

ENFOQUE PRACTICO DEL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES.

Conferencia dictada ante la Sociedad de Bulatría del Uruguay, el 28.7.81.-

CDU 619:616 - 07



MAISONNAVE, J.

D.M.V. MSc.
Técnico del Departamento de Virología
del Centro de Investigaciones Veterinarias
"Miguel C. Rubino",
Casilla de Correo 6577,
Montevideo, Uruguay.-

INTRODUCCION.

Los virus tienen ciertas características biológicas y físicas que los distinguen de los demás microorganismos. Entre los distintos virus existe una gran variabilidad, lo que lleva a exigencias diagnósticas específicas.

Es de suma importancia en las enfermedades virales el diagnóstico precoz y la distribución geográfica de la enfermedad en un país. La única manera de combatir las enfermedades virales es realizando medicina preventiva, ya que no existe ningún específico terapéutico para combatirlas.

El tema es tan amplio que requeriría una serie de conferencias por lo cual será necesario tratarlo superficialmente.

Comenzaré con una breve revisión sobre las características y taxonomía de los virus y luego pasaré a tratar el diagnóstico de las enfermedades virales y su problemática.

DEFINICION DE VIRUS.

Los virus son de los agentes infecciosos más pequeños. Consisten en un genoma de una sola clase de ácido nucleico: ADN o ARN formando el llamado NUCLEO, el cual está encerrado en una capa protectora de proteínas llamada CAPSIDE cuyas subunidades proteicas, visibles por microscopía electrónica, son los CAPSOMEROS. La cápside, además de proteger el ácido nucleico contra enzimas ribo o desoxirribonucleasas y otros agentes físico-químicos, le da especificidad en la unión del virus con los receptores víricos de la membrana citoplasmática de la célula, lo que determina el rango de huéspedes que puede infectar un virus. Existen virus más complejos, como los Poxvirus, cuya cápside consta de más de una capa y además de proteínas, contiene lípidos y carbohidratos codificados por el virus.

Los virus que tienen ENVOLTURA, por fuera de la cápside, adquirida al brotar de la membrana celular citoplasmática o nuclear (según el virus) contienen lípidos y glicoproteínas de origen celular (Figura 1).

Los virus tienen una característica especial que los distingue de los demás microorganismos: el no poder replicarse (multiplicarse) independientemente. Por lo cual dependen de la célula viva necesitando el aparato enzimático de la misma. El ácido nucleico contiene la información genética necesaria para programar a la célula huésped infectada para que sintetice una serie de moléculas requeridas para la formación de la partícula vírica.

REPLICACION.

Esquemáticamente daré algunas pautas de la replicación o multiplicación de los virus. La partícula vírica se une a los receptores víricos de la membrana celular y si tiene envoltura se desprende de ella penetrando sólo la nucleocápside. Una vez dentro de la célula, el ácido nucleico es liberado de su cápside y la información genética específica que contiene es transferida al ARN mensajero (ARNm), proceso llamado TRANSCRIPCIÓN y luego viene el mecanismo llamado TRADUCCIÓN en el cual la información que trae el ARNm resulta en producción de:

