

XI

DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES A VIRUS:  
PANORÁMICA ACTUAL

PROF. DR. D. ANTONIO GARRIDO CONTRERAS

*Catedrático de Microbiología  
Facultad de Veterinaria (Córdoba)*



Excmo. Sr. D. Benito Mateos-Nevado,  
Ilmos. Sres., Colegas, Señoras y Señores:

Cuando, en pasadas fechas, el Jefe de la Sección Técnica de este Ilustre Colegio me invitó como conferenciante a estas magníficas sesiones científicas, no dudé en proponerle temas relacionados con la ciencia virológica -con la virología- por su indudable interés y actualidad como bien avalan las razones siguientes:

a) El posible papel de los virus en la génesis de los procesos cancerosos humanos, ya demostrado en numerosos tumores animales -papiomas, poliomas, fibromas, sarcomas y procesos leucóticos- y en vías de esclarecerse en las afecciones oncógenas del hombre. En este sentido, la teoría viral del cáncer ha adquirido especial interés con la aparición de la biología molecular, de la citogenética y del concepto de virus como fuente de ácidos nucleicos capaces de transmitir a la célula una nueva información genética.

b) El importante material que representan algunos virus -bacteriófagos- por su fácil manejo:

- En el estudio de los mecanismos de acción patógena de los virus animales. Con ellos es posible analizar las distintas fases de la infección celular, desde la adhesión y penetración del virus en la célula, hasta la replicación de su ácido nucleico y posterior liberación de los viriones neoformados.
- Diferenciando especies bacterianas, mediante fenómenos de lisotipia, que tanto ayudan en la tipificación de brucelas, estafilococos, enterobacteriaceas, etc.

- Explicando problemas genéticos a nivel celular, dado su parasitismo obligado en la célula viva. En este aspecto, la virología se ha convertido en una rama de la genética celular.

c) En fitopatología, produciendo en las plantas afecciones generalizadas o lesiones locales en hojas u otras estructuras.

En fin, señores, centralizando más nuestro tema, un gran número de enfermedades infecciosas tienen etiología vírica. Su importancia médico-económica creo que está en el ánimo de todos. Recordemos, entre ellas:

- Afecciones caracterizadas por lesiones de tipo exantemático, como fiebre aftosa, viruelas de mamíferos y aves, exantema vesicular del cerdo, etc.
- Afecciones de las vías respiratorias. Desde enfriamientos banales hasta influencias, neumonías víricas de curso grave y laringotraqueitis.
- Cuadros septicémicos, de gran importancia económica, como pestes del cerdo, peste bovina, peste equina, enfermedad de Newcastle, etc.
- Afecciones del SNC como la rabia, pseudorrabia, encefalitis equinas americanas, etc.

En resumen, el desarrollo considerable de la virología ha supuesto nuevos e importantes conocimientos sobre la aparición, extensión, evolución, profilaxis y espectro patógeno de las enfermedades a virus del hombre y de los animales, lo que obliga a una constante revisión de sus métodos de diagnóstico.

Por todas estas consideraciones, creo plenamente justificado el presente título de esta conferencia que ya, de principio, debemos desglosar en dos aspectos fundamentales: en primer lugar, el diagnóstico directo, que nos conduce a la identificación de un virus; y en segundo lugar, el diagnóstico indirecto que nos demostrará la presencia y nivel orgánico de anticuerpos específicos. Por consiguiente, ambos métodos forman los dos pilares básicos del diagnóstico virológico.

Pero, el diagnóstico virológico comienza con un estudio detenido del cuadro clínico y, si es posible, del anatomopatológico. Así pues, sólo un enfoque correcto de estos dos aspectos a los que se une un conocimiento suficiente de la patogenia de las virosis, permiten que el laboratorio pueda desarrollar sus posibilidades actuales.

De aquí se deduce que el estudio laboratorial debe dirigirse a un virus o grupo de virus entre los que, de acuerdo con la clínica, puede estar el agente patógeno del cuadro que presente el sujeto objeto de diagnóstico.

