

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE VALENCIA

**CONTRIBUCIÓN
AL DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO DE LAS
INFECCIONES POR VIRUS**

DISCURSO DE RECEPCIÓN

DEL ACADÉMICO ELECTO

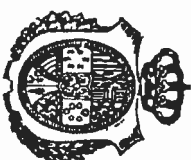
Ilmo. Sr. Dr. D. V. SANCHIS-BAYARRI VALLANT

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

DEL ACADÉMICO NUMERARIO

Ilmo. Sr. Dr. D. V. SANCHIS-BAYARRI LAHOZ

Leídos el día 18 de octubre de 1988



VALENCIA

CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO
DE LAS INFECCIONES POR VIRUS

EXCMO. SR. PRESIDENTE;
EXCMOS. E ILMOS. SEÑORES;
ILMOS. SRES. ACADÉMICOS;
SEÑORAS Y SEÑORES:

Es para mí una gran satisfacción venir a la Real Academia de Medicina a leer el discurso de ingreso y ser admitido en esta centenaria Institución de personas eruditas unidas por un elevado interés por la ciencia y por el fomento del saber humano. Constituye para mí algo que durante muchos años me pareció inasequible y hoy veo cumplido mi deseo.

Deseo expresar mi agradecimiento al Excmo. Sr. Presidente Profesor García Conde y a los señores académicos por la benevolencia con que acogieron mi persona para ocupar en esta Corporación uno de los lugares destinados a la Higiene.

Quiero a continuación rendir tributo de gratitud a los Ilustres Miembros de esta Academia Dres. Rincón de Arellano, Cano Ivorra, y Gisbert Calabuig, que avalaron la propuesta de mi persona, así como al Secretario de la misma Dr. Benlloch Navarro que ha tenido la gentileza de releer algunos de mis escritos y de aconsejarme siempre que se lo he pedido, e igualmente a todos los presentes que han tenido la amabilidad de honrarme con su asistencia a este acto.

X Vengo a ocupar el lugar de un ilustre antecesor y distinguido profesional el Dr. Domingo Espinós Gisbert, que me prece-

Impreso en España
Printed in Spain

ISBN: 84-404-2998-3

Depósito Legal: V. 2.048 · 1988

ARTES GRÁFICAS SOLER, S.A. · LA OLIVERETA, 28 · 46018 VALENCIA · 1988

dió en este sitial. Su vasta cultura médica le granjeó la estima y consideración de todos. Su vida profesional estuvo dedicada principalmente al cargo oficial que desempeñó en el cuerpo médico de Sanidad Nacional en el que ocupó relevantes funciones, primero en Alcoy, su ciudad natal, y después en la Jefatura de Sanidad Nacional, en Valencia. Sus conocimientos se extendieron allí a trabajos de laboratorio, su principal actividad, coordinados con los de Medicina Clínica. Buena prueba de ello fue su discurso de ingreso en esta Academia, pues versó sobre las particularidades del Bocio endémico en zonas de las serranías de la región valenciana. Fue también un maestro de la docencia, pues desempeñó el cargo de Jefe de Prácticas de la Cátedra de Anatomía Patológica. Destacó por su talante siempre conciliador capaz de dirigir a un buen término cualquier situación por difícil que pareciera en el desempeño de sus cargos.

Recuerdo a Domingo Espinós como un hombre afable y científico. Tuve varias ocasiones de relacionarme con él. En una ocasión, cuando era Jefe de Sanidad, sostuvimos una conversación sobre el problema de las Salmonelosis en Valencia. Ello influyó en mí hasta el punto que cuando me hice cargo del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Clínico de Valencia, lo primero que puse en funcionamiento fue la técnica del coprocultivo. Ello permitió conocer las características de las salmonellas de nuestro medio.

Cuando llegó la epidemia de cólera del año 1972, estábamos preparados para aislar vibrones en coprocultivo; Domingo Espinós solía decir: "necesitamos sanitarios que sepan aislar salmonellas".

También recuerdo sus inquietudes por el diagnóstico precoz del cáncer uterino con la técnica del Papanicolau. Fue de los primeros en familiarizarse con esta técnica.

Domingo Espinós acudía regularmente a las reuniones mensuales de los médicos analistas y siempre traía su comunicación, que era de gran interés. Pensaba, con acierto, que las comunica-

ciones libres y escritas era lo que daba vida y rigor a las reuniones.

Intervenía en las discusiones con un tono amable y pausado que hacían que el comunicante se sintiera animado a proseguir sus investigaciones y a profundizar en el tema.

Fue en suma un excelente médico, gran sanitario, y hombre bueno. X

Aunque a lo largo de mi vida he procurado actuar con el cerebro, con reflexión, orden y estabilidad emocional, sin embargo hoy por lo menos en estas primeras palabras he preferido dejarme llevar por el corazón.

No ha sido fácil el mantener cada día una labor constante y tenaz en situaciones circunstancialmente adversas, y sin que se produjera el desánimo.

Ello ha sido posible gracias a dos personas.

En primer lugar a mi esposa María Rosario, que me ha ayudado perseverantemente, con alegría, con mucha comunicación y con eficiencia.

En segundo lugar a mi padre y maestro, el Profesor Sanchis-Bayarri Lahoz, que ha sabido inculcarme fe en la ciencia, rigor metodológico y respeto a la verdad. Con él he ido trabajando y continué trabajando en el Laboratorio desde hace más de cuarenta años. Se ha producido el fenómeno pedagógico clásico, la actividad de maestro produce actividad de discípulo y viceversa. Este fenómeno esencial es el que ocasiona la transmisión de conocimientos y el avance de la ciencia.

Es, al mismo tiempo, enseñanza y aprendizaje, actitud pasiva y activa, las dos cosas juntas.

Mi padre supo guiarme en los momentos de mi juventud, en que se tiene mucha energía pero poca experiencia, hacia el estudio de los virus, primero en la Universidad de Rochester de Estados Unidos, donde permanecí un año como postdoctoral Fellow investigando con el Profesor Morgan el virus de las

paperas. Era un trabajo muy formativo pues permitía familiarizarme con las tres técnicas fundamentales de la Virología: Experimentación animal, inoculación de embriones de pollo y cultivos celulares.

Posteriormente tuve ocasión de trabajar con cultivos celulares en el Instituto Pasteur de París con el Profesor Lepine y en el Laboratorio Central de Salud Pública de Londres con el Profesor Parker.

Al incorporarme al laboratorio de la cátedra de Microbiología e Higiene de la Facultad de Medicina de Valencia, me fue muy útil la experiencia del Profesor Sanchis-Bayarri Lahoz para ir adaptando al laboratorio de la Cátedra, las técnicas que había aprendido en aquellos grandes Centros de Investigación.

Singularmente recuerdo su decisiva contribución al introducir el empleo de sueros de caballo tindalizado en lugar de suero de feto de buey ultrafiltrado (1) que era en aquel momento difícil de obtener. Sin esa contribución los trabajos de virus que iniciamos, habrían quedado paralizados y estériles. Posteriormente el Profesor Lepine utilizó en muchas ocasiones el suero de caballo tindalizado y varios Laboratorios españoles de aquella época también lo hicieron.

Con esta formación cuando me planteé el tema del discurso de ingreso, no vacilé un momento, y me sentí inclinado inmediatamente hacia un tema de Virología que he titulado "Contribución al diagnóstico de Laboratorio de las infecciones víricas".

I. INTRODUCCIÓN

El término Virus (que significa veneno) se usó durante mucho tiempo como sinónimo de agente infeccioso, y en la actualidad se reserva únicamente para los verdaderos virus. Éstos se definieron originariamente como agentes infecciosos lo suficientemente pequeños para pasar los filtros que retenían las

bacterias. Los criterios de Koch no pudieron satisfacerse, tal en la forma como habían sido enunciados en un principio, porque estos agentes patógenos no podían ser cultivados en medios artificiales.

El primer virus identificado fue el del mosaico del tabaco, que afecta a ciertas plantas, descubierto independientemente por Iwanowski en Rusia en 1892 y por Beijerinck en Holanda en 1899. Los primeros virus filtrables que afectaban a los animales y que pudieron identificarse son los que causan la glosopeda en el ganado y los que producen la fiebre amarilla en el hombre. El primero fue descubierto por Löffler y Frosch en 1898, y el segundo, por la U.S. Army Commission, bajo la Dirección de Walter Reed, en 1900. Una tercera clase de virus (bacteriófagos) que infectan las bacterias, fue descubierta por Twort en Inglaterra en 1916 y por D'Herelle en Francia en 1917.

Actualmente los virus se definen como un grupo de agentes infecciosos de estructura subcelular, que se comportan como parásitos intracelulares estrictos. Se caracterizan por su pequeño tamaño, estructura elemental y mecanismo de replicación.

El tamaño de los virus es muy pequeño, por ello no son visibles al microscopio ordinario.

La estructura de los virus más simples está constituida básicamente por un solo ácido nucleico, rodeado de una cubierta proteica, y puede presentar además una envoltura. No poseen ribosomas ni otras formaciones intracelulares y sólo los virus mayores contienen algunos fermentos. En consecuencia, los virus aislados carecen de metabolismo, porque no poseen la maquinaria biosintética necesaria para la producción de energía y de macromoléculas, son, por tanto, incapaces de crecer y dividirse en medios inanimados, y se comportan como partículas inertes.

Sólo se desarrollan y multiplican en el interior de células vivas, de las que dependen totalmente para la obtención de energía y la síntesis proteica, y pueden considerarse parásitos

intracelulares estrictos. Se reproducen por un mecanismo particu- lar (la replicación), en virtud del cual el ácido nucleico del virus orienta el metabolismo de la célula hacia la síntesis de sus propios componentes, que en una primera fase se forman por separado en zonas críticas de la célula y posteriormente se integran para formar la partícula completa del virus. El ácido nucleico da la información necesaria para programar en la célula la síntesis de sus componentes; el capsido y la envoltura lo protegen en el medio ambiente y facilitan su transmisión de una célula a otra.

Por otra parte, los virus no son sensibles a los antibióticos que actúan en etapas específicas del metabolismo de las bacterias, y el interferón inhibe su mecanismo de replicación intracelular.

Los virus se diferencian netamente de las bacterias, micoplasmas, rickettsias y clamidias y no pueden considerarse células. Es muy difícil conocer exactamente su situación en la naturaleza, pero constituyen un grupo bien definido de agentes infecciosos de estructura subcelular, que forman un grupo aparte, y no existen formas intermedias con otros microorganismos.

Frecuentemente cuando un médico no consigue llegar a un diagnóstico específico en un enfermo con un proceso febril, muchas veces hace el siguiente comentario: "Este paciente probablemente tiene un virus".

De todas las enfermedades que padece la especie humana, las más frecuentes son las causadas por virus. Cada invierno tiene muchas posibilidades de infectarse con los virus respiratorios que producen gripe, faringitis, bronquitis, neumonía o pleuresía. En los meses siguientes tiene riesgo de sufrir gastroenteritis epidémicas, hepatitis y meningitis víricas. De su niñez recuerda el sarampión, paperas, varicela y rubeola. Las enfermedades víricas constituyen una parte importante de trabajo de cualquier médico en la práctica general.

