmunoanálisis (EIA) realizado directamente en las secreciones respiratorias (fig. 2), mediante el uso de

AcM³. Ambas presentan la ventaja de ser técnicas sencillas, rápidas e independientes de la infectividad (por ello, la conservación de la muestra clínica resulta menos crítica que en el aislamiento del virus), aunque en general suelen ser menos eficaces que el cultivo celular o la PCR. También se utilizan para identificar los virus aislados en cultivo, como se ha descrito antes.

En los últimos años, se han comercializado para la detección de antígenos unas pruebas muy rápidas que pueden dar resultados en unos 30 min. Son pruebas fáciles de realizar, llamadas también ensayos “a la cabecera del paciente” o “a pie de cama”, que pueden ser muy útiles⁴, especialmente en los hospitales y en la vigilancia de brotes. No requieren personal muy especializado, aunque es preciso su entrenamiento para la realización e interpretación del test, y para la toma y preparación de las muestras. Se han comercializado numerosos kits, la mayoría dirigidos al diagnóstico de la gripe y del virus respiratorio sincitial, por lo que estos ensayos son los mejor estudiados^{5,6}. Las pruebas rápidas comerciales presentan menor sensibilidad que el aislamiento o las técnicas moleculares (media del 70-80% en la gripe), aunque su especificidad es alta (media del 90-95% en la gripe). En cuanto a valores predictivos, la OMS recomienda que en periodos de baja actividad gripal los casos positivos deben confirmarse por otra técnica. En periodos de alta

Figura 2. Diagnóstico virológico directo basado en: a) el aislamiento del virus en cultivos celulares (obsérvese el efecto citopático [CPE]); b) la detección de antígeno por IF con anticuerpos monoclonales, y c) la detección rápida de antígeno mediante kits "a pie de cama". Como diagnóstico indirecto se muestra una placa serológica con un ensayo de inhibición de la hemaglutinación y un detalle de la sedimentación de los glóbulos rojos en una reacción de fijación del complemento.



actividad recomienda su uso sólo cuando puede influir en el tratamiento del paciente, ya que el diagnóstico clínico durante los brotes alcanza una alta fiabilidad.

Técnicas de biología molecular para detectar el genoma del virus

De entre todas las disponibles, la amplificación de un fragmento del genoma vírico por PCR es la técnica más utilizada en el diagnóstico virológico⁷. Excepto los adenovirus, todos los virus respiratorios poseen genoma de tipo ARN (fig. 1); por tanto, la amplificación debe ir precedida de transcripción inversa para obtener el ADNc (RT-PCR). Estos ensayos son de aplicación relativamente reciente, por lo general realizados con tecnología propia de los laboratorios, aunque cada vez se cuenta con mayor número de kits comerciales. En la comparación con otras técnicas se comprueba una sensibilidad notablemente mayor que la del cultivo y otros ensayos. En general, se considera un método de diagnóstico rápido ya que puede realizarse en unas pocas horas, aunque, en la práctica, en muchos casos se necesita 2 días para llegar a resultados fiables. Existen múltiples variedades de esta técnica, de manera que pueden diferenciarse técnicas de PCR simples o anidadas, sencillas o múltiples, seguidas o no de hibridación, y lo más reciente, PCR a tiempo real. La incorporación de ensayos a tiempo real⁸ ha reducido considerablemente el tiempo necesario para obtener un resultado, sin olvidar que otra de sus principales ventajas es la reducción del número de falsos positivos. Las técnicas de PCR permiten, además del diagnóstico etiológico, llevar a cabo el análisis de la secuencia del fragmento genómico amplificado, a fin de genotipar el virus

detectado u obtener información en cuanto a la epidemiología molecular (fig. 3) de la enfermedad producida.

El análisis por PCR no requiere el uso de laboratorios BSL-3, necesarios para trabajar con gripe aviaria o coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAS), ya que los métodos de extracción de ácidos nucleicos, previos a la reacción de amplificación, suelen destruir la infectividad del virus.