Por ello, el envío de muestras al laboratorio virológico ha de cumplir los requisitos que, esquemáticamente, exponemos:

- Acompañar una nota en la que se refleje el período de incubación, cronología y estudio clínico de la enfermedad.
- Conocimiento de la patogenia, para recoger la muestra en el momento más adecuado.
- Envío rápido y conservación correcta, en la que debe tenerse en cuenta temperatura, pH y humedad. Las soluciones salinas equilibradas -Hanks, Earle, Tyrode, PBS- adicionadas de antibióticos tienen aquí una gran aplicación.

Con estos fundamentos, veamos a continuación los métodos de diagnóstico que ofrecen más novedad e interés.

## DIAGNÓSTICO DIRECTO

Este proceso nos conduce al aislamiento e identificación de un virus y, en casos contados, a su observación microscópica directa a partir de improntas o cortes histológicos de las muestras objeto de estudio. Para mayor claridad de exposición, lo dividimos de la forma siguiente:

### I. Técnicas Microscópicas Directas

Con el microscopio óptico -previa coloración de improntas o cortes- es posible poner de manifiesto cuerpos de inclusión, citoplasmáticos o nucleares, específicos de algunas virosis que se interpretan a partir de Hagen (1939) como lesiones de tipo reaccional de la célula frente al virus. Descritos por vez primera en el *molluscum contagiosum* por Henderson (1841) y, posteriormente, bien estudiados por Cowdry (1934), representan una gran ayuda para el diagnóstico rápido de ciertas enfermedades virásicas. Así, son conocidas por todos ustedes las inclusiones de Bollinger -en células epidérmicas- en la viruela aviar; las de Lentz -en linfocitos y conjuntiva- en la enfermedad de Carré; los cuerpos de Negri -en células piramidales del asta de Ammon- en la rabia; los cuerpos de Joest-Degen -en células ganglionares del hipocampo mayor- en la enfermedad de Borna; las inclusiones de Seifried -en el epitelio de la mucosa respiratoria- en la laringotraqueitis aviar, etc.

- Con el microscopio ultravioleta, a partir de los estudios de Coons (1942), marcando los anticuerpos específicos con fluorocromos del tipo del isotiocianato de fluoresceína -sintetizado por Riggs en 1957, se consigue la identificación rápida y directa de un gran número de virus.

En el campo veterinario, es hoy práctica diaria del laboratorio virológico el diagnóstico de la rabia por inmunofluorescencia directa o la diferenciación de los virus pestosos del cerdo, lo que ha supuesto un gran paso en la lucha contra estas importantes virosis.

- Con las limitaciones que suponen su carestía, la microscopía electrónica tiene también gran interés como método de diagnóstico. Mediante la técnica de tinción negativa con el ácido fosfotúngstico, introducida por Horne y col. en 1959, es posible, con gran rapidez, diagnosticar -a partir de lesiones- infecciones por papovavirus, herpesvirus y poxvirus, además de ser un método muy útil en el estudio de muchos virus después de inocularlos a substratos celulares mantenidos en cultivo.

## 2. Aislamiento

Dada la reproducción exclusivamente intracelular de los virus -por su parasitismo obligado- sólo tres sistemas pueden emplearse para intentar su cultivo y, en consecuencia, su aislamiento. A saber, los animales sensibles, el embrión aviar y los sistemas celulares mantenidos *in vitro*.

- La inoculación a animales de laboratorio fue el primer procedimiento empleado para el cultivo de los virus y otros microbios. Posteriormente, la introducción decisiva del embrión aviar y de los cultivos celulares y los inconvenientes que representan su carestía, las infecciones latentes, la presencia de anticuerpos y la falta de homogeneidad de los lotes, han restado eficacia a su empleo, con algunas excepciones como son la necesidad de acudir a los ratones lactantes en el diagnóstico biológico de la rabia y en el estudio de algunos picornavirus o el empleo de monos en la experimentación con los virus polio y de la fiebre amarilla.

- Con los antecedentes de los trabajos de Levaditi (1906) y de Rous y Murphy (1911), el descubrimiento de Goodpasture y Woodruff en 1931, de la capacidad de un gran número de virus para reproducirse en el embrión de pollo, supuso para la virología un progreso formidable al disponerse de un hospedador barato, de cómodo manejo, aislado del exterior, teóricamente estéril, fuente de material para la preparación de vacunas y sus-

ceptible de interpretación de lesiones que, en algunos casos, son de valor diagnóstico y permiten la identificación del agente en cuestión.

