

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA VIRUELA*

DR. ALFRED S. LAZARUS

Director del Instituto Nacional de Salud Pública, Lima, Perú, y consultor en laboratorios de salud pública, Instituto de Asuntos Interamericanos

Las pruebas específicas para el diagnóstico de la viruela han mejorado notablemente durante estos últimos años y en la actualidad prestan gran ayuda al clínico, permitiéndole el diagnóstico específico exacto. Desde que es obvia la importancia que tiene el reconocimiento temprano o precoz de la viruela, las pruebas específicas de laboratorio son de enorme utilidad, especialmente durante los primeros momentos de una epidemia, así como en los casos de áreas en las que la enfermedad no es frecuente y donde la enfermedad se encuentra muy diseminada. Por otro lado, la diferenciación precoz entre viruela y varicela sólo se puede hacer con seguridad mediante las pruebas de laboratorio. Ofrecemos a continuación un cuadro que contiene los procedimientos más importantes usados en la actualidad, el que es una modificación y una ampliación del publicado por van Rooyen y Rhodes. Aunque existen otros métodos que podrían haberse incluido en el referido cuadro, se omiten en esta oportunidad debido principalmente a que aún no han sido empleados con suficiente amplitud como medios auxiliares de diagnóstico.

Expongamos brevemente cada uno de los procedimientos de laboratorio que se mencionan en el cuadro. Por lo demás, se sabe que la mayoría de los asistentes a esta reunión tiene amplia experiencia sobre algunos o todos los métodos que se mencionan, por lo que se suplica tengan la bondad de indicar las omisiones que puedan notar a fin de discutir las oportunamente. Nuestra experiencia personal podría decirse que se refiere con más frecuencia al aspecto negativo, puesto que los servicios de laboratorio bajo nuestra supervisión frecuentemente se han orientado a descartar la posibilidad de la

viruela en casos sospechosos. Por esta razón se piden todos los comentarios que se estimen necesarios, especialmente por parte de aquellas personas que tienen amplia experiencia en casos de viruela.

Durante los primeros momentos del período prodrómico debe tratarse de obtener una muestra de suero en condiciones asépticas. Tales muestras, conservadas en condiciones ordinarias de refrigeración, puede que no se usen en el futuro. Sin embargo, en casos de cualquier prueba serológica especial que se lleve a cabo con posterioridad, tales muestras son inestimables en calidad de control o término de comparación. Todos los que tienen experiencia en los métodos de diagnóstico de laboratorio saben que se obtienen resultados positivos en las pruebas serológicas durante la etapa final de la enfermedad, o en la convalecencia, pero en tales circunstancias no es posible interpretar adecuadamente los resultados si no se dispone de una muestra tomada con anterioridad. El resultado positivo de una sola prueba serológica no es definitivo, ya que se hace necesario verificar un incremento en la presencia de los anticuerpos entre dos muestras tomadas en etapas diferentes de la enfermedad, como evidencia específica de la infección. Por consiguiente, se sugiere a todos aquellos que tienen responsabilidades en este aspecto traten siempre de obtener una muestra de suero durante las primeras fases de la enfermedad en los casos que no se ha llegado a un diagnóstico definitivo.

La observación microscópica de frotis coloreados, preparados durante las primeras fases de la viruela, es un procedimiento sencillo y de gran valor en el diagnóstico. Para esto se desinfecta con acetona o éter el área de la piel que se ha seleccionado, y luego con un escalpelo afilado se raspan aisladamente varias petequias. Debe extenderse

* Trabajo presentado en el Seminario de Vacunación Antivariólica celebrado en Lima, Perú, del 20 al 25 de agosto de 1956.

por separado el material obtenido de cada petequia en láminas porta-objetos, debidamente limpias, usando la hoja del mismo escalpelo. Se pueden hacer en cada lámina varias de tales extensiones, y se recomienda que se separen por lo menos 6 frotis o extensiones de diferentes sitios. Enseguida se deja que las láminas se sequen, cubriéndolas luego con suero fisiológico por espacio de 3 a 5 minutos; se sacan luego al aire libre y se fijan con mezcla de partes iguales de alcohol y éter durante 3 minutos. Las láminas deberán fijarse y secarse lo antes posible después de preparadas. Una vez fijadas y secas, pueden empaquetarse a fin de enviarlas a algún laboratorio central o conservarlas para futuros usos, tales como la enseñanza.