Los caracteres y técnicas adecuadas para el estudio de los ultravirus (o, simplemente, los virus) constituyen un apartado especial dentro de los agentes patógenos microbianos. No obstante, nos parece necesario destacar ante todo un hecho fundamental que debe guiar nuestras ideas en el estudio de los virus: su parasitismo obligado.

En el cuadro 1 se enumeran los síndromes comunes junto con los virus responsables. La mayor parte de los médicos que cuidan los pacientes afectados por este tipo de enfermedades, así como la mayoría de los patólogos responsables del funcionamiento de laboratorios clínicos tienen información actual sobre las técnicas disponibles para un diagnóstico definitivo pero solamente un grupo reducido de laboratorios clínicos efectúan diagnósticos virológicos. Se han dado muchas explicaciones de este estado de cosas, tales como: son demasiado caros; los resultados requieren tanto tiempo que son de poco valor clínico y el diagnóstico no representa ninguna ventaja, si no existe una terapéutica adecuada. Estas afirmaciones no son ciertas, ya que se han desarrollado fármacos de valor en enfermedades víricas específicas, como yodoxuridina para la encefalitis simple de herpes, amantadina para el control de la gripe, ribavirina para el virus respiratorio sincitial, retrovir para el SIDA y gancidovir para citomegalovirus; ciertamente es de esperar que muchas más serán asequibles en el futuro. Se han desarrollado métodos rápidos de diagnóstico que determinan anticuerpos IgM-específicos o detectan antígenos víricos por microscopía de fluorescencia. Dichas pruebas permiten obtener un diagnóstico etiológico en unas pocas horas y, junto con otros métodos diagnósticos, no son excesivamente onerosos y sería interesante su aplicación en los laboratorios clínicos.

Deben mencionarse los ensayos que miden anticuerpos IgM-específicos. Estas pruebas han sido desarrolladas para la rubeola y el citomegalovirus y a veces constituyen la única forma de obtener un diagnóstico rápido (2).

El laboratorio de diagnóstico interesado en serología vírica debe seleccionar los métodos que proporcionan información útil a partir de una única muestra de suero. Es preferible un resultado presuntivo rápido a uno definitivo obtenido con retraso.

Pretendo en el presente discurso exponer nuestra experiencia y resultados como consecuencia de la utilización en el Laboratorio de Virología del Hospital General de Valencia de las técnicas rápidas recientes de Inmunofluorescencia e Inmunanálisis.

II. TÉCNICAS RÁPIDAS

El diagnóstico de laboratorio rápido y preciso de las enfermedades infecciosas es indispensable tanto para prestar atención inmediata al paciente como para introducir las medidas de salud pública que sean necesarias. Las técnicas clásicas de laboratorio que habitualmente se emplean en virología con fines de diagnóstico, si bien específicas y sensibles, suelen ser tediosas, difíciles o, en algunos laboratorios, de ejecución imposible. En años recientes se han ideado nuevos métodos, sencillos y rápidos, para el diagnóstico de infecciones víricas. Se define el diagnóstico rápido de esas infecciones como un método que puede proporcionar resultados aceptables en menos tiempo que los métodos clásicos y permite así intervenir con acierto al tratar a los enfermos y sus contactos o combatir la enfermedad en las comunidades.

El diagnóstico rápido de las virosis ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales de aislamiento del virus y de serología vírica. Su rapidez y sencillez facilitan la práctica de encuestas sobre enfermedades infecciosas en una zona, y la información obtenida puede conducir al desarrollo de actividades individuales o de salud pública. El diagnóstico precoz de las infecciones víricas contribuye a prevenir infecciones cruzadas en

los hospitales y su difusión a contactos, especialmente en casos que presenten síntomas atípicos. La planificación y vigilancia de programas preventivos requieren datos seroepidemiológicos, que deben obtenerse rápidamente y a bajo costo cuando hay grandes cantidades de muestras que tratar, como es el caso del SIDA. Otra ventaja de las técnicas rápidas de diagnóstico es que los antígenos víricos pueden detectarse en un laboratorio central utilizando muestras recogidas en localidades alejadas de un laboratorio de virus. Estos métodos no dependen de la multiplicación de los virus y ni siquiera requieren la presencia de virus vivos.

La falta de reactivos para inspección de la calidad, equipo indispensable y personal preparado ha obstaculizado la aplicación satisfactoria y la amplia difusión de estos nuevos métodos.

Aunque se reconoce que las técnicas rápidas no pueden sustituir totalmente a las clásicas, en cambio contribuyen al conocimiento de las infecciones víricas como causa de morbilidad y mortalidad, y sirven para mejorar la atención primaria de salud y la lucha contra enfermedades víricas de importancia para la salud pública.

Las aplicaciones y limitaciones de dos de las técnicas más recientemente perfeccionadas y adaptadas al diagnóstico rápido de virosis mediante la detección del antígeno y los primeros anticuerpos son objeto de examen en los apartados siguientes.

1. *Técnica de anticuerpos fluorescentes (TAF)*

Este método revela la presencia de antígenos víricos en el interior de las células adhiriéndoles un anticuerpo fluorescente marcado. Esto puede hacerse por el método directo, en el cual el propio anticuerpo antivírico lleva el marcador fluorescente, o por el método indirecto, en el que se requieren dos tiempos (3). Primero, se deja que el anticuerpo vírico específico se fije en el antígeno de la muestra; luego se deja que un segundo anticuerpo contra la globulina de especie y con el marcador fluorescente

te se fije en el anticuerpo primario, formando un complejo con el antígeno.

La ventaja principal de la TAF es que permite detectar antígenos víricos mientras están todavía en la célula. Tras fijación, las muestras son estables y pueden enviarse sin limitaciones de tiempo. Son indispensables los antisueros altamente específicos y buenos conjugados. Se necesita un microscopio de fluorescencia, que es costoso. Es necesario tener amplia experiencia.

La TAF es también adecuada para detectar IgM específica. El antígeno específico se fija en un portaobjetos, luego se aplica el suero de prueba y se detecta la IgM aplicando una globulina IgM antihumana marcada con fluorescencia. Es necesario suministrar de las muestras que se analizan el exceso de IgG específica y el factor reumatoide.

En el cuadro 2 se exponen algunos virus humanos que han sido detectados en muestras clínicas mediante el uso y la práctica de sistemas de inmunofluorescencia (4).

Un aspecto nuevo ha sido la utilización de anticuerpos monoclonales, como antisueros altamente específicos.

Tras la puesta a punto de las técnicas de Hibridomas murinos por Köhler y Molstein en 1985 (5), el campo de la utilización de los anticuerpos monoclonales se ha extendido considerablemente. Estos anticuerpos representan una sonda inmunológica extremadamente específica, de perfecta reproductibilidad de respuesta de un lote a otro y ampliamente disponible. También en Virología, como en otras disciplinas, las aplicaciones de anticuerpos monoclonales no han cesado de multiplicarse tanto en la Investigación como en Análisis Clínicos, donde han permitido la extensión del diagnóstico virológico a los laboratorios no especializados.

Los linfocitos de ratones inmunizados producen anticuerpos específicos, pero no tienen más que una duración de vida limitada cuando son colocados en cultivo "in vitro".

Por el contrario, las células mielomatosas se multiplican indefinidamente cuando son cultivadas "in vitro", pero no segregan el anticuerpo escogido. La fusión de estas dos células mediante el poliethylenglicol permite obtener una célula híbrida que por complementación genética es capaz de segregar un anticuerpo perfectamente monoclonal específico de uno de los eptiopes de virus utilizado para la inmunización y capaz de multiplicarse indefinidamente "in vitro".

Las células mielomatosas tienen un déficit enzimático de Hipoxantina guanina fosforilosis transferasa (HGPRT) o timidinaquinasa (TK) que permitirá destruir fácilmente las células que no provienen de su hibridación con un linfocito esplénico. Las células híbridas segregando los anticuerpos deseados serán entonces seleccionadas, después donadas con objeto de obtener células homogéneas (monoclonales) que segregan los anticuerpos deseados y presentan una estabilidad genética en cultivo.

La producción en gran cantidad de estos anticuerpos monoclonales se realiza inyectando estos hibridomas en el peritoneo del ratón. Estas células conservan todos los caracteres de la célula tumoral mielomatosa, van a provocar una ascitis muy rica en anticuerpos monoclonales (2 a 20 mg/ml).

La extremada precisión de los anticuerpos monoclonales ha permitido distinguir la existencia de una gran variabilidad antigénica en el seno de un tipo de virus. El virus de la gripe, ha sido uno de los primeros virus estudiados con el empleo de los anticuerpos monoclonales (6). Ello ha permitido un análisis detallado de las modificaciones antigénicas que afectan a la hemaglutinina y a la neuraminidasa.

También, los anticuerpos monoclonales correspondientes pueden diferenciar cepas de virus en los que su especificidad es muy estrecha, pudiendo ser utilizados con fines taxonómicos. Esto es lo que hemos observado con el virus respiratorio sincicial. La homogeneidad, la disponibilidad y la especificidad de los anticuerpos monoclonales han permitido reemplazar ventajosamente los inmunoseros clásicos por reactivos inmu-

nológicos con los que se detectan rápidamente los antígenos virales presentes en los productos patológicos.

Más aún los anticuerpos monoclonales permiten la mejora de los métodos clásicos de aislamiento de virus, detección precoz del citomegalovirus en los cultivos celulares (7) o su sustitución por las pruebas de diagnóstico rápidas. Por ejemplo la detección del virus Herpes simplex del tipo 1 o del tipo 2 (8) sobre frotis y del virus respiratorio sincitial (9), de los mixovirus A y B (10), de virus parainfluenza I, II y III, de Adenovirus directamente a partir de aspiraciones nasofaríngeas (11). Para las tomas cutaneomucosas y nasofaríngeas la sensibilidad de estas técnicas, con respecto a los métodos de referencia, depende gradualmente del cuidado prestado a la recogida de los productos patológicos. La escasez de células podría, en efecto, ser inconveniente con el método de los anticuerpos monoclonales, como puede ocurrir para el diagnóstico de la gripe en los viejos, en cambio en los niños las secreciones son abundantes en el caso del virus respiratorio sincitial por lo que los resultados son satisfactorios.

Desde hace algún tiempo, venimos utilizando la técnica especial de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales para el virus respiratorio sincitial.

La prueba se efectúa utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con isocianato de fluoresceína que se une específicamente al virus respiratorio sincitial (12). Los anticuerpos monoclonales se usan en una técnica de inmunofluorescencia directa de un solo paso. Las muestras son incubadas con los anticuerpos monoclonales conjugados con isocianato de fluoresceína durante 15 minutos. Y el exceso de reactivo es lavado con solución tampónada de fosfatos. La zona teñida es examinada en el microscopio de fluorescencia.