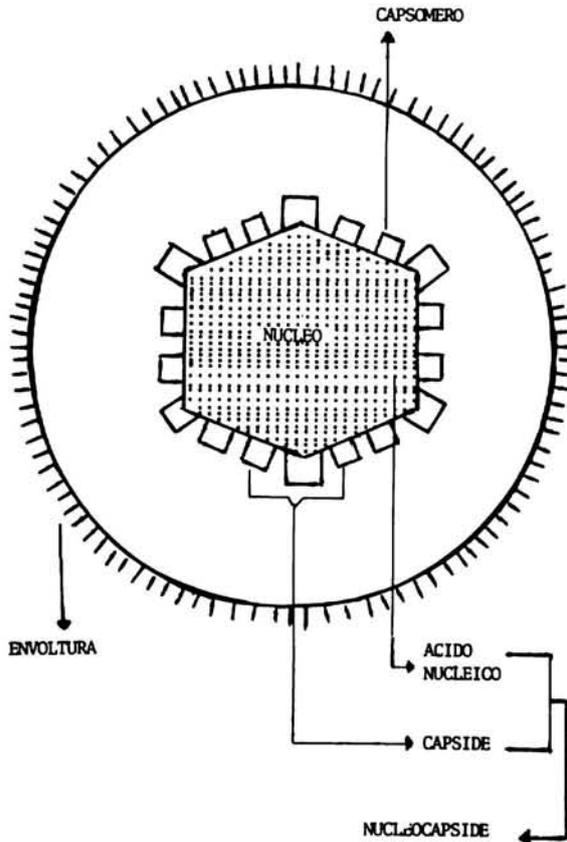
- Secuencia de aminoácidos específica, formando proteína vírica.-
- Acido nucleico vírico.-

El montaje o ENSAMBLADO de las distintas partes para formar una partícula vírica completa se hace en el citoplasma para ciertos virus y para otros en el núcleo. Los virus que tienen envoltura maduran al adquirirla, brotando de la membrana celular (del núcleo o citoplasma según el virus). Dicha membrana celular se ve modificada porque adquiere antígenos virales y esto sirve para que anticuerpos u otros mecanismos de defensa del organismo reconozcan a la célula infectada.

TAXONOMIA (Cuadros 2 y 3).

Los virus se han clasificado según ciertas características físico-químicas (Cuadros 4, 5, 6, 7 y 8) como por ejemplo: tipo de ácido nucleico; tamaño y morfología de la partícula vírica; susceptibilidad a agentes físicos y químicos, en especial el éter.

Figura 1. Estructura esquemática de una partícula viral.-



Hay 6 familias de virus que contienen ADN, todos con el ácido nucleico en cadena doble (DS) salvo los Parvovirus que son de cadena simple (SS); son desnudos, salvo los Herpesvirus e Iridovirus que poseen envoltura.

Hay 10 familias de virus con ARN que son de cadena simple, salvo los Reovirus que son de cadena doble. Todos los virus con ARN tienen envoltura, salvo los Picornavirus y los Reovirus que son desnudos. Existe una gran diferencia en el tamaño de la partícula viral, que va de 26 nanómetros (nm) (Parvovirus) a los 300 nm (Poxvirus). También veremos que existe una diferencia grande en la cantidad de información genética que contienen los distintos virus, que va de 1.5×10^6 de peso molecular del ácido nucleico de los Parvovirus a 160×10^6 de los Poxvirus. Existe más diferencia en la cantidad de información que contienen distintos virus de la que existe entre una célula de un elefante y un ratón.

METODOS DE DIAGNOSTICO VIRICO.

El hecho de que los virus sólo se propaguen en células vivas le da cierta peculiaridad a los métodos de diagnóstico viral.

Haciendo un poquito de historia, cuando se comenzaron a estudiar las enfermedades víricas se utilizaban los propios animales huéspedes, es decir para un virus bovino se usaba inocular terneros y esto tiene todos los inconvenientes que Uds. ya saben.

Luego se comenzó a usar inoculación de animales de laboratorio y más adelante inoculación de huevos embrionados que hoy en día todavía se usa para influenza y algunas enfermedades aviares, como, por ejemplo, actualmente en el CIVET "M.C. Rubino" se utiliza para: Newcastle, Bronquitis, Viruela y Laringotraqueítis.

Un gran adelanto fue cuando se comenzó a utilizar el "cultivo de células vivas in vitro" de distintos órganos y distintas especies animales.