Ensayos serológicos

El diagnóstico serológico tiene como objetivo la detección de anticuerpos específicos frente a un determinado virus para conocer si el paciente ha sufrido una determinada infección viral. Se trata de métodos de diagnóstico indirecto. En general, se investigan 2 muestras de suero tomadas en la fase aguda y fase convaleciente y se mide la existencia de seroconversión o aumento de título de anticuerpos IgG de, al menos, 3-4 veces entre las muestras de suero. Otra medida de infección aguda o reciente es la confirmación de IgM específica.

A diferencia de otro tipo de infecciones virales, los virus respiratorios se localizan e infectan el aparato respiratorio, lugar de entrada en el hospedador, y no existe siempre viremia evaluable. En general, las IRA no suelen diagnosticarse mediante serología, y la presencia de anticuerpos IgG específicos frente a un determinado virus en suero no implica que la infección sea grave. Así, se ha demostrado, por ejemplo, que la presencia de IgG frente al virus respiratorio sincitial en suero no se asocia con mayor probabilidad de complicaciones como asma⁹.

Los métodos, en cambio, han sido muy útiles en estudios de serovigilancia, para conocer la seroprevalencia de una determinada infección respiratoria en la población. En el momento actual se utilizan para saber el grado de exposición o de in-

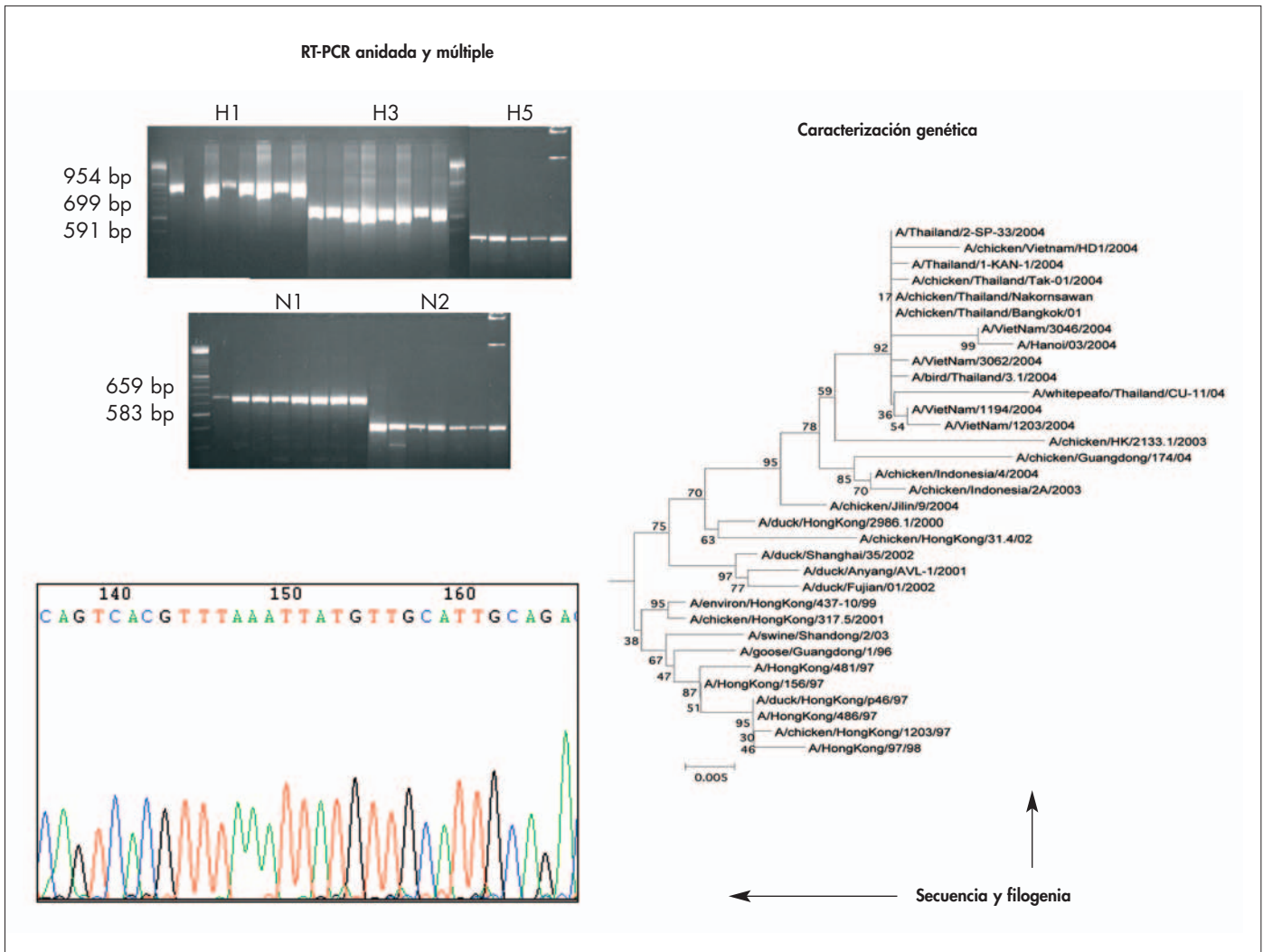


Figura 3. Amplificación genómica por RT-PCR anidada que permite detectar y diferenciar distintas hemaglutininas (H1, H3 y H5) y neuraminidasas (N1 y N2) de virus gripales del género Influenza A. Hoja de lectura de la secuencia de un fragmento amplificado y árbol filogenético obtenido al realizar el análisis de ésta, en comparación con otras secuencias de virus gripales de referencia.

fección leve por el virus de la gripe aviaria A H5N1 de personas que han tenido contacto directo con aves (cuidadores, veterinarios, etc.) o bien de personal sanitario en contacto directo con pacientes¹⁰. Otro ejemplo fue la aparición del coronavirus asociado al SRAS en 2003¹¹, donde la serología demostró su utilidad para determinar la diseminación del virus tanto en el hombre como en los posibles hospedadores animales.

Los métodos serológicos más utilizados en el estudio de las IRA son el enzimoimmunoensayo (ELISA), la fijación de complemento, la IF y para el caso de los virus gripales la inhibición de la hemaglutinación. Entre los principales inconvenientes destacan las reacciones cruzadas entre virus de grupos filogenéticamente relacionados, la indeterminación de casos en los que exista una reinfección por el mismo virus y el tiempo en emisión de los resultados.