El desarrollo de los cultivos celulares ha disminuido, en parte, el empleo del embrión aviar, pero sigue siendo indispensable para el aislamiento y estudio de mixovirus, paramixovirus, poxvirus y herpesvirus y en la elaboración de una amplia gama de vacunas avianizadas que tanto contribuyen a la erradicación y control de numerosas virosis animales.

- Desde los estudios decisivos de Enders, Weller y Robbins (1950), en los que se demostraba la reproducción del virus poliomiélfico en substratos de células, los cultivos celulares representan el método más reciente y perfecto para conseguir el aislamiento y la identificación de un virus. Es también, desde su prodigiosa aparición en el laboratorio virológico, el que ha permitido el vertiginoso desarrollo de la virología contribuyendo de manera decisiva al descubrimiento de nuevos virus, perfeccionamiento de la sistemática vírica, a la elaboración de vacunas y antígenos, producción de interferon y estudio de los fenómenos de interferencia, cancerología, genética vírica y celular, etc.

En cuanto al estudio de un virus -con vistas al diagnóstico-, en estos sistemas no supone -como puede creerse- la necesidad de laboratorios superdotados mantenidos por importantes presupuestos económicos. Por tanto, si en épocas pasadas era sólo viable a algunos centros muy especializados, privando al laboratorio de diagnóstico modesto de este importante método de investigación y trabajo, en la hora actual asistimos -como escribe Goret- a una verdadera "democratización" de las técnicas que nos permiten profetizar un espléndido porvenir para la investigación virológica, asegurado también por las grandes casas comerciales especializadas en el suministro de tubos de células, de medios de crecimiento liofilizados, de soluciones salinas equilibradas, vitaminas, sueros, etc.

Esquemáticamente, la identificación de un virus en un cultivo celular lleva consigo la preparación previa de dicho substrato, la siembra del material problema y el posterior estudio de su fórmula citopática reflejada por el tipo de lesiones que sea capaz de producir en las células parasitadas.

Se utilizan tres clases fundamentales de cultivos celulares:

- 1) Cultivos primarios: células de primera explotación, obtenidos directamente a partir de órganos o tejidos del hombre o animales.

- 2) Líneas celulares o células heteroploides, indefinidamente resembrables.
- 3) Células diploides: cepas de células, es decir, células resembradas un cierto número de veces, hasta su muerte -unos 50 pases.

En todos los casos, mantenidas sobre medios de cultivo sintéticos o semisintéticos, confeccionados a base de aminoácidos, vitaminas, materiales energéticos, suero sanguíneo o extractos embrionarios y soluciones salinas equilibradas, ajustados de un indicador que informe, por su viraje, de la actividad metabólica celular.

La preparación de un cultivo primario supone transformar, mediante la tripsinación en caliente (33°C) o en frío (4°C), el tejido u órgano procedente directamente del animal -testículos, riñón, tiroides, pulmón, etc.- en una suspensión homogénea de células separadas que se colocan en medios de cultivo, se reparten en recipientes -matraces, tubos, cajas de Petri, etc.- donde se sedimentan y adhieren al vidrio, dando lugar a colonias e islotes celulares que al confluir forman el tapiz continuo de células -monoestrato- el cual se mantiene mediante renovaciones periódicas del medio.

Los cultivos primarios tienen gran importancia en el diagnóstico virológico veterinario. Su baratura y su gran espectro de sensibilidad los hace indispensables para el aislamiento y estudio de un gran número de virus: células renales de cerdo para el virus de la PPC; células renales de hurón para el virus de la enfermedad de Carré; células testiculares de ternero o cordero en la viruela ovina; fibroblastos de embrión de pollo en la peste equina; leucocitos de cerdo para el virus de la PPA, células renales de conejo en la mixomatosis, etc.

Tienen algunos inconvenientes, siendo el más importante la presencia accidental de virus latentes que pueden interferir la acción citopática del virus en estudio o, lo que es más grave, dotados de cierta actividad patógena no despreciable si dichos monoestratos se utilizan como fuente de material para la preparación de vacunas. A este propósito, recordemos el drama que supuso, en el cultivo industrial de virus poliomiélico -con vistas a la producción de vacunas-, la existencia en las células renales de un gran porcentaje de monos Rhesus del virus SV-40 -aislado por Sweet y Hilleman en 1960- capaz de producir en el hamster un tumor de tipo polioma, según demostraron Eddy y col. en 1961.