Quadro 2. DNA Virus.-

FAMILIA	SUB-FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Parvoviridae SS DNA		Parvovirus Adeno-Asociados Densovirus	Bovino, suino, felino, canino, leporido Bovino, canino, ave Insectos
Papovaviridae DS DNA		Papilomavirus Polyomavirus	Bovino: PAPILOMATOSIS; Leporido Primate: SV 40; Murido, leporido
Adenoviridae DS DNA		Mastadenovirus Aviadenovirus	Bovino: NEUMONENTERITIS TERNERO; Ovino, suino, equino, humano, canino: HEPATITIS Ave: ENFERMEDAD RESPIRATORIA Y DIARREA
Herpesviridae DS DNA	Alphaherpesvirinae Betaherpesvirinae Gammaherpesvirinae No clasificados		Humano: HERPES SIMPLEX; Bovino: MAMILITIS; Suino: SEUDORRABIA; Equino: ABORTO VIRICO, EXANTEMA COITAL; Felino, canino Murido: CITOMEGALOVIRUS; Humano, suino Humano: VARICELA; Ave: MAREK; Leporido Bovino: IBR, FIEBRE CATARRAL MALIGNA
Iridoviridae DS DNA		Iridovirus	Suino: PPA
Poxviridae DS DNA	Chordopoxvirinae Entomopoxvirinae	Orthopoxvirus Avipoxvirus Capripoxvirus Leporipoxvirus Suipoxvirus Parapoxvirus	Bovino: VIRUELA BOVINA, VACCINIA; Murido: ECTROMELIA; Leporido, humano: VIRUELA, VIRUELA BOVINA Ave Caprino, ovino: LUMPY SKIN DISEASE Leporido: MIXOMA Suino Bovino: ESTOMATITIS PUSTULAR; Ovino; ECTIMA CONTAGIO SA, SEUDOVIRUELA Insecto

Cuadro 4. Virus conteniendo ADN, de simetría cúbica y sin envoltura (Melnick, 1979).-

FAMILIA	GENERO	PESO MOLECULAR DEL ACIDO NUCLEICO	DIAMETRO VIRION (nm)	REACCION AL ETHER	LUGAR ENSAMBLADO CAPSIDE	ENVOLTURA	SIMETRIA DE CAPSIDE
Parvoviridae	Parvovirus	1.5-2.2	18-26	RESISTENTE	NUCLEO	NO	Cúbica
	Virus adeno-asociados						
Papovaviridae	Papilomavirus	2.4-5.0	45-55				
	Polyomavirus						
Adenoviridae	Mastadenovirus	20-30	70-90				
	Aviadenovirus						

La interacción célula-virus puede resultar en cambios visibles o no visibles.

A. Entre los cambios visibles tenemos como ejemplo:

1. Efecto citopático (CPE) (Cuadro 9) en cultivo de células vivas, que representa el daño o muerte de la célula causado por el virus infectante, pudiéndose observar con microscopio óptico invertido.-
2. Transformación celular a célula tumoral por falta de inhibición de contacto entre las células, con

formación de microtumores, producida por los Oncornavirus.-

3. Cuerpos de inclusión, son áreas con alteración de tinción que por lo general son acúmulos de proteínas, ácidos nucleicos o partículas virales. Estos pueden ser acidófilos o basófilos, intranucleares o intracitoplasmáticos y, como ejemplo, tenemos los corpúsculos de Negri en la Rabia y los de Guarneri en Vaccinia que son intracitoplasmáticos acidófilos y los intranucleares basófilos producidos por los Adenovirus.

Cuadro 5. Virus conteniendo ADN con envoltura o cápside compleja (Melnick, 1979).-

FAMILIA	SUB-FAMILIA	GENERO	PESO MOLECULAR DEL ACIDO NUCLEICO	DIAMETRO VIRION (nm)	REACCION AL ETHER	LUGAR ENSAMBLADO CAPSIDE	ENVOLTURA	SIMETRIA CAPSIDE
Herpesviridae	Alfaherpesvirinae		54-92	100	Sensitivo	Núcleo	Envoltura	Cúbica
	Betaherpesvirinae							
	Gamaherpesvirinae							
	Herpesvirus no clasificados							
Iridoviridae		Iridovirus	130	130	Sensitivo	Citoplasma		
Poxviridae	Chordopoxvirinae	Orthopoxvirus	160	300	Resistente	Citoplasma	Capas complejas	Compleja
		Avipoxvirus						
		Capripoxvirus						
		Leporipoxvirus						
		Parapoxvirus						
		Suipoxvirus						