La técnica de Paschen da excelentes resultados en la coloración de los cuerpos elementales de la viruela. De acuerdo con dicha técnica las preparaciones se tratan con una solución mordiente, filtrada, y se calienta suavemente por espacio de 5 a 10 minutos. Luego se las lava en agua, se cubren con una solución filtrada de fuscina fenicada, se calientan y se dejan en reposo durante 10 minutos antes de lavarlas y secarlas. Los pormenores de este procedimiento de coloración se pueden encontrar en cualquier libro de técnicas de laboratorio. También han sido empleadas otras técnicas de coloración, tales como la de Giemsa y la de Morosow, que ofrecen resultados inferiores a la de Paschen.

De acuerdo con nuestra experiencia es necesario tener bastante cuidado en la preparación y filtrado de las dos soluciones que se usan en el colorante de Paschen. Con frecuencia, algunos lotes de fuscina se precipitan, y las partículas del colorante se pueden confundir con los cuerpos elementales, especialmente cuando no se tiene la suficiente experiencia. Por esto se recomienda que cada lote de las soluciones empleadas en este colorante debe ser debidamente rotulado y, una vez verificada la buena calidad de las mismas, no emplearlas con otro fin. Cuando están bien preparadas no se deterioran con el tiempo, y más bien mejoran en calidad.

A la observación microscópica, usando lentes de inmersión al aceite, los cuerpos de Paschen coloreados por este método se presentan como cuerpos elementales de un color rojo intenso. Durante los primeros estudios de la viruela las preparaciones muestran gran número de cuerpos elementales, aislados o en grupos. A diferencia de esto, los cuerpos elementales de la varicela no se colorean bien por este método, son escasos en número y más pequeños que los de la viruela. Puesto que el virus vacuna es microscópicamente indiferenciable del de la viruela, a fin de ganar experiencia y controlar los resultados en la coloración de acuerdo con la técnica de Paschen, se recomienda trabajar simplemente con material procedente de terneras, pues, recordando que el método de Paschen es el procedimiento que en la actualidad se emplea preferentemente para el diagnóstico rápido durante las primeras fases de la viruela, es de suma importancia el cuidado que debe observarse en todos los aspectos o etapas del mismo: preparación de las láminas, fijación, coloración y examen.

En el caso que se tuviera la fortuna de disponer de un microscopio electrónico, las preparaciones pueden hacerse directamente sobre la montura de plástico. Aunque no tenemos experiencia personal con este procedimiento, no cabe duda que el microscopio electrónico ofrece grandes posibilidades en el diagnóstico precoz de la viruela, del mismo modo que en la diferenciación de ésta de la varicela.

Cuando se trata de aislar el virus en embrión de pollo, en cultivo de tejidos o en córnea de conejos, se hará un raspado como en los casos anteriores y el material obtenido en esta forma se suspende en 1 ml. más o menos de suero fisiológico que contenga aproximadamente 500 unidades de penicilina y cantidad igual de estreptomina. Las inoculaciones se harán en estos casos tan pronto como sea posible después de haberse preparado el inóculo.

Para la inoculación de los huevos, es preferible emplear embriones que tengan 11 días de desarrollo. Los huevos, después de exami-

narlos para confirmar la presencia de embriones vivos, se prepararán como en los casos de inoculaciones en la membrana corioalantoica. Del material original que contiene penicilina y estreptomycin, se preparan diluciones al 1/10 y al 1/100 en suero fisiológico. Cada embrión se inoculará con 0,1 ml. de la respectiva suspensión, y de cada dilución deberán inocularse cuando menos 6 huevos, puesto que los resultados nunca son uniformes aun en cepas del virus que tengan ya varios pasajes en el laboratorio. Los huevos inoculados deberán incubarse a 35° C.

A partir de las 72 horas de la inoculación, se abrirá diariamente un huevo de cada dilución. Con todo cuidado se removerá la membrana corioalantoica, se la extenderá en una placa Petri, examinándola contra un fondo oscuro con la ayuda de una lente de mano, en busca de lesiones, las que por lo general, son diferentes de aquellas que se observan en los embriones infectados con virus de vacuna. Al observar lesiones sospechosas en la membrana corioalantoica, deberá confirmarse microscópicamente la presencia de los cuerpos de Paschen antes de emitir un informe positivo. Es relativamente sencillo el pasaje del virus en el embrión de pollo, pero debe tenerse cuidado de inocular siempre un adecuado número de huevos dado que, como se ha dicho, la infección no es uniforme.

La misma técnica puede emplearse con las costras que se obtienen en las últimas fases de la infección. En este caso las costras se molerán convenientemente en un mortero estéril, usando de 1 a 2 ml. de suero fisiológico que contenga penicilina y estreptomycin. Puesto que la contaminación de la superficie de las costras es frecuentemente alta, a manera de precaución se inocularán en la yema 500 unidades adicionales tanto de penicilina como de estreptomycin, con anterioridad a la inoculación de la membrana corioalantoica.