El concepto de línea celular o de células en línea continua, es uno de los más antiguos que ha conocido la técnica de cultivos de células ya que Carrel, en 1913, estableció una línea de fibroblastos de pollo que debía mantenerse hasta 1946. Pero como la inmortalidad celular sólo aparece en un pequeño número de casos, los investigadores se dieron pronto cuenta de que pocos tejidos tenían células capaces de proliferación rápida y que, prácticamente, todos los subcultivos sufrían degeneraciones que conducían a su desaparición. Así, se descubrió la fase I durante la cual la siembra celular era posible y duraba algunos meses, seguida por la fase II, caracterizada por una proliferación abundante de las células, necesitando numerosas resiembras, hasta que finalmente, en fase III, sobreviene el envejecimiento y el cese de la multiplicación celular.

En años sucesivos, un lento trabajo de investigación, en el que sobresalen los nombres de Gey, Earle Y Parker (1936-1953), cristalizó en la confección de medios de cultivo sintéticos y en la puesta en marcha de técnicas finas, como la clonación de células y el estudio de cariotipos, que permitieron la viabilidad celular indefinida, acompañada siempre de caracteres morfológicos y bioquímicos anormales propios de células malignas, lo que hace inadecuados a estos sustratos para la elaboración de vacunas.

El gran interés de las líneas celulares radica en su aplicación diagnóstica y, por su facilidad de mantenimiento, en estudios sobre múltiples aspectos del parasitismo vírico.

Con características intermedias entre las de los dos tipos citados, se encuentran las denominadas células diploides, gracias a los trabajos de Hayflick y Moorhead (1961-1963). Su elaboración parte de cultivos primarios de tejido embrionario humano sembrados hasta los 40-50 pasajes y se caracterizan por una serie de propiedades entre las que destacan: estabilidad en el número de cromosomas -diploidía- e integridad en su morfología, ausencia de toda manifestación oncogénica y de virus latentes y posibilidad, gracias a los métodos de congelación, de una fuente de células, casi ilimitada, que permite asegurar una serie de controles antes de utilizarlas para el cultivo de los virus y la fabricación de vacunas.

Otra ventaja de las células diploides, es su gran espectro de sensibilidad a los virus de la especie. Casi todos los virus humanos pueden ser cultivados sobre células diploides humanas. Por el contrario, los esfuerzos intentados para establecer dichas cepas a partir del mono, cerdo, ternero, ratón y hamster no han tenido la misma suerte ya que los cultivos

no muestran las propiedades fundamentales de estas células. Esperemos, por tanto, que la investigación salve estos inconvenientes y se pueda contar en un futuro próximo con bancos de células diploides para el estudio de los virus animales.

Finalmente, ésta rápida visión de las posibilidades de los cultivos celulares en el diagnóstico de las virosis animales es más que suficiente para afirmar su importancia actual y su porvenir.

### 3. Identificación

Una vez aislado el virus, es preciso identificarlo como perteneciente a un grupo, familia, tipo o cepa, de acuerdo con los sistemas taxonómicos modernos.

No comentaremos, por no encajarlos en el enfoque que hemos dado a esta conferencia, aquellos métodos de investigación virológica de altura que nos conducen a una completa y correcta identificación. Solamente recordemos que el tipo de ácido nucleico, su forma -espiral sencilla o doble, su longitud, peso molecular y contenido en guanina y citosina, forma y estructura de la partícula vírica -simetría, número de capsómeros y presencia de envoltura pericapsidal, tamaño, sensibilidad o resistencia a solventes de lípidos, al calor o a pH ácidos, estabilización catiónica, etc., constituyen una magnífica serie de caracteres físicos, químicos y estructurales necesarios para la perfecta posición de un virus dentro de una sistemática actualizada.

En el diagnóstico práctico, la presencia de un virus y su identificación se pone de manifiesto por distintos procedimientos.