Quadro 6. Virus conteniendo ARN con cápside de simetría cúbica (Melnick, 1979).-

SIMETRÍA CAPSIDE	ENVOLTURA	LUGAR ENSAMBLADO CAPSIDE	REACCIÓN AL ÉTER	DIÁMETRO VIRIÓN (nm)	PESO MOLECULAR DEL ÁCIDO NUCLEICO	GÉNERO	FAMILIA
Cúbica	No	Citoplasma	Resistente o relativamente resistente	24-30	2.5	Enterovirus	Picornaviridae
						Rhinovirus	
						Cardiovirus	
						Aftovirus	
	Sí	Citoplasma	Resistente o relativamente resistente	60-80	12	Orbivirus	Reoviridae
						Reovirus	
						Rotavirus	
			Sensitivo	40-70	4	Alfavirus	Togaviridae
						Rubivirus	
						Pestivirus	
Sensitivo	40-60	3-4	Flavivirus				

B: Entre los cambios no visibles tenemos, por ejemplo:

1. **Modificación de la membrana celular**, cuando el virus brota de ella. Los Orthomyxovirus, Paramyxovirus y Togavirus al brotar de la membrana citoplasmática alteran la superficie de la célula infectada incorporándole proteínas de origen viral que tienen afinidad por eritrocitos. Esta propiedad se usa como base para

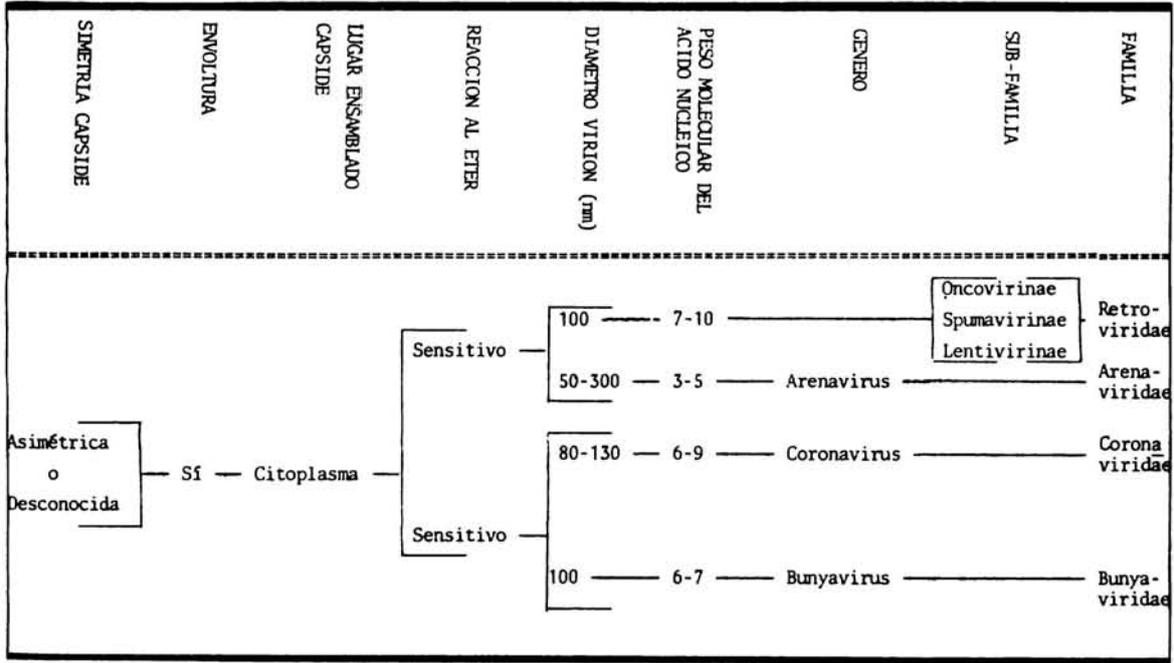
algunas pruebas diagnósticas: hemadsorción y hemaglutinación.