Si existe antígeno de virus respiratorio sincitial, se observa una fluorescencia granular verde dentro de la célula, que contrasta con la tinción roja de fondo.

2. Técnica de Inmunoanálisis

Los métodos de inmunoanálisis con marcadores enzimáticos (EIA) y en especial las técnicas en fase sólida (ELISA) se están desarrollando en el diagnóstico de las virosis, para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos (IgG e IgM) (13).

La técnica ELISA (siglas inglesas de Enzyme Linked-Immuno-sorbent Assay) puede utilizarse según tres modalidades: métodos competitivo, directo e indirecto. Los dos últimos se emplean habitualmente para la detección de antígenos, consisten en fijar una capa de anticuerpo específico sobre un soporte sólido (placa o esferas de plástico), que actúa como anticuerpo de "captación" del antígeno problema, y en una segunda fase demostrar que la fijación se ha producido mediante la adición de un anticuerpo específico marcado con enzimas o un anticuerpo específico conocido sin marcar, que ha su vez es detectado por un suero antioglobulina marcado. Se produce, por tanto una reacción en "sandwich", anticuerpo de captación-antígeno problema-anticuerpo específico marcado o anticuerpo de captación-antígeno problema-anticuerpo específico conocido-suero antioglobulina marcado con una enzima. Por último, la reacción se visualiza añadiendo el sustrato adecuado, que en presencia de la enzima fijada produce una reacción coloreada.

También se emplea la reacción "ELISA" para la demostración de anticuerpos específicos en el suero del enfermo, ya de las IgG por reacción indirecta o en especial de las IgM (reacción en "sandwich") que son indicativos de infección reciente. En este caso se emplea como anticuerpo de captación un suero anti-IgM (cadena pesada μ) que fija las IgM específicas del suero problema. A continuación se añade antígeno específico conocido y el anticuerpo específico marcado con enzima, que se detecta, al igual que en el caso anterior, por método colorimétrico frente al sustrato correspondiente.

Representa ciertas ventajas técnicas como son: los reactivos son relativamente estables, el color producido en la reacción puede leerse a simple vista cuando no se dispone de equipo complicado y pueden examinarse grandes cantidades de muestras al mismo tiempo.

En cambio las desventajas técnicas son: el procedimiento es relativamente complicado y consume mucho tiempo, las placas de plástico pueden ser inadecuadas por producir efectos estáticos, los sustratos cromógenos pueden ser carcinógenos o mutágenos, se necesita un espectrofotómetro para aumentar la sensibilidad de la prueba.

La técnica ELISA se emplea para la demostración de antígenos en las infecciones por rotavirus y virus de la hepatitis B (AgHBs) y de anticuerpos (IgG o IgM) en el diagnóstico de la rubéola, SIDA, sarampión, parotiditis, herpesvirus, varicelazos-ter y ciomegalovirus (14).

III. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA INMUNO-FLUORESCENCIA (TAF) E INMUNOANÁLISIS (ELISA)

1. *Enfermedades respiratorias*

Las enfermedades respiratorias agudas son causas importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Se calculan que se registran unos 2,2 millones de defunciones por enfermedades respiratorias agudas en el mundo cada año. En los niños, especialmente en los menores de un año de edad, la causa más importante de defunción es la infección de las vías respiratorias bajas. Ésta puede ser de etiología vírica o bacteriana y aún no se ha determinado la importancia relativa de los dos tipos de agentes en diversas partes del mundo.

Durante los dos decenios pasados se ha demostrado que muchos virus producen infecciones respiratorias. Algunos,

como los virus del resfriado común, suelen asociarse con enfermedades leves, en tanto que otros, como los de la influenza, la parainfluenza y el sarampión, pueden producir enfermedades graves. El virus respiratorio sincial (VRS) es sin duda el patógeno más importante de las vías respiratorias bajas en los lactantes muy pequeños.

En el pasado, el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias víricas se basaba en métodos clásicos, como el aislamiento del virus y la detección de anticuerpos, procedimientos prolongados. En años recientes se elaboraron técnicas fundadas en la demostración de antígenos víricos específicos unas cuantas horas después de la toma de la muestra. Son ellas la técnica de anticuerpos fluorescentes (TAF) (12) y la prueba de inmunoadsorbancia ligada a la enzima (ELISA) (13).

La TAF es el método de elección para el diagnóstico rápido de laboratorio de las infecciones víricas respiratorias. Es un método sensible, específico y relativamente económico, cuyos reactivos se conservan largo tiempo en el laboratorio. La prueba misma no plantea muchas dificultades técnicas. Sin embargo, para obtener resultados fiables tiene gran importancia la selección y la preparación de muestras para la prueba. Las secreciones nasofaríngeas ofrecen el mejor material, y la toma adecuada de estas muestras debe producir células intactas que contengan el antígeno vírico. En los enfermos de mayor edad pueden utilizarse lavados nasales o faríngeos e incluso esputos; en cambio han resultado inconvenientes la muestras obtenidas frotando la garganta con torundas. La elución de torundas con secreciones nasales y tos, producen células intactas idóneas, pero la sensibilidad es inferior a la de las secreciones nasofaríngeas.

La interpretación de reacciones específicas mediante la inmunofluorescencia requiere reactivos buenos, de calidad comprobada. Si se detectan antígenos víricos específicos en las vías respiratorias puede determinarse el agente etiológico de la enfermedad.

En un estudio llevado a cabo por Gleren y cols. en 1980 (15) de más de 3.000 casos de enfermedad de las vías respiratorias inferiores en niños, se identificó un agente patógeno en el 28 % de los casos. Casi el 75 % de éstos pertenecían a uno de los cuatro tipos siguientes: VRS, virus de parainfluenza 1 (P1) y 3 (P3), y *Mycoplasma pneumoniae*. Se observó que los cuatro agentes tendían a presentar expresiones clínicas características, a pesar de que todos ellos eran responsables de síndromes definidos y no podían distinguirse sin la ayuda del laboratorio. El VRS resultó asociado con bronquiolitis y neumonía más a menudo que con cualquier otro agente. La P1 resultó el agente predominante asociado con el crup. La P3 fue el segundo agente más corriente aislado en niños con crup y también constituyó una causa importante de la traqueobronquitis y bronquiolitis. La mayoría de los aislamientos del *M. pneumoniae* procedían de niños con neumonía.

Además de los síndromes clínicos característicos, los diferentes agentes mostraron preferencias de edad y estación. Casi el 75 % de los VRS aislados se hallaron en niños menores de tres años y se presentaron en epidemias anuales desde la mitad del invierno hasta el principio de la primavera.

El VRS recibe su nombre debido a que su hábitat natural es el sistema respiratorio del hombre y produce sincitios prominentes cuando crece en cultivo hístico.

El laboratorio que recibe muestras de niños gravemente enfermos observará comúnmente la presencia de VRS. Las muestras para el análisis del virus en inmunofluorescencia directa se obtienen generalmente de la nariz y de la orofaringe mediante una torunda de algodón, sin embargo, la investigación del virus mejora si se aspiran las secreciones de la nasofaringe a través de un tubo desechable de plástico n.º 8 de alimentación de niños prematuros, adaptado a una jeringa de 10 ml.

El VRS no resiste bien la congelación, por lo que se obtendrán mejores resultados si las muestras no tienen que congelarse para su estudio.

Mediante una técnica directa de anticuerpo fluorescente es posible obtener un rápido diagnóstico. En España según el Boletín Microbiológico Semanal (BMS) (2) del Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda (Madrid) se obtuvo material por aspiración nasofaríngea y se examinó por las técnicas de aislamiento del virus e inmunofluorescencia. De un total de 75 infecciones de VRS, 71 (95 %) se diagnosticaron en el día de admisión mediante el método de inmunofluorescencia y todas fueron subsiguientemente confirmadas por el aislamiento del virus.

Durante 1986 en 10 provincias españolas se notificaron 88 casos de infección por VRS, observándose una disminución en el número de notificaciones respecto al año anterior. El cuadro 3 muestra la relación por provincias de los laboratorios que declararon casos durante 1985 y 1986. Puede observarse que en Valencia pasaron de 10 casos en 1985 a 19 casos en 1986.

En relación a la clínica, los casos se distribuyeron según presentarían afectación de vías respiratorias altas o bajas; el 91,6 % de los casos de los que se tienen este tipo de información, están asociados a patología respiratoria de vías bajas, el 60,5 % de los cuales presentaban neumonía y el 32,5 % bronquiolitis.

El cuadro 4 también muestra la distribución por sexo, edad y tipo de patología, no observándose diferencias entre ambos sexos salvo en los casos de bronquiolitis en los que la relación varones/hembras es de 5/1. El dato de edad se conoce en 63 casos (71,6 %), puede verse que el 84 % son menores de 1 año, suponiendo los menores de 6 meses el 22,2 %. Al analizar las edades por patología se observa que el 50 % de los casos de bronquiolitis son niños menores de 6 meses, desplazándose las edades hacia niños mayores en los casos de neumonía. Estos resultados a pesar del escaso número de casos concuerdan con lo descrito para las infecciones con este agente (17).

La distribución temporal de los casos de VRS y Gripe notificadas durante 1983-1986, por períodos cuatrisesmanales

demuestra un claro patrón estacional, acumulándose los casos en los meses de invierno con un pico máximo que precede, de forma sistemática, al de la gripe. Este patrón es similar al observado en otros países de clima templado (18).

2. *Enfermedades de transmisión sexual*

En los órganos genitales se encuentran los tipos 1 y (más frecuentemente) 2 del *Herpes simplex virus* (HSV). Estos dos virus proliferan rápidamente en cultivos celulares y, tras una incubación de toda la noche, puede demostrarse el antígeno por inmunofluorescencia. Si se necesita un diagnóstico más rápido, pueden aplicarse más rápidamente la microscopía electrónica y la técnica de anticuerpos fluorescentes a las muestras clínicas. El diagnóstico rápido es sumamente importante en la embarazada cerca del término, pues un diagnóstico de HSV determinará la vía del parto.

Los *Citomegalovirus* (CMV) pueden transmitirse por vía sexual y encontrarse en la garganta, la orina y los órganos genitales femeninos, y algunas veces en el semen. El virus suele proliferar lentamente en cultivos de células diploides de embriones humanos. En general la citopatología sólo se observa tempranamente en cultivos celulares inoculados con muestras de orina de lactantes infectados al nacer donde la carga antigénica es considerable. Las técnicas de anticuerpos fluorescentes para detectar antígenos nucleares específicos del CMV que pronto se producen, aplicadas a más tardar al día siguiente de inocular orina en el cultivo celular, han proporcionado un diagnóstico rápido. Puede usarse el microscopio electrónico en muestras de orina, pero generalmente es necesaria alguna forma de concentración, v.g., la centrifugación puede ser importante para la detección de IgM específica en sueros de casos agudos o al principio de la convalecencia de enfermos infectados.