#### 3.1. Efecto citopático

La acción citopatógena de un virus -puesta de manifiesto por vez primera por Robbins, Enders y Weller (1950), trabajando con virus polio- se puede apreciar estudiando las células vivas del cultivo o después de su fijación y coloración. En el primer caso, observando con el microscopio, a pequeños aumentos, el estado de las células en conjunto, cambios de la continuidad del tapiz y modificaciones en cuanto a forma, refringencia y tamaño. En el segundo, mediante cubreobjetos depositados en el fondo de los recipientes de cultivo (tubos de Leighton, tubos Tribulete, etc) y posterior coloración por los métodos usuales. Ambos sistemas, nos con-

ducen a la confección de la fórmula citopática del virus problema y a su inclusión, con aceptable seguridad, en un grupo o familia.

Las lesiones celulares más frecuentes van desde la lisis, más o menos localizada o total del tapiz (arbovirus, mixovirus, picornavirus), hasta la formación de lesiones sincitiales, de aspecto multinucleado (herpesvirus, mixovirus), picnosis nucleares (arbovirus), inclusiones acidófilas o basófilas (poxvirus, adenovirus, herpesvirus), etc. De una manera general, los virus de ADN (desoxiribovirus) se multiplican en el núcleo dando lugar a inclusiones nucleares, mientras que los virus de ARN (ribovirus) se multiplican en el citoplasma y originan la formación de inclusiones especialmente citoplasmáticas.

### 3.2. Hemadsorción

Con este término se designa la adsorción específica de hematíes de diversas especies animales sobre células infectadas por ciertos virus. Descrita, por vez primera, por VOGEL y SHELOKOV en 1957 para un virus gripal, cultivado sobre células de riñón de mono, fue utilizada después para el estudio de los virus de la enfermedad de Newcastle, vacuna, para-influenza-2, sarampión, peste porcina africana, etc.

El interés de esta reacción estriba en su simplicidad, -observación fácil- y en que permite poner de manifiesto rápidamente -muchas veces, antes de que aparezcan lesiones visibles- la presencia de un virus en las células utilizadas para su cultivo.

Como saben ustedes, una importante aplicación de la hemoadsorción en el campo veterinario es su frecuente uso en el diagnóstico de la PPA, desde que Malquist y Hay (1960) y, posteriormente, Sánchez Botija, en nuestro país, pusieran a punto la técnica. Actualmente, la introducción en el diagnóstico de esta enfermedad de los métodos de inmunofluorescencia ha restado valor aplicativo a esta reacción que sólo se utiliza para confirmar casos dudosos con aquellas técnicas.

### 3.3. Hemaglutinación

Descrita por Hirst, McLelland y Hare (1941) en el estudio del virus gripal, se observa también con el de la enfermedad de Newcastle, paramixovirus, arbovirus, enterovirus y poxvirus. Se caracteriza por la propiedad que tienen estos virus de aglutinar a los hematíes de diferentes especies animales y provocar así su sedimentación rápida, dependiente,

necesariamente, de la presencia de hemaglutininas, receptores específicos en los glóbulos rojos, temperatura, pH, etc.

Su importancia radica en que puede utilizarse con finalidad diagnóstica para detectar la presencia y cantidad de un virus mediante su titulación en UH (unidades hemaglutinantes) e identificarlo inhibiendo la reacción mediante un suero específico de referencia.

En el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle, el test de hemaglutinación tiene un importante valor aplicativo desde que Burnett (1942) describiera la propiedad hemaglutinante del virus y lo encontrara capaz de aglutinar los hematíes de hombre, cobaya, ratón, pollo, gorrión y rana. La prueba implica la preparación de diluciones de antígeno vírico, en volúmenes constantes de una suspensión de glóbulos rojos de pollo. Para facilitar el diagnóstico rápido, se han descrito métodos en portaobjetos en los cuales se utiliza solamente una dilución de los reactivos (Walker, 1952, Zargar Y Pomeroy, 1949), pudiendo ser valiosos en las primeras fases de la infección, antes de la aparición de los anticuerpos séricos.

### 3.4. Interferencia

Se define como un fenómeno de aparición rápida, mediante el cual un virus vivo o inactivado impide durante un cierto tiempo el desarrollo de un segundo virus que infecte las células poco después que el primero.