Conclusiones

El valor predictivo positivo del diagnóstico clínico de las IRA virales aumenta en los períodos epidémicos, pero nunca podrá

compararse con el diagnóstico virológico, que es el único capaz de determinar la etiología. También permite confirmar todos los brotes institucionales, práctica necesaria sobre todo si son hospitalarios y afectan a niños, inmunodeprimidos o ancianos. En estos casos es además esencial la rapidez del diagnóstico, aunque teniendo en cuenta que cuando se utilicen tests rápidos comerciales deben tratar de confirmarse los resultados positivos por otro ensayo diferente. Una vez en el curso del brote la confirmación no es práctica, excepto en casos particulares, por lo que deben preferirse otros métodos de detección del virus. La serología no es útil para el diagnóstico de la infección en la fase aguda, sino para la comprobación de la infección pasada.

En la tabla 1 se muestra una comparación de las distintas características de los métodos comentados. Aunque el aislamiento de los virus respiratorios no alcanza una alta sensibilidad, se considera la técnica de referencia y las demás se comparan con ella. En la actualidad los ensayos más utilizados son la amplificación genómica y el cultivo del virus, debido a su versatilidad, ya que permiten detectar virus muy diferentes. Además pueden constituir el primer escalón en el proceso de la posterior caracterización del virus, ya que para

Tabla 1. Comparación de los distintos métodos utilizados en el diagnóstico virológico de las infecciones respiratorias virales. La sensibilidad y la especificidad de cada técnica varía dependiendo del virus de que se trata, por lo que no se expresan en porcentajes. Los requerimientos de calidad de la muestra varían entre "muy altos" (necesarios para preservar la infectividad), "altos" (la morfología) y "medios" (en el caso de identificar antígenos o genes)

	Tiempo	Coste	Sensibilidad	Especificidad	Calidad de las muestras	Aplicabilidad
Aislamiento	7-21 días	Elevado	Media-alta	100%	Muy altos	Vigilancia. Confirmación del diagnóstico
Shell-vial	1-3 días	Medio	Media	100%	Muy altos	Vigilancia. Confirmación del diagnóstico
IF	Horas	Bajo	Media-Alta	Alta	Altos	Confirmación del diagnóstico
EIA	Horas-1 día	Medio	Media-Alta	Alta	Medios	Confirmación del diagnóstico
Tests rápidos	30-60 min	Alto	Media	Alta	*	Diagnóstico. Cribado
PCR	1 día	Medio	Alta	Alta	Medios	Diagnóstico. Vigilancia
Serología	> 15 días	Medio				Serovigilancia. Confirmación del diagnóstico

*Requieren el uso de soluciones tampón-específicas.