De acuerdo con nuestras informaciones, la técnica del cultivo de tejidos aún no ha sido empleada como un procedimiento de laboratorio en el diagnóstico de la viruela. Sin

embargo, los aquí presentes están bien enterados de este tipo de estudios. Parece completamente factible el empleo de los tubos ordinarios de cultivo, conteniendo, ya sea células dispersas de riñón de mono, o "HeLa cells", para la inoculación directa de las suspensiones ya descritas. Desde luego, la verificación del desarrollo del virus no dependería en estos casos únicamente de la citólisis, sino que requeriría también la observación microscópica de los cuerpos de Paschen. Parece posible llegar a algún método de demostración de la infección con el virus de la viruela basado en el cambio de color de algún indicador, como en el método debido a Youngner y Salk en el cultivo del virus de la poliomiéltis, en cuyo caso también se haría la confirmación de los cuerpos de Paschen por medio de láminas coloreadas.

La prueba de Paul en la córnea de conejo no es muy usada, a pesar de ser sencilla y tener algún valor en el aislamiento del virus. Para esta prueba se anestesia un conejo adulto con éter o por otro medio. No es conveniente anestesiarse directamente el ojo. Para la inoculación en sí, se retiene fijo el ojo en su sitio y se deja caer el inóculo sobre la córnea, inóculo que puede constituir la suspensión ya descrita o el fúido no diluido procedente de las vesículas o las pústulas. En seguida, se escarifica la córnea con la ayuda de un escalpelo o la punta de una aguja hipodérmica, haciéndose tres escarificaciones verticales y tres horizontales. Esta misma operación se repite en el otro ojo del conejo, pero esta vez usando suero fisiológico con la finalidad de controlar posibles infecciones no específicas. Después de la escarificación, se deja libre el ojo y se colocan dos o tres gotas del inóculo en el saco conjuntival. A continuación se cierra el ojo y se frota suavemente el párpado por encima de la córnea. Empleando una lente de mano se observan los ojos del conejo cada 24 horas, en busca de pequeñas lesiones crateriformes a lo largo de las líneas de la escarificación, así como de opacidad en la córnea. Aunque por lo general se requieren 72 horas para obtener resultados positivos, en algunos casos

este lapso puede ser menor. Si se llega a observar lesiones, el ojo deberá ser extraído para, después de fijado, preparar de él cortes histológicos y colorearlos. En los casos positivos podrán observarse los típicos cuerpos de Guarnieri.

La prueba de Paul tiene valor tan sólo en los casos positivos. En este sentido conviene tener en mente que un resultado negativo no desecha la posible presencia de la viruela, ya que numerosos investigadores han obtenido resultados negativos en casos probados de viruela. La razón se desconoce aún, pero probablemente cuando menos el 50 % de casos de viruela ofrecen resultados negativos a la prueba de Paul. Los resultados siempre son negativos con la varicela.

Los procedimientos de laboratorio no considerados hasta aquí comprenden pruebas serológicas de diferentes clases. En dos de éstas, a saber, la de fijación del complemento y la de floculación, es necesario disponer previamente de un suero positivo de alto título para usarlo como anticuerpo. En estos casos el paciente proporciona el antígeno, y el resultado será positivo si el antígeno contiene el virus de la viruela o sustancias solubles producidas por el virus. En una tercera prueba, la inhibición de la hemaglutinación de los eritrocitos, el paciente proporciona el suero.

La preparación de un potente suero hiperinmune para la fijación del complemento se puede hacer en conejos. Con este fin se prepara un antígeno libre de bacterias por medio de pasajes en los testículos de conejo con un intervalo de 4 días. Se extraen asépticamente los testículos y se muelen en una mezcladora Waring con suero fisiológico. De esta suspensión, la que luego se centrifuga a baja velocidad con la finalidad de sedimentar las partículas gruesas, se prepara una suspensión al 10 % en suero fisiológico. Esto constituye el inóculo, el que puede conservarse a una temperatura de 0 a 5°C. hasta el momento de ser usado.