El primer fenómeno de interferencia entre dos virus animales lo observa Magrassi (1935) al conseguir la protección del conejo contra un virus herpético encefalítico por inoculación en la córnea de un virus herpético no neurotrófico. Dos años después, Findlay y Mc Callum protegían monos contra el virus de la fiebre amarilla mediante inoculación del virus de la fiebre del valle del Rift. Estos descubrimientos se coronan con los estudios de Mooser y Lindenmann (1956) y, posteriormente, con los de Isaacs (1957) que conducen al descubrimiento del interferón.

Su importancia diagnóstica se basa en el hecho siguiente: Un virus dado puede ser capaz de multiplicarse en un cultivo celular sin provocar efecto citopatógeno. Un segundo virus puede ejercer, en este mismo sistema, acción citopática visible.

Si estos dos virus se interfieren se puede demostrar la presencia del primer virus.

Una aplicación laboratorial interesante de este fenómeno es la detección de las infecciones leucóticas de las aves mediante el RIF-TEST (Rubin,

1960). Cuando se hacen cultivos de fibroblastos de pollo y se les inocula con virus del sarcoma de Rous (VSR) sufren una transformación morfológica evidente. Normalmente fusiformes, se redondean, proliferan en todas direcciones y forman "focos" muy fáciles de reconocer en la superficie del cultivo, siendo su número proporcional a la cantidad de virus. Ahora bien, cultivos celulares preparados a partir de embriones de pollo procedentes de gallinas leucóticas e inoculados con VSR, no sufren ninguna transformación o bien el número de focos que se forman es mucho menor al que cabría esperar según la dosis inoculada. Por consecuencia, algunas células o todas se han hecho resistentes al VSR. Poseen, según la terminología de Rubin, un "factor inductor de resistencia" al VSR, completamente identificado con el virus de la leucosis linfoide. Sin embargo, la práctica de esta técnica es bastante engorrosa y no podemos considerarla como un método de diagnóstico de la leucosis al alcance de todo laboratorio.

### *3.5. Serología*

También los métodos serológicos pueden ayudar a esclarecer problemas de identificación. La reacción de fijación del complemento -en la tipificación de tipos de virus aftoso-, la precipitación en medios gelificados -en la identificación del virus rábico, virus pestosos del cerdo y virus de la pseudorrabia-, la inmunofluorescencia -en el estudio del virus rábico y de los virus de las pestes del cerdo-, la inhibición de la hemoaglutinación -en la identificación del virus de la enfermedad de Newcastle-, las reacciones de neutralización -para el virus aftoso, bronquitis infecciosa, etc-, la aglutinación -para los virus variólicos-, la inhibición de la hemadsorción y del efecto citopático, la reducción del número de placas, la inhibición metabólica, etc., constituyen técnicas interesantes a las cuales accede el virólogo cuando los métodos directos, propiamente dichos, no son suficientes para asegurar la etiología viral de una enfermedad infecciosa.

## **DIAGNÓSTICO INDIRECTO**

Este tipo de diagnóstico está basado en la demostración de inmunoglobulinas o anticuerpos específicos de un virus en la sangre de un animal enfermo.

Tres son las inmunoglobulinas que pueden estar implicadas en la respuesta orgánica a una virosis: La IgG -7S microglobulina, electroforéticamente lenta-, la IgM -19S macroglobulina, más rápida que la anterior

en su migración electroforética-, ambas presentes en la sangre y fluidos tisulares, y, por otro lado, la IgA-7S microglobulina, con la misma velocidad electroforética que IgG y con papel de anticuerpo sensibilizante de la piel. La primera repuesta a una virosis se caracteriza por la producción de anticuerpos IgM seguida, más tarde, por otra secundaria de inmunoglobulinas IgG, las cuales persisten, en general, durante toda la vida del individuo, teniendo por ello gran importancia en encuestas epizootiológicas, puesto que permiten conocer la distribución geográfica de la enfermedad sin necesidad de aislar el virus.

Algunas pruebas serológicas son más aplicables que otras, dependiendo estrechamente de la virosis que se sospecha y del propósito de la prueba y, desde luego, teniendo siempre presente la existencia de fenómenos inespecíficos que muchas veces son de difícil interpretación. Pasemos revista a las de uso más corriente en el laboratorio virológico.