En muchas infecciones víricas, la aparición de los síntomas coincide con la producción de anticuerpos. Esto ha hecho

sugerir que estas enfermedades víricas son de base inmunitaria y que, en el momento de la enfermedad, ya no existen virus libres. La hepatitis A es un ejemplo excelente de este tipo de infección. Desde un punto de vista práctico, esto a menudo significa que ya no puede detectarse el virus o el antígeno vírico en el momento en que el enfermo ingresa en el hospital. Ahora bien, en esos casos la detección de los primeros anticuerpos específicos, IgM ofrece un método satisfactorio de diagnóstico, pues no se necesita más que una sola muestra de suero. Actualmente se sabe que, en la mayoría de las infecciones víricas, la IgM específica aparece desde el segundo o tercer día después de iniciada la enfermedad y que, con métodos sensibles, puede observarse su persistencia hasta bien entrada la convalecencia. La presencia de IgM acompaña a la fase aguda de la enfermedad y puede considerarse como diagnóstica de infección en curso o una reactivación de un virus latente como es el caso de los CMV (19).

Otra enfermedad de transmisión sexual es el SIDA. Pineda en 1986 (20) utiliza la inmunofluorescencia y la inmunoinmunoadsorción (ELISA) para la investigación de anticuerpos anti-VIH.

CUADRO 1
SÍNDROMES Y SUS CORRESPONDIENTES VIRUS

<i>Síndrome</i>	<i>Virus</i>
Ictericia neonatal, trombocitopenia, hepatosplenomegalia, coriorrenitis	Citomegalovirus Virus de la rubéola Virus del herpes simple
Linfadenopatía	Virus de Epstein-Barr o pseudo-herpes virus Citomegalovirus
Parotiditis	Virus de la fiebre por arañazo de gato Virus de las paperas Virus de la parainfluenza Virus de la coriomeningitis linfocitaria Enterovirus
Erupción	Virus de la varicela zoster Virus del herpes simple Virus de la varicela Virus de la vacuola Virus de la rubéola Virus de Coxsackie Echovirus
Enfermedad aguda de las vías respiratorias	Virus del sarampión Virus sincital respiratorio Virus de la parainfluenza Adenovirus Virus de la gripe Enterovirus Rinovirus
Encefalitis y meningitis aseptica	Virus del sarampión Virus de las paperas Poliovirus Echovirus Virus Coxsackie Virus del herpes simple
Miocarditis	Virus Coxsackie B Echovirus Virus de las paperas Virus del sarampión Citomegalovirus
Hepatitis	Antígeno asociado con la hepatitis Virus de Epstein-Barr Virus del sarampión Poliovirus
Enfermedades asociadas con vacunas	Virus de las paperas Virus de las vacunas Virus de la rubéola Virus de la viruela Retrovirus
SIDA	Retrovirus

CUADRO 2
VIRUS HUMANOS EN MUESTRAS CLÍNICAS DETECTADOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

<i>Virus</i>	<i>Origen</i>	<i>Referencia</i>
Gripe A y B	Secreciones nasofaríngeas Pulmón	Dalst, 1979
Parainfluenza	Secreciones nasofaríngeas Pulmón	Wong, 1982
Respiratorio sincitial	Secreciones nasofaríngeas Pulmón	Gardener Mac Quillin, 1976
Adenovirus	Secreciones nasofaríngeas Pulmón	Kalter, 1976
Sarampión	Secreciones nasofaríngeas Pulmón, orina, piel, cerebro	Mac Quillin, 1976
Herpes simplex	Vesículas, cerebro	Schmidt, 1980
Varicela-zoster	Vesículas	Schmidt, 1980
Rabia	Cerebro, córnea	Lenette, 1965

CUADRO 3
INFECCIONES POR VRS. CASOS NOTIFICADOS AL BMS AÑOS 1985 Y 1986.
RELACIÓN POR PROVINCIAS

<i>Provincia</i>	<i>Total casos</i>	
	<i>1985</i>	<i>1986</i>
Barcelona	51	20
Bilbao	11	5
La Coruña	1	1
Granada	17	10
Madrid	28	21
Oviedo	4	7
Las Palmas	2	1
Santander	1	4
Valencia	10	19
Zaragoza	1	—
TOTAL	121	88

CUADRO 4
 INFECCIONES POR VRS. CASOS NOTIFICADOS AL BMS AÑO 1986

	Cuadro clínico					Total casos
	Patología respiratoria de vías altas	Neumonía	Bronquiolitis	Bronquitis	No consta clínica	
Total casos	7	46	25	5	5	88
Sexo:						
V	4	22	20	2	2	50
M	3	24	4	3	2	36
SD	—	—	1	—	1	2
Edad:						
< 6 m	2	1	7	2	2	14
6-11 m	—	5	2	2	—	9
1 a	—	9	3	—	—	12
2 a	1	6	1	—	—	8
3 a	2	4	1	1	—	8
4 a	—	2	—	—	—	2
5-9 a	1	2	—	—	—	3
10-19 a	1	1	—	—	—	2
≥ 20 a	—	4	—	—	—	4
Total edad conocida	7	34	14	5	3	63

IV. APORTACIONES PERSONALES

Hemos seleccionado un número limitado de casos, los más representativos, y el estudio de cada uno de ellos se ha enfocado desde el ángulo del laboratorio, analizando especialmente el diagnóstico virológico y estableciendo particulares puntos de vista y comentarios sobre los resultados encontrados. No obstante se adjunta el correspondiente diagnóstico clínico al objeto de poder establecer las bases de un ulterior estudio semiológico de las distintas afecciones, significando que en su mayoría pertenecen a enfermos de los Servicios de Pediatría (Profesor Dr. D. V. Álvarez Ángel), Medicina Interna (Profesor Dr. D. A. González Cruz), y Nefrología (Profesor Dr. D. A. Pérez García) del Hospital General de Valencia, a quienes se deben los diagnósticos correspondientes.

El estudio de los diferentes casos que vamos a leer a continuación, por precisión tiene que resultar árido y monótono. Yo pido perdón por esta circunstancia y muy especialmente en los comentarios que siguen, orientados a presentar aspectos humanos subjetivos a unos problemas actuales, en ocasiones vastos y complejos. Entendemos que la investigación basada exclusivamente en los datos fríos del Laboratorio resulta inanimada, incompleta y parcial. "Lo esencial—como dice Marañón—al cabo, no son tanto los datos mismos como el criterio, el punto de vista, que da a cada hecho su valor y traza las líneas generales que nos permitirán clasificar los problemas futuros".

Presentamos a continuación nueve casos de infección por VRS diagnosticados por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales y tres casos de infección por (CMV) en pacientes inmunodeprimidos diagnosticados por Inmunoenálisis (ELISA) en los que se detectó IgM anticitomegalovirus uno de ellos con SIDA.

A) *Casos aportados de infecciones por Virus Respiratorio Sinicial (VRS)*

Historia clínica del caso n.º 1

Lactante hembra de tres meses de edad que desde una semana antes de su ingreso, presenta cuadro catarral caracterizado por respiración ruidosa, tos y vómitos aislados. Presenta una buena tolerancia oral.

Exploraciones complementarias: Hemograma: normal. Orina: leucocitaria. Urinocultivo: 1.500.000 cols/ml de *E. coli* sensible entre otros a la amoxicilina. Mantoux: negativo. Estudio virológico: investigación de VRS por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales en el moco: positivo. RX tórax: imágenes compatibles con Bronquiolitis.

Evolución: A su ingreso se instaura tratamiento con Dexametasona y fisioterapia respiratoria. Previo antibiograma de orina, se inicia antibioterapia con Amoxicilina. Se normaliza la auscultación al cabo de 14 días.

Julcio diagnóstico: Bronquiolitis.

Historia clínica del caso n.º 2

Lactante varón de cuatro meses de edad afecto de Mucoviscidosis que acude por presentar cuadro catarral de una semana de evolución caracterizado por tos, dificultad respiratoria progresiva y rechazo de algunas tomas, no presenta fiebre.

Evolución: A su ingreso se instaura tratamiento con Tobramicina y Cef tazidina, siendo la evolución favorable y sin complicaciones por lo que es dado de alta.

Análítica y exploraciones complementarias: Hemograma: 13.000 leucocitos. Hto: 35,2 Hgb: 12,3 g. Hematíes 4.370.000. Plaquetas: 606.000. VSG: 14. PCR: negativa. Urianálisis: anormales carece.

Sedimento: 4-6 leucocitos por campo, 1-2 cilindros céreos, 0-1 cilindros granulosos. Frotis faríngeo: *S. viridans* y *N. pharyngis*. Investigación de VRS de inmunofluorescencia directa en el moco: positivo. RX de tórax: imagen de infiltrado perihiliar, imágenes micro alodonomas hiliifugales.

**Julcio diagnóstico: 1. Mucoviscidosis.
2. Bronquitis Obstructiva.**

Historia clínica del caso n.º 3

Recién nacido, hembra, de 13 días de vida que ingresa por iniciar tres días antes cuadro catarral con estornudos y secreción conjuntival serosa, que progresa en los días siguientes a tos seca, taquipnea y dificultad respiratoria. En las últimas 24 horas se comprueba febrícula y vómitos alimenticios coincidente con tos y fatiga antes de las tomas.

Exploración física a su ingreso: Buena coloración de piel y mucosas. Tórax: taquipnea con moderado tiraje sub e intercostal. Ojos: secreción conjuntival seropurulenta bilateral. Orofaringe: muget oral. T.^a rectal: 37,7°C.

Exploraciones complementarias: RX practicada a su ingreso: insuflación bilateral con atelectasia en segmentos 1-2 de Lóbulo superior derecho. Hemograma a su ingreso: 12.800 leucocitos. (3E, 40S, 56L, 1M). Gasometría capilar a su ingreso: discreta hipoxemia. Se inicia administración de oxígeno al 30 % y aspiración de secreciones de vías altas. A las 16 horas de su ingreso se aprecia pico febril (39°C) con afectación del estado general, se practica hemograma: 14.000 leucocitos (2C, 34S, 62L, 2M). Serie roja: normal y previa toma de hemocultivo se inicia de forma empírica antibioterapia parenteral con Ampicilina y Gentamicina. Se suprime antibioterapia al 6.º día de tratamiento tras comprobar hemocultivos negativos.

En los días siguientes se aprecia mejoría lenta con disminución progresiva de la dificultad respiratoria y mejoría radiológica.

ca, en el último control radiológico practicado; en el día de su alta se observa resolución de la atelectasia Lóbulo Superior Derecho. Analítica rutinaria de sala que incluye completo de orina, proteínas totales e ionograma: normales. Estudio virológico: test de inmunofluorescencia directa en moco para VRS positivo.

Muguet oral: con buena respuesta al tratamiento con Nistatina oral y violeta de Genciana. Conjuntivitis: con buena respuesta a tratamiento tópico con Cloranfenicol. Cultivo de exudado conjuntival: flora mixta (*Enterobacter aerogenes* *Streptococo* no hemolítico).

- Juicio diagnóstico:**
1. Bronquiolitis. Atelectasia de lóbulo superior derecho.
 2. Muget oral.
 3. Conjuntivitis.