2. **Interferencia** de un virus con otro, al estar infectando ambos una misma célula. Por interferencia uno de los virus no es producido o es producido en pequeñísima cantidad, base de otras pruebas diagnósticas. Las técnicas de laboratorio para diagnóstico viral (Cuadro 10) se pueden dividir, a grandes rasgos, en 2 tipos:

Quadro 7. Virus conteniendo ARN y de simetría helicoidal (Melnick, 1979).-

SIMETRÍA CAPSIDE	ENVOLTURA	LUGAR ENSAMBLADO CAPSIDE	REACCIÓN AL ÉTER	DIÁMETRO VIRIÓN (nm)	PESO MOLECULAR DEL ÁCIDO NUCLEICO	GÉNERO	FAMILIA
Helicoidal	Sí	Citoplasma	Sensitivo	80-120	4	Influenzavirus	Orthomyxoviridae
				150-300	5-8	Pneumovirus	Paramyxoviridae
						Paramyxovirus	
				150-300	5-8	Morbillivirus	Rhabdoviridae
						Vesiculovirus	
60x180	3-4	Lyssavirus					

Quadro 8. Virus conteniendo ARN con arquitectura asimétrica o desconocida (Melnick, 1979).-



a: **Directas**, como por ejemplo:
Aislamiento en cultivo celular.-
Placas y pocks.-
Todos ellos basados en la lesión que produce el virus.
Microscopía electrónica (visualización directa).-

b: **Indirectas**, como por ejemplo:
Hemaglutinación, hemadsorción.-
Interferencia.-
Una serie de técnicas basadas en reacción antígeno-anticuerpo como: goldifusión, fijación de complemento. ELISA, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo (RIA).-

Hoy en día el cultivo celular en monocapa es uno de los métodos diagnósticos más usado para aislamiento de virus de campo, siendo preferibles los cultivos primarios o de pocos pasajes (3 - 4) por ser más sensibles. Por ejemplo, para el aislamiento de los virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB), Parainfluenza - 3 (PI - 3) y Rinoneumonitis Equina están indicados cultivos celulares, en los primeros pasajes, de riñón y pulmón de feto bovino, que son los que estamos utilizando en el CIVET.

Quadro 9. Tipos de efecto citopático (CPE).-

DAÑO CELULAR	EJEMPLO VIRUS	
CPE	GRANULARES, REDONDEADAS, DESPRENDIMIENTO	IBR (HERPES); ENTEROVIRUS BOV., AFTOSA (PICO); VSV (RHABDO)
	FUSION CELULAS-CEJULA GIGANTE MULTINUCLEADA	MOQUILLO CANINO, PARAINFLUENZA VIRUS SINCITIALES (virus bovino resp. sincitial) (PARAMIXOVIRUS)

En bacteriología, sembrando en agar sangre, se detectan un gran número de bacterias y el resultado puede obtenerse relativamente rápido, lo cual no es posible trabajarlo con virus, pues tenemos más dificultades debido a:

A. **La gran diferencia que existe entre los distintos virus**, al ser tan distintos entre sí, muchas veces requieren condiciones especiales de diagnóstico.-

B. **Contaminación de las muestras clínicas** que destruyen los cultivos celulares en los cuales inoculamos el material enviado, por lo que se recomienda usar antibióticos en los materiales remitidos para aislamiento viral. El uso de antibióticos ayuda muchas veces a controlar la contaminación pero no siempre es suficiente, por lo que debemos recurrir a otros procedimientos como, por ejemplo, el esterilizado por filtración.-