### **1. Reacción de fijación del complemento**

De todos es conocido el fundamento de esta bella reacción serológica, en la que los anticuerpos en presencia del antígeno específico tienen la propiedad de fijar el complemento. Al no ser apreciable directamente este fenómeno de lisis, puede hacerse ostensible añadiendo al complejo, en una segunda fase, una suspensión de hematíes sensibilizados por un amboceptor hemolítico. En estas condiciones, la ausencia de hemólisis indica la fijación del complemento al sistema específico (reacción positiva), mientras que su presencia es índice de reacción negativa, ya que el complemento se fijó a la mezcla hemolítica.

Para que tenga valor diagnóstico, deben cumplirse las siguientes condiciones: 1) Calentamiento del suero problema durante 30 minutos a 56°C. 2) Titulación previa del antígeno, complemento, hemolisina y hematíes. 3) Testigos de suero positivo, negativo y de poder anticomplementario. Cuando todas están previstas, nos permite valorar cuantitativamente el título de anticuerpos en un suero, mediante la realización de diluciones progresivas del mismo, que puede definirse por la más alta dilución del mismo, capaz de fijar el 50% del complemento utilizado.

Podemos asegurar que esta reacción serológica se está imponiendo cada día más en el laboratorio virológico. Sus nuevas posibilidades de identificación de antígenos y de anticuerpos, gracias a la mayor precisión de las técnicas y a la introducción de reacciones modificadas -reacción de

fijación indirecta (Rice, 1948), fijación parcial del complemento (Schmidt, 1967), reacción de fijación del complemento coloidal (Geisler, 1958), anti-complemento marcado con fluorocromos (Goldwasser y Shepard, 1958)-, abren nuevos horizontes de estudio que, sin duda, han de beneficiar al diagnóstico de las enfermedades a virus.

## **2. Inhibición de la hemaglutinación**

Cuando se demostró el fenómeno de la hemaglutinación, Hirst (1941-1942), MC CLelland y Hare (1941) comprueban la inhibición de esta reacción en presencia de los anticuerpos antivirales, naciendo así un método cuantitativo simple -aplicable a ciertas virosis- para determinar la presencia y cantidad relativa de anticuerpos específicos en el suero de individuos enfermos o convalecientes.

El antígeno vírico empleado en la reacción debe titularse exactamente mediante HA, determinándose la cantidad de anticuerpos con diluciones crecientes de antígeno y constantes de suero (método alfa) o cantidades fijas de virus y diluciones crecientes de suero (método beta). En todos los casos, debe tenerse en cuenta, para interpretar correctamente los resultados, la presencia de inhibidores inespecíficos en el suero que han de inactivarse -dependiendo de su composición química- mediante calor, tripsina, peryodato, solventes de lípidos, etc.

La reacción de inhibición de la hemaglutinación posee un gran valor aplicativo en la investigación o diagnóstico de mixovirus, paramixovirus y arbovirus.

## **3. Neutralización**

Las pruebas de neutralización (Burnet, 1955, Kjellen, 1957, Dulbecco, 1956) son una medida de la infectividad viral producida por los anticuerpos al impedir la absorción de los virus sobre substratos celulares adecuados (animales, embriones o cultivos celulares).

Existen dos grandes métodos que permiten apreciar la actividad neutralizante de un suero: 1) Suero desconocido a diferentes diluciones frente a una cantidad constante de virus, en el que la acción neutralizante del suero viene reflejada por la dilución más elevada que evita la infección, y 2) Suero desconocido, no diluido, en presencia de cantidades decrecientes de virus en el que la actividad neutralizante se expresa por la reducción del título del virus en el hospedador sensible.

La reacción exige: virus y sueros titulados, recogida y manipulación adecuadas de los dos elementos, precisar dosis y vía, elección del sustrato vivo y estudio estadístico de los datos obtenidos.

La reacción de neutralización posee gran sensibilidad y especificidad, pero como su realización no está ausente de complicaciones su empleo es muy limitado en virología clínica. No obstante, la reducción de] número de placas, la neutralización de la hemoadsorción o del efecto citopático y los tests metabólicos o colorimétricos -métodos todos derivados de la reacción clásica- tienen gran interés en algunos casos particulares.