IF: inmunofluorescencia; EIA: enzaimunoenálisis; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

afrontar el análisis antigénico es imprescindible disponer del propio virus y para la caracterización genética hay que partir de la amplificación de algunos genes.

El momento de la toma, la calidad de la muestra y la conservación hasta su análisis son cruciales para alcanzar un buen resultado.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. OMS. Acute Respiratory Infections in Children; 2004. Disponible en: http://www.who.int/fch/depts/cah/resp_infections/en/
2. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol.* 2004;42:79-82.
3. ●● Östlund MR, Wirgart BZ, Linde A, Grillner L. Respiratory virus infections in Stockholm during seven seasons: a retrospective study of laboratory diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 2004;36:460-5.
4. Wunderli W, Thomas Y, Müller DA, Dick M, Kaiser L. Rapid antigen testing for the surveillance of influenza epidemics. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:295-300.
5. Aldous WK, Gerber K, Taggart EW, Rupp J, Wintch J, Daly JA. A comparison of thermo electron (TM) RSV OIA (R) to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus. *J Clin Virol.* 2005;32:224-8.
6. ●● OMS. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Geneva: World Health Organization; 2005. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_testing/en/index.html
7. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen Respiratory Viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol.* 2004;72:484-95.
8. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MFC, Kroes ACM, Claas ECJ. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1564-9.
9. ●● Kotaniemi-Syrjänen A, Laatikainen A, Waris M, Reijonen TM, Vainionpää R, Korppi M. Respiratory syncytial virus infection in children hospitalized for wheezing: virus-specific studies from infancy to preschool years. *Acta Paediatr.* 2005;94:159-65.
10. ●● Liem NT, Lim W; World Health Organization International Avian Influenza Investigation Team, Vietnam. Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:210-5.
11. Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, et al. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J Virol Methods.* 2005;125:181-6.

Bibliografía recomendada

OMS, 2005. Acute Respiratory Infections. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/

Describe ampliamente los distintos aspectos de la infección respiratoria aguda, dividiéndola en: gripe, parainfluenza, virus RS, SARS, sarampión, *Streptococcus pneumoniae* y tuberculosis. A su vez, estos apartados comprenden otros como: descripción de la enfermedad, virología, vacunas, bibliografía. En el caso de la gripe, recoge incluso una reunión celebrada en diciembre de 2005 sobre el desarrollo y la evaluación de las vacunas pandémicas. Algunos de los apartados están en formato PDF, y otros, en versión apta para imprimir.

Östlund MR, Wirgart BZ, Linde A, Grillner L. Respiratory virus infections in Stockholm during seven seasons: a retrospective study of laboratory diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 2004;36:460-5.

Análisis (según la edad, la estación y las técnicas utilizadas) de los hallazgos virológicos en 7.303 muestras tomadas entre 1993 y 2000.

Zambón M. Laboratory diagnosis of influenza. En: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of influenza.* Oxford: Blackwell Science; 1998. p. 291-313.

Capítulo del libro en el que se aborda el diagnóstico de la gripe. Sin embargo, el análisis crítico de la metodología utilizada es aplicable a otras viriasis respiratorias y la discusión de los criterios es muy lúcida.

Kotaniemi-Syrjänen A, Laatikainen A, Waris M, Reijonen TM, Vainionpää R, Korppi M. Respiratory syncytial virus infection in children hospitalized for wheezing: virus-specific studies from infancy to preschool years. *Acta Paediatr.* 2005;94:159-65.

Ya que el wheezing en la infancia está asociado a un mayor riesgo de asma posteriormente, se ha tratado de probar si la IgG al virus respiratorio sincitial (VRS) podía considerarse predictiva de asma, y se ha comprobado que no es así.