Historia clínica del caso n.º 4

Varón de 11 meses de edad, controlado por el Servicio de Gastroenterología Infantil por presentar Fibrosis Quística, acude por presentar vómitos alimentarios, encontrándose previamente con cuadro catarral de vías altas, deposiciones más blandas de lo habitual y mayor en número, por lo que se decide su ingreso.

Datos complementarios: Hemograma: 12.300L FL: Normal. VSG: 10 mm/h. Frotis Faríngeo: *Streptococo* no hemolítico. Sedimento: Leucocituria. Coprocultivo: Negativo. Gasometría Inicial: bicarbonato 30 mEq/l. Posteriormente se normalizan 23 mEq/l. Na: 124 mEq/l. K: 4,1 mEq/l. Controles posteriores: Na: 136 mEq/l. K: 5 mEq/l.
Investigación de VRS en moco nasal por inmunofluorescencia: Positiva.

- Juicio diagnóstico:**
1. Fibrosis quística.
 2. Gastroenteritis.

Historia clínica del caso n.º 5

Lactante varón de 2,5 meses que previamente presentaba cuadro catarral de vías altas de 1 semana de evolución se acompaña en las últimas 48 horas de dificultad respiratoria, febrícula y rechazo del alimento.

Datos complementarios: Hemograma: Discreta leucocitosis con linfocitosis.
Anemia normocítica, normocrómica.
VSG 6/14 PCR Ø

Test: Test virológico positivo al VRS.

Mantoux: negativo.

Análítica urinaria: normal.

RX torax: Insuflación pulmonar.

Evolución: Favorable, apirexia durante su estancia con mejoría progresiva de las manifestaciones respiratorias y buena tolerancia oral, curva ponderal ascendente.

- Juicio diagnóstico:**
1. Bronquiolitis por VRS.
 2. Anemia infecciosa.

Historia clínica del caso n.º 6

Lactante varón de 4 meses de edad que ingresa por presentar síndrome febril de 24 horas de evolución, asociándose se rechazo del alimento y tos ocasional. Tiene un hermano gemelo ingresado por el mismo cuadro.

Datos complementarios: Discreta leucocitosis con linfocitosis. Test virológico positivo para VRS. VSG 24/44, Calcio 9,1 mg %, Fósforo 6,2 mg %, FA 285 UI, Mantoux negativo.

Evolución: Apirético a las 24 horas, con evolución favorable presentando mejoría progresiva y curva ponderal ascendente. Es dado de alta para seguir control ambulatorio.

- Juicio diagnóstico:** Bronquiolitis.

Historia clínica del caso n.º 7

Lactante varón de 4 meses de edad ingresado por bronquiolitis y dado de alta hace 24 horas, acude de nuevo por presentar desde hace 12 horas deposiciones líquidas en número abundante con moco y sin sangre y rechazo de las tomas. No tiene fiebre ni vómitos.

Análítica. Hemograma: leucocitosis con serie roja normal. Orina normal. Test virológico positivo para VRS.

Coprocultivo:

<i>Antibiograma de escherichia coli GI 0128/K67</i>	
<i>Bacterias</i>	
<i>Klebsiella oxyloca</i>	Carbenicilina R
<i>Escherichia coli GI 0128/K67</i>	Cefalosporina S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cloranfenicol S
<i>Citrobacter freundii</i>	Sulfadiazina R
<i>Streptococcus faecalis</i>	Colimicina S
	Sulfadiazina R
	Trimetoprim-sulfametoxazol S
	Neomicina S
	Gentamicina S

Juicio diagnóstico: 1. Bronquiolitis por VRS.

2. Gastroenteritis.

Historia clínica del caso n.º 8

Varón de 2 meses de edad que se ingresa por presentar discretos signos de Distress Respiratorio y coloración pletórica de piel.

Poliglobulia: A su ingreso presenta Hematocrito capilar del 80 % dado las cifras de glucemia límites (0,33 g %) y moderado tiraje sub-costal se realiza canalización de la vena umbilical, siendo el Hematocrito Venoso Central de 67 por lo que se practica Plasmáferesis de 50 cc siendo el hematocrito al finalizar ésta de 65 % capilar. Normalizándose la glucemia y desapareciendo los signos de Distress.

Ictericia. A las 48 horas de vida, presenta coloración icterica de piel y mucosas, siendo el valor máximo alcanzado de 13 mg % siendo el control posterior de 8,5 mg %.

Grupo sanguíneo del recién nacido: 0 positivo.

Coombs directo (-).

Test virológico para el VRS: Positivo.

Orina: Glucosa, Acetona, Albúmina Ø; Densidad 1.005; Sedimento 3.4LP/Campo.

Juicio diagnóstico: 1. PoliGlobulia.

2. Distress respiratorio.

3. Ictericia no immune.

Historia clínica del caso n.º 9

Varón de 4 meses de edad estando previamente bien, inicia 3 días antes de su ingreso un cuadro catarral con tos y vómitos ocasionales. Doce horas antes de acudir a urgencias, se asocia hipotermia y dificultad respiratoria progresiva y rechazo de las tomas.

Exploración complementaria:

Hemograma normal.

VSG: 60/86.

RX de tórax: insuflación pulmonar con aumento de diámetro anteroposterior del tórax.

Análisis: Análisis - Test virológico.

Producto: moco.

Inmunofluorescencia directa positiva para VRS.

Juicio diagnóstico: Bronquiolitis.

Discusión

Los nueve casos presentados con la prueba de inmunofluorescencia directa positiva para el VRS están asociados con patología respiratoria. Seis tienen el diagnóstico clínico de bronquiolitis y los tres restantes están diagnosticados como sigue: el caso n.º 2 de bronquitis obstructiva, el caso n.º 4 de fibrosis quística, sin embargo en la historia clínica se señala que presenta abundantes secreciones de orofaringe, y el caso n.º 8 presenta distres respiratorio.

Siete de ellos son varones y dos son hembras; sus edades oscilan entre los trece días y los cuatro meses.

La distribución estacional fue entre los meses de octubre y marzo.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VRS requiere muestras obtenidas cuidadosamente, tanto para cultivo, como para la enzimoimmunoabsorción e inmunofluorescencia.

Kumar, 1987 (21), encuentra concordancia entre las tres pruebas (94 %). Tanto la enzimoimmunoabsorción como la inmunofluorescencia son altamente específicas (98 %). Idealmente, los laboratorios consideran que el uso de las pruebas rápidas de VRS deben validarse posteriormente con la considerada prueba de elección de los cultivos de tejidos, dado que pueden existir considerables variaciones de un laboratorio a otro.

Ello es especialmente importante con la inmunofluorescencia, que requiere considerable experiencia de interpretación. Una vez validado, estas pruebas tienen la suficiente elevada

sensibilidad y especificidad para proporcionar una alternativa a los cultivos de tejidos.

La elección de muestras es particularmente importante en las pruebas diagnósticas del VRS.

El título de virus en las muestras de lavados nasales, como han demostrado Hall y Douglas en 1981 (22), es considerablemente más elevada que los títulos en muestras de escobillonaje nasofaríngeo.

Las muestras ricas en células son excelentes para los análisis de inmunofluorescencia.

En el pasado un diagnóstico clínico de probable infección por VRS era considerado como suficiente para la mayoría de los médicos. Sin embargo, la posibilidad de una terapéutica específica antiviral con ribavirin aerolizados hace necesario el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido de infección por VRS.

La confirmación de laboratorio es especialmente importante en casos atípicos, tales como lactantes con apnea o precozmente en el curso de infección en lactantes con enfermedad congénita de corazón u otra enfermedad pulmonar subyacente y también para prevenir epidemias.

La prueba de inmunofluorescencia rápida, asegura Kumar (21), es una alternativa a los costosos cultivos celulares y no se requiere expertos en Virología.

La rápida extensión de la disponibilidad de las pruebas rápidas de diagnóstico del VRS ayudará al preoz y apropiado uso del tratamiento antiviral en pacientes de alto riesgo por infecciones graves de VRS.

Kim, en 1983 (23), obtuvo 5 muestras que eran positivas por inmunofluorescencia monoclonal (IFm) y negativas por aislamiento. La fluorescencia era característica, estrictamente intracitoplásmica y se parecía a la observada en los casos en que ambos métodos eran positivos.

La falta de positividad en cultivo de tejidos de estas muestras pudo explicarse por el hecho de que no fueron tratadas

con suficiente rapidez (fueron dejadas durante 48 horas a 4 °C y congeladas antes de la inoculación).

Por ello la prueba de la inmunofluorescencia monoclonal sería más específica y sensible según señala Kadi (24).

El diagnóstico de VRS puede hacerse por aislamiento en cultivos celulares. Este método es largo, delicado y sobre todo caro. La inmunofluorescencia parece ser un método interesante en países en desarrollo donde el equipo para cultivos celulares es a menudo difícil de conseguir.

B) Casos aportados de infección por citomegalovirus (CMV)

Presentamos a continuación tres casos clínicos de enfermos inmunodeprimidos en los que se detectó IgM para CMV.

Historia clínica del caso n.º 1

A. C., de 72 años de edad, en programa de hemodiálisis por nefropatía intersticial en estado terminal; presentaba a la vez hemiplejía derecha y disartria.

Datos última analítica: Hgb: 7,9 g/dl, Hto: 24,5, Leucocitos: 7.600, Urea: 182 mg/dl, Creatinina: 9,9 mg/dl, Na: 138 mEq/l, K: 6,5 mEq/l, Ca: 10,5 mg/dl, P: 3,9 mg/dl, Fosfatasa Alcalina 41 UI, GOT/cc 10 UI/GPT 16UI, Batería hepatitis B: marcadores negativos.

Hierro 46 gammas/dl, Triglicéridos 280 mg/dl, colesterol 223 mg/dl (HDL 33 mg/dl, LDL 134 mg/dl).

La investigación de anticuerpos anti-CMV por ELISA resulta positiva a IgM-título 1/160 e IgG-título 1/2560. A los 15 días la IgM no se detecta, mientras que la IgG se mantiene con un título de 1/2560.

Historia clínica del caso n.º 2

E. J., de 38 años de edad, en programa de hemodiálisis por IRC, en estado terminal secundaria a diabetes mellitus juvenil, con retinopatía diabética; padeció un icus protuberancial con recuperación posterior.

Datos analíticos: Hgb: 10,5 g, Leucocitos: 3.500 (2G, S75, L21, M2) Plaquetas: 104.000, Na: 135 mEq/l, K: 3,9 mEq/l, Glucosa: 164 mg/dl, Urea: 24 mg/dl, VSG: 56, GOT: 52 UI, GPT: 32 UI, Fosfatasa Alcalina: 64 UI, LDH: 535 UI. Sistemático de orina: 60 hematíes en sedimento.

Datos bacteriológicos: Hemocultivos, urocultivo, coprocultivo: estériles. Parasitológico y examen en fresco de heces negativo. VIH: positivo, Baciloscopia: negativa.

IgG: 2.540 mg %, IgA: 435 mg %, IgM: 170 mg %.