#### **4. Inmunodifusión**

De todos los métodos de precipitación en medios gelificados, es la técnica de "doble difusión" de Ouchterlony la de mayor aplicación en virología. Esta consiste en la difusión del antígeno y del anticuerpo a través de un gel de agar, colocado sobre una caja de Petri, portaobjetos, etc. La difusión se establece en relación inversa a su peso molecular, precipitando en el punto donde se ponen en contacto y formando una línea visible, susceptible de ser teñida, para resaltar más su presencia. El número de líneas observadas indica, a su vez, el número de sistemas antígeno-anticuerpo diferentes, siendo así posible comparar distintas soluciones antigénicas o sueros inmunes en el mismo soporte.

En el campo del diagnóstico virológico veterinario, las técnicas de inmunodifusión tienen interés en el estudio del virus rábico, virus de la enfermedad de Aujeszky y virus pestosos del cerdo.

#### **5. Inmunofluorescencia.**

Los métodos indirectos de inmunofluorescencia constituyen en estos momentos un procedimiento extraordinariamente sensible y rápido para poner de manifiesto anticuerpos antivíricos o para identificar un determinado antígeno, auxiliándose de sueros antiglobulinas, específicos de especie, conjugados con un fluorocromo.

El fundamento es sencillo: los anticuerpos reaccionan con el antígeno específico poniéndose de manifiesto el complejo, en el microscopio ultravioleta, con la posterior adición del suero antiglobulinas marcado.

Las preparaciones obtenidas por el método indirecto fluorescen con más intensidad que los complejos logrados por vía directa, ya que las an-

tiglobulinas marcadas poseen más puntos de reacción con el anticuerpo -el cual actúa para ellas como antígeno- que éste con el verdadero antígeno. Además, este procedimiento ofrece la ventaja de que la identificación de los antígenos es más sencilla que por el método directo, ya que con este último es necesario emplear toda una serie de conjugados de anticuerpos con especificidad diferente. Por el contrario, con la técnica indirecta un sólo conjugado de suero antiglobulinas de una especie determinada reaccionará con toda clase de anticuerpos presentes en el organismo de los sujetos pertenecientes a esa especie.

Como stock de antígeno viral, se dispone de cubreobjetos con monoestratos celulares infectados con el virus específico para los anticuerpos que se quieren investigar. Una vez fijados, se deposita sobre ellos el suero problema en las diluciones convenientes y se incuban a 37°C., en ambiente húmedo, durante 30-60 minutos. Se lavan 2-3 veces con solución salina tamponada de pH 7,2 para eliminar el suero no reaccionante con el antígeno y se cubre la preparación con el conjugado durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones de lavado. Al examinar estas preparaciones con el microscopio ultravioleta, la fluorescencia nos indicará la presencia de anticuerpos contra el virus en cuestión.

Una aplicación interesante de este método, nos la describen Sánchez Botija, Ordas y González (1969) en la investigación de anticuerpos de la PPA, sobre todo para el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad, de las infecciones subclínicas y de los portadores de virus, donde -según estos autores- la presencia de anticuerpos en el suero coincide, en un porcentaje elevado de cerdos enfermos, con la persistencia del virus en los tejidos por largos periodos de tiempo.

Otra posibilidad de los métodos indirectos de inmunofluorescencia, es la descrita por Goldwasser y Shepard (1958) con el nombre de "coloración anticomplementaria" en la que utilizan un anticomplemento de cobayo marcado con el fluorocromo. En un primer tiempo, los frotis se cubren con una mezcla de suero específico y de complemento. El complejo que se forma -no marcado- se trata después con el conjugado anticobayo.

Las técnicas de inmunofluorescencia son de gran utilidad en el laboratorio virológico para trabajos de investigación y estudio y, en cuanto al diagnóstico, esperamos que en el futuro, cuando se abaraten las posibilidades de adquisición del material microscópico y de reactivos necesarios, se podrá disponer de un magnífico sistema que simplificará de forma evidente la identificación de antígenos y de anticuerpos antimicrobianos.

Concluimos esta rápida visión del estado actual de nuestros conocimientos sobre el diagnóstico de las virosis animales invitando a todos ustedes a que adquieran conciencia de su importancia. Estamos convencidos de que todas las técnicas comentadas son factibles de realizar sin grandes sacrificios económicos. Sólo es necesario una sólida documentación y la firme voluntad de superación en nuestra cotidiana labor científica. Este es nuestro deseo.

Muchas gracias.