Con el material anterior se inoculan, cada 2 ó 3 días, por espacio de 4 semanas, conejos que se encuentran en la convalecencia de

una infección previa por el virus vacuna. Las inoculaciones comienzan con 1,0 ml. de la suspensión de testículo durante 3 inyecciones de la primera semana, aumentando luego la dosis semanalmente, hasta que las 3 inoculaciones de la cuarta semana sean de 2,5 cc. Después de 10 días de la última inoculación se hará una sangría de prueba, recordando que un buen suero debe tener un título de fijación del complemento cuando menos de 1-32. El título del suero permanece estable de manera indefinida bajo condiciones apropiadas de conservación. Inmediatamente antes de usarlo, el suero debe ser inactivado a 56°C. por espacio de 10 minutos a fin de eliminar la actividad anticomplementaria, termolábil, que suele adquirir en el suero del conejo.

Para la titulación del suero hiperinmune del conejo debe prepararse un antígeno vacuna patrón, el que se usará también como control del material que se usa en la prueba. Este antígeno puede prepararse también de la cepa del virus de vacuna que se ha pasado a través del testículo de conejo, emulsionándolo con una pequeña cantidad de suero fisiológico. El líquido sobrenadante que se obtiene después de la centrifugación se extrae y se seca por liofilización, colocándolo en ampolletas enseguida a fin de evitar la rehidratación. Del mismo modo puede usarse un antígeno dérmico preparado en la piel del conejo. Para emplearlo como control, el polvo se suspende al 1 % en suero fisiológico, el que luego se centrifuga a 1.500 revoluciones durante 15 minutos. También este antígeno, seco y colocado en ampollas, puede conservarse de manera indefinida, pero la respectiva solución deberá prepararse cada vez que va a ser usada.

El antígeno proveniente del paciente consiste en el material que se extrae de las vesículas o pústulas, en pequeña cantidad de suero fisiológico, o de las costras molidas en un mortero con un poco del mismo suero. La prueba en sí puede ser cualquiera de las variantes empleadas en la fijación del complemento. Nosotros preferimos una fijación a 5°C. durante toda la noche, aunque el

método del fijado por espacio de 4 horas tiene la ventaja de proporcionar los resultados con mayor prontitud. Cada laboratorio dedicado a estas labores tiene su método propio, por lo general basado en el horario de trabajo y en otros factores semejantes.

En el procedimiento ordinario de la fijación del complemento se usa tan solo un tubo para el antígeno, debido a la pequeña cantidad del material disponible. Por lo demás, deberán emplearse todos los controles que sean necesarios. Los métodos más recomendados pueden encontrarse en los respectivos textos sobre técnicas de laboratorio.

La fijación del complemento puede también llevarse a cabo en el suero del paciente, en cuyo caso se usa como antígeno una preparación estandarizada de vacuna o de virus de la viruela. En este caso, sin embargo, un sólo resultado positivo no tiene suficiente valor diagnóstico, ya que, como se ha mencionado en párrafos anteriores, se necesita una muestra de suero obtenida con anterioridad a fin de poder comparar los resultados. Para obtener resultados satisfactorios debe verificarse en todo caso una elevación del título de los anticuerpos, razón por la cual se recomendó anteriormente la obtención de una muestra de suero durante las primeras fases de la enfermedad.

La prueba de floculación emplea también el mismo material poco más o menos que la de fijación del complemento, y aunque es más sencilla y rápida, tiene la desventaja de no ser tan sensible ni satisfactoria en sus resultados como la de fijación del complemento. Para la prueba de floculación se prepara un suero hiperinmune como el ya mencionado. El antígeno de control también puede ser preparado como en el caso de la fijación del complemento, usando material del testículo o de la piel, infectado por el virus de la vacuna. La muestra tomada del paciente deberá centrifugarse ligeramente, si es que contiene partículas gruesas. La prueba de floculación se realiza empleando 0,2 ml. de antígeno mezclado con igual cantidad de suero hiperinmune diluido al $\frac{1}{10}$. No debe

dejar de hacerse los controles. Corrientemente, la incubación se efectúa durante toda la noche, a 50°C., después de lo cual se observa si hay o no floculación, valiéndose para ello de una lente de mano. Aunque esta prueba puede también efectuarse en el suero de convalecientes, no siempre ofrece resultados positivos en casos probados de viruela. Parece que la prueba de floculación no es muy sensible, pero tiene la ventaja de su simplicidad. En la actualidad esta prueba no es muy usada.

La inhibición de la aglutinación de los eritrocitos de pollo por el virus de la vacuna en presencia de anticuerpos específicos, ofrece la posibilidad de un método más de diagnóstico de la viruela. No tenemos experiencia personal sobre este particular, ni sabemos que se haya usado con fines diagnósticos, no obstante lo cual parece enteramente posible que este procedimiento pueda ser de utilidad. Podría ser análogo a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, de uso corriente en el estudio del virus de la influenza y de los anticuerpos que éste produce. Desde luego, hace algún tiempo que se conoce la capacidad que tiene el virus de la vacuna de aglutinar los eritrocitos de pollo, del mismo modo que se ha encontrado que el suero de las personas primovacunadas contiene anticuerpos capaces de inhibir tal aglutinación.