Investigación de anticuerpos anti-Toxoplasma: Positiva. Prueba de la hemaglutinación inhibición: Positiva (1/32). Prueba de la inmunofluorescencia indirecta: IgM: Negativa. Anticuerpos anticandida: Positivo (1/256). Anticuerpos anti-legionella: Negativo.

La investigación de anticuerpos anti-CMV por ELISA resulta positiva a IgM-título 1/160 e IgG-título 1-640. A los 15 días la IgM no se detecta, mientras que la IgG se mantiene a la misma titulación.

Historia clínica del caso n.º 3

Se presenta un caso de un paciente de 37 años remitido para estudio y seguimiento de una toxicomanía e investigación de anticuerpos anti HTLV-III/LAV.

Asimismo presentó un brote diarreico que cedió de forma espontánea. El estudio inicial no puso de manifiesto agente etiológico alguno para el proceso respiratorio, así como el urocultivo fue negativo.

En los estudios complementarios destacan como datos más relevantes: Hgb: 10,5 g%, Leucocitos: 3.500 c/cc (cayados 2 %, segmentados 75 %, linfocitos 21 %, monocitos 4 %, Plaquetas: 104.000 c/cc, Na: 135 mEq/L, K: 3,9 mEq/L, Glucosa: 104 mg %, Urea: 24 mg %, VSG: 56 mm/h, GOT: 52 U/L, GPT: 32 U/L, Fosfata Alcalina: 64 U/L, gama GTP: 29 U/L, Ca: 7,6 mg %, P: 3,3 mg %. En orina 60 hematíes por campo en el sedimento e indicios de albúmina.

Hemocultivo, urocultivo, coprocultivo: Negativo. Parasitológico y examen en fresco de heces: Negativo. Baciloscopias: Negativas. Gota gruesa y Giemsa en sangre periférica no demostraron formas parasitarias.

Mantoux: Negativo. Investigación de anticuerpos anti-HTLV-III/LAV (método de ELISA): densidad óptica del problema 1.903. Punto de corte 0,468. El valor muestra problema respecto al punto de corte es 4 veces superior. Inmunofluorescencia indirecta con células CEM infectadas persistentemente con virus HTLV-III/LAV: Positivo.

Anticuerpos IgG anti-CMV (ELISA): Positiva (título 1/2560). Se han detectado anticuerpos IgM (ELISA): Positiva (título 1/160).

Al cabo de 9 días presenta cefalea, desorientación y relajación de esfínteres y distress respiratorio. Se pautó oxigenoterapia, sulfadiazina, pirimetamina, cefotaxima y no se pudo realizar escáner del sistema nervioso central debido a que ese mismo día hizo un exitus letalis.

Discusión

Una breve recapitulación histórica de las enfermedades debidas al CMV proporciona un excelente esquema de cómo aumenta nuestro conocimiento de una enfermedad vírica, a medida que se desarrollan mejores métodos para su diagnóstico. También demuestra gráficamente cómo un agente omnipre-

sente, considerado en un tiempo como causa poco común de enfermedad puede convertirse en un problema importante, cuando se exploran nuevas fronteras médicas y quirúrgicas. En 1904 se observaron en el cadáver de un recién nacido células muy agrandadas con inclusiones intranucleares e intracitoplasmáticas, patognomónicas de la "enfermedad del virus de la glándula salival". Después de lo cual y durante un largo periodo de tiempo, la enfermedad congénita se consideraba invariablemente fatal. En 1950 se apuntó que las células diagnósticas podrían encontrarse en el sedimento de la orina, y pronto se observó que los niños con esta enfermedad pueden sobrevivir, aunque se creía que los efectos neurológicos graves eran corrientes.

Durante estos últimos años se han ido recogiendo muchos datos relativos a la epidemiología, clínica, características físicas y multiplicación de los CMV.

La demostración de infección por CMV podía hacerse por varios métodos. Los primeros estudios llamaron la atención sobre la presencia de cuerpos de inclusión en células al efectuar las necropsias.

Después del aislamiento por Stern (25) del virus en la glándula submaxilar de un niño y en los tejidos adenoides comenzó a generalizarse el empleo de los cultivos de tejidos para estos estudios. Sin embargo, para investigaciones epidemiológicas, los cultivos de tejidos son poco prácticos, y por este motivo es preferible para experiencias masivas efectuar la prueba de fijación del complemento.

La infección por virus citomegálico es cosmopolita y la frecuencia de anticuerpos puede llegar hasta el 85 % o más de la población según Stern y Eleck (26). La diseminación de la infección varía según las condiciones económicas; en las poblaciones pobres la prevalencia de anticuerpos es ya frecuente en la infancia, mientras que en las poblaciones más prósperas aparecen en la adolescencia y en adultos jóvenes (27). La infección es habitualmente subclínica, pero ocasionalmente tie-

ne interés hematológico por producir una forma atípica de mononucleosis infecciosa, especialmente en personas mayores, con prueba de Paul Bunnell negativa (28).

Cuando las mujeres gestantes se infectan existe la posibilidad de que el feto pueda afectarse y entonces puede conducir a una enfermedad neonatal citomegálica asociada con graves lesiones del cerebro, y de evolución generalmente mortal (29). Sin embargo, la gran mayoría de las infecciones son asintomáticas o causan únicamente una enfermedad relativamente benigna, aunque algunos de los niños afectados, quizá sobre un 10 % pueden convertirse en retrasos mentales (30).

En 1975 una investigación fue llevada a cabo por nosotros (31) con el fin de determinar la prevalencia de infección citomegálica en la región valenciana. Los anticuerpos fijadores de complemento fueron estimados por la técnica de Microtiter, según forma descrita por Server, con antígenos de procedencia comercial.

Se examinó el suero de ciento setenta y una personas. El 58 % de ellos poseían anticuerpos. Su distribución por edades era del 22 % entre menores de 10 años; el 62 % entre los de 11 y 30 años, aumentando hasta el 73 % entre los de 31 a 50 años, para descender ligeramente al 68 % entre los de 51 a 70 años.

En 1983 (32) estudiamos los anticuerpos anti-Citomegalovirus en pacientes de la consulta de Enfermedades de Transmisión Sexual (E.T.S.). Se procesaron 273 muestras de suero, de las cuales 178 correspondían a pacientes procedentes de la consulta de E.T.S., 52 a pacientes procedentes de las consultas pediátricas y 43 a donantes de sangre. Para la determinación de la tasa de anticuerpos anti-Citomegalovirus se utilizó la técnica ELISA. El título medio de anticuerpos anti-Citomegalovirus en E.T.S. fue de 2275.14, en niños de 474.73 y en donantes de 511.16, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En cuanto al porcentaje de seronegativos, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre la población infantil y la población adulta.

Debido a la gran labilidad del virus a las influencias ambientales, se necesita un contacto íntimo para la extensión horizontal del virus. Según Lang (33) y Jordan (34) en el incremento del número de individuos con anticuerpos anti-Citomegalovirus, acontecido en la adolescencia y en el adulto joven podría tener gran importancia la transmisión debida a la actividad sexual. Esta transmisión puede ser el resultado de una infección oral o bien genital, pues son muchos los autores que han establecido la existencia del virus en la cavidad oral y en el cérvix, y más recientemente en el líquido seminal de hombres adultos. Por otro lado, como consecuencia de la gran frecuencia de infección del tracto genital de mujeres jóvenes (35) y a los elevados niveles y prolongada excreción del virus en el semen (36) se ha sugerido como posible forma de infección la transmisión venérea (34).

En 1983 investigamos (32) la presencia de anticuerpos IgG e IgM en 301 casos de mujeres de 18 a 35 años con la técnica ELISA. En 265 mujeres encontramos títulos de IgG superiores a 1/40, lo que representa el 88 % del total. En 4 casos (1,3 %) encontramos IgM anti-CMV. Sólo un 12 % eran IgG e IgM seronegativas para CMV. Hasta hace pocos años se creía que la transmisión transplacentaria era resultado de una viremia después de una infección primaria de la madre, hoy en día se piensa que las infecciones recurrentes tienen un papel importante en la infección intrauterina. De todo lo expuesto se deduce que la detección de IgM en recién nacidos tiene gran importancia pues como es sabido esta inmunoglobulina no es capaz de atravesar la barrera placentaria.

Los dos primeros casos de enfermos inmunodeprimidos que presentamos ahora tenían IgM específica y títulos altos de IgG específica, pero sin que se observara un incremento del título de estas últimas, es decir, no se observaba seroconversión. Por lo tanto, no se trataba de una infección primaria, sino de una reactivación del virus (37).

Los estudios prospectivos indican la presencia de IgM específica que coincide con la excreción del virus por orina, tanto si se trata de una primoinfección como de una reinfección. Calico, en 1985 (38), encuentra 19 enfermos con IgM específica eliminadores de CMV.

La presencia de IgM específica proporciona un marcador de replicación activa de CMV, incluso en aquellos pacientes que poseen anticuerpos IgG específicos preexistentes.

Las infecciones por el CMV ocurren frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos, empeora el pronóstico, pudiendo llegar incluso a la muerte del enfermo (39), como ocurre en el caso n.º 3.

A medida que el trasplante renal se convirtió en un procedimiento aceptado, se descubrió que casi las tres cuartas partes de los pacientes supervivientes desarrollaban la infección por CMV.

Rasmussen (37) estudió 11 pacientes inmunodeprimidos con trasplante cardíaco y subsecuente infección por CMV. La IgM específica de CMV y viruria fue observada en un enfermo con infección primaria y también en otro que presentó una reinfección. El primero presentó un notable incremento de la IgG, en cambio en el segundo la presencia de IgM no se vio acompañada de un aumento en el título de IgG específica.

En algunos casos la presencia de IgM y viruria se pudo detectar al cabo de 1 año.

La infección por CMV constituye una complicación común de los estados malignos. La evidencia reciente también indica que la infección por CMV adquirida en niños y adultos puede dar como resultado una gran diversidad de enfermedades, entre las que se encuentran la hepatitis, la neumonía intersticial y la anemia hemolítica adquirida. Por ello, en sólo unos pocos años, nuestro concepto del CMV ha cambiado desde el de una infección congénita fatal poco común hasta una infección que implica la gran mayoría de la población, en general de forma

asintomática, pero a veces con diversidad de síndromes clínicos distintos.

En 1965, un grupo de investigadores finlandeses descubrieron un incremento cuadruplicado en los anticuerpos anti-CMV en un grupo de pacientes con mononucleosis heterófila negativa. Al año siguiente se describió el mismo tipo de incremento en anticuerpos anti-CMV en pacientes sometidos a intervención quirúrgica de corazón abierto, generalmente realizada con asistencia mecánica en la circulación.

En 1985 Bach y col. (40), describen infecciones por CMV en enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida que presentaban neumonitis, reinitis, encefalitis, miocarditis y gastroenteritis, indicando que la reactivación es un factor de pronóstico desfavorable en estos enfermos, dado que un elevado número de ellos fallecieron antes de los tres meses. El caso n.º 3 que presentamos tenía anticuerpos IgM anti-CMV 10 días antes del exitus, lo que indicaba una reactivación de dicho virus. Según Staquet (39) la infección por CMV es una de las mayores causas de mortalidad en enfermos con SIDA.