C. **Adaptación de cepas de virus de campo a condiciones de crecimiento in vitro:**

Muy a menudo sucede que las cepas de virus de campo no resultan citopatógenicas desde un principio para los cultivos celulares, por lo que a veces requieren varios pasajes, para adaptarse a condiciones in vitro de crecimiento; cada uno de estos pasajes lleva de 6 a 10 días, según los virus. Si en su tercer pasaje el material sospechoso de contener virus no produjo efecto citopático, se hace una tinción de las células inoculadas con anticuerpo específico conjugado con isotiocianato de fluoresceína para el virus que se sospecha, en especial de virus que tienen cepas no citopatógenicas como el DVB. Si esta prueba también resulta negativa, se considera que el material enviado no contiene virus. Si el material inoculado produce efecto citopático en el cultivo celular, se debe proceder a la identificación de dicho agente. La manera más corriente y práctica de identificar es por seroneutralización e inmunofluorescencia.

En cuanto a las enfermedades virales de grandes animales, en la actualidad en el CIVET estamos en condi-

Cuadro 10. Tests para diagnóstico viral.-

TEST	CARACTERISTICA	EJEMPLO
HEMAGLUTINACION Y HEMADSORCION	AGLUTINACION Y ADHERENCIA ERITR.	RUBEOLA (TOGA); INFLUENZA, PI, NDV (PARAM); PPA (IRID)
INTERFERENCIA	CEPAS NC CON CEPAS CITOPATOGENICAS	RUBEOLA, NC-BVDV (TOGA)
MICROSCOPIA ELECTRONICA	VIZUALIZACION DIRECTA PART. VIRAL	VARIOS VIRUS
GELDIFUSION	LINEA PRECIPITACION Ag-Ac EN AGAR	PPC (TOGA); RINDERPEST (PARAM)
FIJACION C'	FIJACION C' CON Ag-Ac PRESENTE	AFTOSA (PICORNA)
INOCULACION CULTIVO CELULAR	CPE	VARIOS VIRUS
PLACAS Y POCKS	CPE DIFUSION LIM. POR AGAR; POCKS (MEM: CORIOALANTOIDEA)	VARIOS VIRUS POXVIRUS
ELISA	COLORIMETRIA Ag-Ac UNIDO A ENZIMA O FLUORESCENCIA	ROTAVIRUS (REO); ENTEROVIRUS (PICORNA)
INMUNO-FLUORESCENCIA	"	VARIOS VIRUS
RADIOINMUNO ENSAYO	Ag MARCADO RADIO-ACTIVO COMPITE CON Ag ESTUDIO POR Ac	VARIOS VIRUS

ciones de realizar el aislamiento practicamente de cualquier virus y la identificación de los virus bovinos de IBR y DVB, y de los porcinos de Peste Porcina Clásica y Peste Porcina Africana. Si se trata de la identificación de algún otro virus, se requiere más tiempo para poder obtener los reactivos necesarios.-

D. También tenemos los problemas inherentes a la realización de cultivos celulares primarios, como ser:

Obtención de órganos de animales sanos y la adaptación de dichas células a condiciones de crecimiento *in vitro*.-

Obtención de suero bovino apto para el crecimiento de las células, debido a que ciertos sueros resultan tóxicos.

Conseguir y mantener la esterilidad de los medios de cultivo y material a utilizar.-

Las células de cultivo primario crecen mejor y más parejas en superficie plástica que en vidrio, pero el alto costo en nuestro país de los materiales de plástico des-

chables para citocultivo, no nos permite su uso rutinario. Con líneas celulares se pueden obviar algunos de estos problemas, pero la gran mayoría de las líneas celulares bovinas, por lo menos en los Estados Unidos de América, están contaminadas persistentemente con virus no citopático de la Diarrea Viral Bovina, lo cual las hace inadecuadas para aislamientos y cualquier estudio que se quiera hacer con el virus de la Diarrea Viral Bovina.

El método indirecto más usado para decir que estamos frente a determinado proceso vírico, además de inmunofluorescencia, es el estudio de la curva de anticuerpos realizando la titulación de anticuerpos por la prueba de seroneutralización en pares de muestras de suero del mismo animal problema, tomadas una en el período agudo de la enfermedad y la otra 2 a 3 semanas más tarde. Actualmente el CIVET está en condiciones de realizar el estudio de curvas de anticuerpos para IBR y a corto plazo para DVB.