En esta prueba se mezcla el suero del paciente con el virus de la vacuna y una suspensión de glóbulos rojos de pollo. La ausencia de aglutinación significa positividad de la prueba. Desde luego, deberán hacerse los debidos controles. También en este caso cualquier resultado positivo tendrá mayor valor si se dispone de una muestra anterior de suero, con la que se podrán efectuar pruebas de comparación. Aunque este método no se presta mucho para el diagnóstico precoz, ofrece las ventajas de su bajo costo y facilidad de ejecución, lo que tiene valor en especial cuando se realizan encuestas retrospectivas o trabajos de investigación.

En este sumario acerca de los métodos de laboratorio disponibles para el diagnóstico

PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA VIRUELA

(Modificación y ampliación adaptadas del "Text Book of Virology" por Van Rooyen y Rhodes)

<i>Día aproximado de la enfermedad</i>	<i>Condición clínica</i>	<i>Muestras necesarias</i>	<i>Prueba</i>	<i>Tiempo requerido</i>
1-3	Dolor de cabeza, escalofríos, fiebre, vómito, etc.	Sangre, si se sospecha una infección por virus	* Separar el suero y conservar	
1-4	Erupción prodrómica, si está presente	Raspaduras del área petequial Suspensión en suero fisiológico del material extraído de las petequias	* Examen microscópico en busca de cuerpos Paschen Láminas coloreadas o microscopio electrónico * Inoculación en embriones de pollo de 11 días o en cultivos de tejido Prueba de Paul en córnea de conejo	1 hora 3 días 3 días
5	Erupción de pápulas	Raspaduras como las de arriba	Pruebas como las de arriba	Tiempos como los de arriba
6-7	Vesículas	Si el fluido no puede ser obtenido, hacer raspaduras de la base de las vesículas Fluido colectado por tubos capilares o con aguja fina y jeringa de tuberculina	* Examen microscópico de láminas coloreadas o microscópico electrónico Pruebas de fijación del complemento si es suficiente el fluido disponible * Aislamiento del virus en huevos o cultivos de tejido. Prueba de Paul	1 hora Durante la noche 3 días 3 días
8-10	Pústulas	Exudado obtenido con aguja y jeringa adecuadas	Fijación del complemento Prueba de floculación Prueba de Paul * Aislamiento del virus	Durante la noche Durante la noche 3 días 3 días
15-20	Costras	Costras	Fijación del complemento o floculación Prueba de Paul * Aislamiento del virus	12 horas a 3 días según la respectiva prueba
30	Convalecencia	Suero	Inhibición de la aglutinación en los hematíes de pollo	2 horas

* Pruebas preferidas.

de la viruela, nos hemos limitado a aquellos que son específicos. Existe, desde luego, una serie de pruebas que no son específicas en las que se emplea ya sea sangre u orina, las que proporcionan informaciones de carácter

pronóstico. Los detalles de tales pruebas, así como el significado que tienen sus resultados, pueden verse en cualquier texto de patología clínica.

Hemos tratado en el presente informe de

ofrecer alguna información sobre cada uno de los métodos seguidos en la actualidad sobre el diagnóstico de la viruela, y en el cuadro se consideran aquellos métodos que estimamos de mayor utilidad. En el diagnóstico precoz, que frecuentemente es lo más importante, la observación microscópica de preparaciones coloreadas es de gran valor y, afortunadamente, de fácil ejecución. Si se utiliza en forma adecuada, esta técnica ofrece resultados definitivos en corto tiempo. El aislamiento del virus de la viruela, a pesar de requerir algunos días, es igualmente sencillo y ofrece confirmación definitiva. En

nuestra opinión, la prueba de Paul tiene escaso valor, pues el método del aislamiento del virus a través del embrión de pollo es mucho más seguro. Las pruebas serológicas no ayudan en el diagnóstico precoz, pero tienen utilidad en el diagnóstico retrospectivo, en encuestas y en trabajos de investigación.

No cabe duda que en el futuro han de descubrirse nuevos y mejores métodos de diagnóstico en este campo. No obstante esto, en la actualidad el laboratorio está en condiciones de ofrecer ayuda en el diagnóstico, permitiendo pronta y segura información sobre la identificación de los casos de viruela.