V. CONCLUSIONES

En resumen, durante el decenio pasado se ha efectuado un progreso de la virología de una disciplina de interés académico hasta otra de considerable utilidad práctica.

Dentro de este mismo lapso las técnicas aplicadas en virología han cambiado radicalmente, sobre todo por lo que respecta a la asistencia y el tratamiento de los enfermos, y a la epidemiología. Las técnicas rápidas de diagnóstico virológico han sido esenciales para este cambio, lo que ha inducido a tomar en consideración los diversos métodos de detectar la presencia de virus o de antígenos víricos en todos los tipos de muestras clínicas. Las reacciones de base enzimática dan un grado de sensibilidad que permite detectar componentes víricos sin el

paso intermedio del cultivo celular. Puede predecirse que, como estas pruebas sólo se han empleado durante un tiempo relativamente breve, se modificarán para proporcionar aún mayores sensibilidad y especificidad dentro de pocos años. Además debe esperarse que habrá otros progresos, como mejores medios de conservar y almacenar antígenos inestables.

Las técnicas genéticas, entre ellas la modificación de genes y la tecnología de clonación e hibridación, nos permitirán en lo futuro producir antígenos y anticuerpos de diagnóstico "bien definidos", "a la medida", de especificidad y homogeneidad absolutamente conocidas. Estos adelantos destacan más aún la importancia de diagnóstico rápido, que permitirá tratar de manera práctica un número cada vez mayor de virosis y beneficiar con ello tanto a individuos como a comunidades.

He dicho.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Sanchis-Bayarri Vaillant, V., Sanchis-Bayarri Lahoz, V., Tripsinización de células amnióticas para cultivos celulares. *Medicamenta XLIV*, 422: 325-327 (1965).
2. Detection of antigens and IgM antibodies for rapid diagnosis of viral infections: a memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 57: 925-930 (1979).
3. Gardner, P. S. y McQuillin, J., *Rapid virus diagnosis-application of immunofluorescence*, 2ª ed., Londres. Butterworth (1980).
4. Donald, J., Kun, Z. y Ferraro, M. J., *Detection of Microorganisms in Clinical Samples*. Academic Press, Inc. (1983).
5. Kohler, G., Milstein, C., Production of monoclonal antibodies. *Nature*, 256: 495-497 (1975).
6. Breschkin, A. M., Ahern, J. y White, D. O., Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. VIII. Topography of the antigenic regions of influenza virus hemagglutinin determined by competitive radioimmuno assay with monoclonal antibodies. *Virology*, 113: 130-140 (1981).
7. Goldstein, L. C., McDougall, J., Hackman, R., et al., Monoclonal antibodies to cytomagalovirus: Rapid identification of clinical isolates and preliminary use in diagnosis of cytomagalovirus pneumonia. *Infect Immun*, 38: 273-281 (1982).
8. Goldstein, L. C., Corey, L., McDougall, J. M., et al., Monoclonal antibodies to herpes simplex viruses: Use in antigenic typing and rapid diagnosis. *J. Infect. Dis.*, 147: 829-837 (1983).
9. MacDonald, M. E., Hall, C. B., Suffin, S. C., Alexson, C., Harris, P. J. y Manning, J. A., Respiratory syncytial viral infections in infants with congenital heart disease. *New England Journal of Medicine*, 307: 397-400 (1982).
10. Kimball, A. M., Foy, H. M., Cooney, M. K., Allan, I. D., Matlock, M. y Plorde, J. J., Isolation of respiratory syncytial and influenza viruses from the sputum of patients hospitalized with pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 181-184 (1983).
11. Nowinski, R. C., Tam, M. R., Goldstein, L. C., et al., Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. *Science*, 219: 637-644 (1983).
12. Giménez, H. B., Cash, P. y Melvin, W. T., Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *Journal of General Virology*, 65: 963-971 (1984).

13. Volken, R. H., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 53: 85-92 (1980).
14. Torregrosa, R., Lorente, S., Fraile, M. T. y Sanchis-Bayarri Vaillant, V., Determination of cytomegalovirus antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in women of fertile period. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 28 (1): 85-90 (1984).
15. Glezen, W. P., Paredes, A., Taber, L. H., Influenza in children. Relationship to other respiratory agents. *Jama*, 243: 1345-1349 (1980).
16. Editorial, Infecciones por virus respiratorio sincitial noificadas al BMS 1983-1985. *BMS*, 20: 1-8 (1986).
17. McIntosh y Chanock, Respiratory Syncytial Virology. Raven Press, New York, 1285-1304 (1985).
18. Anestad, G., Interference between outbreaks of respiratory syncytial virus and influenza virus infection. *The Lancet*, 1: 502 (1982).
19. Sanchis-Bayarri Vaillant, V. y Llorca, I., Investigación de inmunoglobulina M específica anticitomegalovirus en enfermos inmunocomprometidos. XXXIV Congreso Nacional de Asociación Española de Biopatología Clínica Valladolid, 4 a 6 junio 1987. Acta de Resúmenes de Comunicaciones, pág. 61.
20. Pineda, J. A., Leal, M., García, F., Sánchez, A., Rivera, F. y Lissen, E., Prevalencia de anti LAV/HTLV-III en prostitutas de Sevilla. *Medicina Clínica*, 86: 498-500 (1986).
21. Kumar, M. L., Super, D. M., Lembo, R. M., Thomas, F. C., Prokay, S. L., Diagnostic efficacy of two rapid tests for detection of Respiratory Syncytial Virus Antigen. *J. of Clin. Microbiology*, 25 (5): 873-875 (1987).
22. Hall, C. B., Douglas, R. G. Jr., Nosocomial respiratory Syncytial viral infections. *Am. J. Dis. Child*, 135: 512-515 (1981).
23. Kim, H. W., Arrobio, J. O., Brandt, C. B., Jeffries, B. C., Pyles, G., Reid, J. L., Chanock, R. M. y Parrott, R. H., Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington D.C.I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am. J. Epidemiol.*, 98: 216-225 (1973).
24. Kadi, Z., Dali, S., Bakouris, S., Bourguermouh, A., Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection by antigen immunofluorescence detection with monoclonal antibodies and immunoglobulina M. Immunofluorescence test. *J. of Clin. Microbiology*, 24 (6): 1038-1040 (1986).
25. Stern, H., Isolation of citomegalovirus and clinical manifestations of infection at different ages. *Br. Med. J.*, 1: 665 (1968).
26. Stern, H. y Eleck, S. D., The incidence of infection with citomegalovirus in anormal population. A serological study in Greater London. *J. Hyg Camb*, 63: 79 (1965).
27. Li, F. y Hanshaw, I. B., Citomegalovirus infection among immigrant children. *Am. J. Epidemiol.*, 86: 137 (1967).
28. Klemola, E. y Kaaiainen, L., Citomegalovirus as a possible cause of disease resembling infections mononucleosis. *Br. Med. J.*, 2: 1099 (1965).
29. Weller, I. H. y Hanshaw, I. B., Virologic and clinical observations on citomegaloinclusions disease. *New. Engl. J. Med.*, 266: 1233 (1962).
30. Stern, H., Eleck, S. D., Booth, I. C. y Eleck, D. G., Microbial causes of mental retardation. The role of prenatal infections with citomegalovirus, rubella virus and toxoplasma. *Lancet*, 2: 443 (1969).
31. Sanchis-Bayarri Vaillant, V. y Donderis, S., Incidencia en la región valenciana de anticuerpos producidos por citomegalovirus. *Sangre*, 20 (3): 323-326 (1975).
32. Torregrosa, S., Lorente, S., Fraile, M. T. y Sanchis-Bayarri Vaillant, V., Anticuerpos anti-citomegalovirus en la consulta de enfermedades de transmisión sexual (E.T.S.). *Rev. Lat.-amer. Microbiol.*, 25: 231-234 (1983).
33. Lang, D. J. y Kummer, J. F., Demonstration of Cyomegalovirus in semen. *N. Engl. J. Med.*, 287: 756-758 (1972).
34. Jordan, M. C., Rousseau, W. E., Noble, G. R., Stewart, J. A. y Chin, T. D., Association of cervical Cyomegalovirus with venereal disease. *N. Engl. J. Med.*, 288: 932-934 (1973).
35. Montgomery, R., Younblood, L. y Medearis, D. N. Jr., Recovery of Cyomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics*, 49: 525-531 (1972).
36. Lang, D. J. y Kummer, J. F., Cyomegalovirus in semen: Observations in selected populations. *J. Infect. Dis.*, 132: 472-473 (1975).
37. Rasmussen, L., Kelsall, D., Nelson, R., Carnex, W., Hirsh, M., Wiston, S., Preksaitis, I. y Nerigan, T. S., Virus-specific IgM antibodies in normal and immunocompromised subjects infected with cyomegalovirus. *J. of Inf. Dis.* (1982).
38. Calico, I. y Arcalis, L., Detección de IgM anti-citomegalovirus en enfermos eliminadores de CMV. *Med. Clin.*, 85: 699-701 (1985).
39. Staquet, M., Hemmer, R. y Baert, A., *Clinical aspects of aids and aids-related-complex*. Ed. Oxford University Press. ISBN 0-19-261615-3 (1986).
40. Bach, M. G., Bagwell, S. P., Knapp, N. P. et al., 9(1,3-dihydroxy-2-propoxy-methyl) guanine for cyomegalovirus infections in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 103: 381-382 (1985).

DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL ACADÉMICO NUMERARIO

ILMO. SR. DR. D. V. SANCHIS-BAYARRI LAHOZ

EXCMO. SR. PRESIDENTE;
EXCMOS. E ILMOS. SRRES. DE LA MESA;
ILMOS. SRRES. ACADÉMICOS;
SEÑORAS Y SEÑORES:

Al ocupar esta tribuna, reaparecen en mi memoria recuerdos de mi juventud, largo tiempo olvidados. Cursaba yo el primer año de Medicina en nuestra Facultad de Valencia. Todos los días atravesaba los patios del Hospital Provincial, en horas tempranas, para acudir a las clases. Un día, sobre una puerta siempre cerrada a esas horas, apareció un anuncio que convocaba al público a una sesión de la Real Academia de Medicina. Detrás de esa puerta estaba el local en que se alojaba esta prestigiosa entidad. Decidí acudir a esa reunión. La sesión estaba anunciada para las 11 de la mañana de un precioso domingo del mes de mayo valenciano. Entré en el local, confundido con el público que llenaba el salón. Quedé muy impresionado al verlo. Todo él tenía un empaque señorial, muy al estilo decimonónico, entonces aún en boga. Había un precioso estrado presidencial y detrás de éste y a conveniente altura, dominaba la estancia el retrato de una señora joven, era la reina Isabel II.