Por todo lo dicho hasta el momento podemos ver claramente que es difícil obtener un diagnóstico vírico en pocos días como muchos pretenden.

COLECCION Y REMISION DE MATERIALES PARA AISLAMIENTO VIRAL (Cuadro 11).

Para aislamiento viral se requieren materiales frescos colectados en el estado agudo de la enfermedad, cuando el animal muestra síntomas. Los materiales deben ser colectados en condiciones asépticas y NO se les debe agregar preservativos ni fijadores, pero SI antibióticos. Los materiales se deben congelar o refrigerar enseguida que son colectados y deben ser enviados inmediatamente. Lo ideal sería usar como refrigerante hielo seco; si se utiliza este hielo el material debe ser colocado en recipientes de

tapa rosca o herméticamente cerrados para evitar que el CO₂ que se libera del hielo seco entre en contacto con la muestra, ya que puede ser perjudicial para los virus. Hielo común en heladeras de espumaplast también es apropiado. Los hisopos se deben enviar refrigerados, sumergidos en medios como Hanks' o caldo fosfato triptosa al 10 - 20^o/o con antibióticos (penicilina 500 U/ml. y estreptomycin 500 µg/ml.) (dichos medios puede proveerlos el CIVET).

Las muestras de suero para el estudio de curva de anticuerpos, se deben mandar bien identificadas y deben ser una del período agudo de la enfermedad y otra 2 a 3 semanas más tarde.

Cuadro 11. Guía para colección especímenes para aislamiento vírico.-

VIRUS	ESPECIMENES PREFERIDOS
IBR	HISOPOS: NASAL, OCULAR, VAGINAL PULMON, RIÑON, HIGADO, RIÑON FETAL
DVB	HISOPOS: NASAL, RECTAL, BAZO, GANGLIO, INTESTINO, CAPA FLOGISTICA, TEJIDOS FETALES
PI-3	HISOPO NASAL, PULMON
FIEBRE CATARRAL MALIGNA	TIROIDES
ENTEROVIRUS BOVINO	HISOPOS: RECTAL Y NASAL
ADENOVIRUS BOVINO	HISOPOS: NASAL Y RECTAL
PPC	AMIGDALA, BAZO, GANGLIO
GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DEL CERDO	INTESTINO
RINONEUMONITIS EQUINA (HERPESVIRUS)	HISOPO NASAL, HIGADO Y PULMON FETAL

Quisiera hacer énfasis en que las muestras de materiales para aislamiento viral deben ser extraídas cuando el animal muestra síntomas. Si dichas muestras son extraídas pasado el período agudo de la enfermedad, seguramente no se podrá aislar ningún virus, debido a que en esa etapa el animal no está excretando virus.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Fenner, F., Mc Auslan, B.R.; Mirus, C.A.; Sambrook, J.; White, D.O.: The Biology of Animal Viruses. 2nd. ed., Academic Press, New York, 1974.-
2. Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A.: Review of Medical Microbiology 14 th. Edition, 1980.-
3. Melnick, J.L.: Taxonomy of Viruses, 1979. Prog. Med. Virol., 25: 160 - 166, 1979.-
4. Roberts, A.W.; Carter, G.R.: Essentials of Veterinary Virology. Michigan State University Press, 1976.-

5. Rossi, C.R.; Kiesel, G.K.: Microtiter test for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza - 3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhea virus. Appl. Microbiol. 22: 32 - 36, 1971.-
6. Rovozzo, G.C.; Burke, C.N.: A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1973.-
7. Smithies, L.K.; Modderman, E.: BVDV in Commercial FCS and Normal and Aborted Fetuses. Theriogenology 11: 113 - 119, 1979.-

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Carlos Raggiardo por sus valiosas sugerencias en el enfoque del tema.

Aprobado para su publicación 14/10/81