Empezó la sesión: Ésta tenía por objeto el mismo que ahora celebramos, recibir a un nuevo Académico. Todo lo que se habló y se hizo quedó grabado en mi memoria y lo voy a relatar

brevemente: Comenzó el acto con la lectura del obligado discurso del académico electo Dr. D. Rafael Pastor Reig, que versó sobre "Epidemiología y profilaxis de la fiebre tifoidea en Valencia". Entonces era un tema de gran actualidad, pues los casos eran muchos, el curso clínico largo y plagado de incidentes que a menudo finalizaba con elevada mortalidad. El discurso fue seguido con gran atención por todos los asistentes. Le siguió en el uso de la palabra su padrino, que por una rara casualidad se daba también la circunstancia, como en el caso de hoy, de ser su padre. Se trataba del Excmo. Sr. Rector de la Universidad y Catedrático de Patología Médica de la Facultad de Medicina, D. Rafael Pastor y González. Éste comenzó su disertación confesando su temor a hacer una hiperbólica valoración de los méritos del recipiendario, pero que también le preocupaba el caer en el extremo contrario, haciendo una relación áspera y monocrorde salmodia, desprovista de la afable cordialidad con que se solía recibir a los nuevos académicos. Entre estos dos extremos deseaba desarrollar su parlamento y a fe que lo consiguió, pues calurosas muestras de aprobación lo demostraron al finalizar el mismo.

Y ahora, y por las mismas circunstancias, yo me hallo con el mismo conflictivo estado de ánimo que sufrió aquel lejano Rector. Por ello, me excuso de hacer más largo este preámbulo, puesto que necesariamente sería igual a lo que ya habéis oído y paso, pues, a comentar lo que estimo necesario para dar a conocer la trayectoria científica, profesional y docente del recipiendario.

Nos encontramos, Sres. Académicos, frente a un médico que lleva treinta años largos de actividad profesional, periodo de tiempo más que suficiente para poderle aquilatar en todos sus aspectos y lo haré de la manera más clara y somera que exige el caso.

Creo pertinente empezar por tratar de analizar por qué escogió la carrera de Medicina y si ello fue debido a alguna circunstancia particular. Creo que puedo dilucidar este extremo.

Este médico, nació en casa de otro médico, su padre, que a la sazón tenía en el mismo domicilio un pequeño laboratorio. Sus juegos e ilusiones infantiles fueron madurando entre probetas y tubos de ensayo y en ese ambiente y bajo la impronta de este maestro se formó. A la hora de orientar su vida profesional, eligió los estudios de Medicina. Todo le llevó a lo que es hoy. El medio ambiente en que se vive moldea fuertemente las decisiones fundamentales de la vida de los humanos. Es de señalar, que esta vinculación profesional le introdujo precozmente en el medio de la especialidad elegida. Los largos seis años de estudio en la Facultad están salpicados de espacios de tiempo suficientes para otras actividades: verano y vacaciones jalonan el periodo de estudios y le llevaron a colaborar con su padre en las labores técnicas que suavemente pasaron ante sus ojos, así como a tener la información derivada de la lectura de revistas médicas. Y así, sin prisas ni desmayos, al finalizar su vida estudiantil estaba suficientemente preparado para una actuación elemental y poder seguir su especialización en otros ambientes y ampliar su formación hasta alcanzar los niveles en que está actualmente.

Trayectoria profesional

Estimo necesario traer una relación sucinta de sus actividades profesionales: Alumno Interno de Higiene y Microbiología en 1954. Licenciatura en 1956. Grado de Doctor con premio Extraordinario en 1959. Profesor de Clases Prácticas de Higiene y Microbiología. Profesor Adjunto, durante quince años, de la misma disciplina. Obtuvo Becas en varias ocasiones, la primera, siendo todavía estudiante, para un Curso de Medicina Tropical, en el Instituto del mismo nombre de Hamburgo. Becario de la Fundación Juan March, Beca del Departamento de Microbiología de la Universidad de Rochester (USA), 1957-1958. En 1961, jefe del Servicio de Análisis Clínicos, del Hospital General de Asturias.

Es Miembro de la Sociedad Internacional de Hematología. Miembro activo de la Academia de Ciencias de Nueva York. Miembro del Subcomité Internacional de tipificación de estafilococos por bacteriófagos, en calidad de representante nacional. Miembro de las Sociedades de Microbiología Española, Francesa y Americana. Desde 1985, Miembro de la Escuela de Alta Dirección y Administración Hospitalaria. En 1960, Jefe del Servicio de Hematología y Transfusión de la Seguridad Social de Granada. Actualmente, Profesor Asociado de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Unidad Docente del Hospital General de Valencia. Desde 1970, es Director del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Valencia.

Ahora, conviene hacer un esbozo de sus actividades y exponer las bases científicas y profesionales a que se atiene en la dirección del citado laboratorio hospitalario. Ello está claramente expresado en un texto oficial internacional: La monografía de la Organización Mundial de la Salud, serie informes técnicos, n.º 161 y que lleva por título: "El Servicio de Laboratorio en el Hospital". En él se precisan las funciones y las recomendaciones que deben regirlos, bajo el epígrafe siguiente:

Definición y funciones

Los laboratorios de hospitales prestan servicios clínicos que consisten en aplicar los conocimientos y las técnicas de las ciencias fundamentales al diagnóstico, pronóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades. Las esferas en que trabajan son: La Bioquímica, la Hematología, la Microbiología y la Inmunología. Para el mejor cumplimiento de su misión primordial, deben concebir todo su trabajo en función del interés superior del enfermo. El médico biólogo, no es sólo el especialista en el Hospital de las citadas ciencias básicas, debe también desempeñar la importante misión de consultor del médico de cabecera, coordinando el conjunto de datos por él obtenidos, con el cuadro clínico del enfermo. Así pues, continúa la misma

publicación, la misión de un Laboratorio de Hospital se puede resumir en las cinco proposiciones que siguen:

1.º *Facilitar a los clínicos los resultados completos y exactos de los análisis.* Sobre estos extremos, hay que resaltar que además del conocimiento y con la experiencia debida de las técnicas a utilizar, es obligado y de toda necesidad que todo ello vaya unido a la introducción de testigos de valor conocido (control interno) y otros testigos de muestras desconocidas (control externo). De esa manera, el laboratorio puede conocer si sus técnicas y material empleado son los adecuados, llegando a conseguir la precisión y exactitud requerida.

2.º *Discutir con los clínicos los métodos científicos particularmente indicados para las necesidades del paciente.* Este cambio de impresiones es altamente recomendable en los casos difíciles de sintomatología imprecisa, donde se mezcla el proceso clínico y los cambios que pueden aparecer por circunstancias del tiempo de evolución, terapéuticas en aplicación y variables socioeconómicas que puedan interferirlo. Esto lleva tiempo, ciertamente, pero son de un valor inestimable las sesiones clínicas que permiten ese intercambio de puntos de vista en bien del enfermo. En realidad, es una parte de la exploración clínica.

3.º *Formar personal técnico de todas las categorías.* Esta fase de su actividad, debe calificarse de muy meritoria. Desde hace más de veinte años, se han realizado Cursos de Iniciación de Análisis Clínicos, siempre muy concurridos. Se recibe, en lo posible, a los alumnos de Medicina que muestran más inclinación a estos trabajos, iniciándoles en las técnicas más corrientes de toma de muestras y de análisis sencillos pero muy estimados. También se les agrega a los turnos de los Servicios de Guardia, con la finalidad principal de que tengan posibilidad de ver y conocer cómo resolver las dramáticas situaciones que este servicio suele conllevar. Es de señalar su contribución a la formación de postgraduados y Médicos Internos Residentes (MIR). Ha dirigido, hasta el momento, 17 Tesis y 5 tesis para el grado de Doctor.

4.º *Realizar investigaciones.* A estos extremos, se recomienda que se haga investigación científica y se califica por la "OMS" como labor inexcusable y se recomienda que el volumen de trabajo corriente o de rutina a realizar, no sea tan abundante que no deje tiempo al personal técnico para esta actividad.

Sobre esta parte de su trabajo científico, el Académico recipiendario efectúa una labor seria y continuada en sus treinta años de post-graduado, avalada por la publicación de más de 200 trabajos originales. En la asistencia a la mayoría de los Congresos Nacionales de la Asociación Española de Biopatología Clínica (en terminología anglosajona) o de Análisis Clínicos (en la latina), que está recogida como tal en las especialidades médicas oficiales. Igualmente ha concurrido con sus trabajos a Congresos Internacionales y ha publicado dos libros, uno sobre "Leptospiras de las aguas" (1959) y otro sobre "Virus filtrables" (1965). Se le cita en el Tratado de Medicina Interna de Farreras-Rozman y en el de Medicina Preventiva y Social de Piédrola.

Actualmente, continúa investigando con Virus, utilizando las modernas técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales y enzimoimmunoabsorción (ELISA), aplicadas principalmente a los Citomegalovirus, Herpes, Coxsackie y Respiratorio Sincitial. Estas técnicas permiten un diagnóstico precoz mediante la detección de Inmunoglobulinas M específicas en la fase aguda de la enfermedad.

En el presente discurso se ocupa de la aplicación clínica de estas técnicas rápidas al diagnóstico de enfermedades respiratorias y enfermedades de transmisión sexual. Estudia 9 casos de infección por virus respiratorio sincitial y 3 casos de infección por citomegalovirus. En estos últimos, dedica especial atención a la presencia de anticuerpos IgM anti-citomegalovirus, como manifestación de la multiplicación "In vivo" del virus.

5.º *Adaptar al laboratorio médico los descubrimientos de las Ciencias fundamentales.* En este aspecto, nuestro nuevo Académico ha asumido siempre, prontamente, las novedades científicas y técnicas dentro de las posibilidades que le deparaban los

colaboradores y créditos con que podía contar. Por ello, el laboratorio que dirige dispone ahora del aparataje conveniente para el mayor número de pacientes que debe atender, que se ha decuplicado en relación de lo que allí se hacía hace 20 años. No ha descuidado tampoco tener una unidad especialmente dedicada a las urgencias que se presentan y que funciona las 24 horas del día. Los detalles del funcionamiento de esta unidad especial son conocidos por todos, por lo que no es necesaria una mayor explicación.

Procede, ahora, dar por terminado este discurso. Sólo me resta agradecer a todos los oyentes la amable simpatía con que me han escuchado.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO ILMO. SR. DR. D. V. SANCHIS-BAYARRI VALLANT	7
I. Introducción	10
II. Técnicas rápidas	14
1. Técnicas de anticuerpos fluorescentes (TAF)	15
2. Técnicas de Inmunoanálisis	19
III. Aplicaciones clínicas	20
1. Enfermedades respiratorias	20
2. Enfermedades de transmisión sexual	24
IV. Aportaciones personales	29
A) Virus Respiratorio Sinclial	30
B) Citomegalovirus	38
V. Conclusiones	45
VI. Bibliografía	47
DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO ILMO. SR. DR. D. V. SANCHIS-BAYARRI LAHOZ	51

*Se terminó de imprimir
en Artes Gráficas Soler, S. A.,
de la ciudad de Valencia,
el 15 de septiembre de 1988*