

REVISIONES

EL PAPEL DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL DIAGNOSTICO VIROLOGICO

1. VIRUS DEL GRUPO HERPES.

HENRY HANSEN,* GONZALO URIBE,** GENARINA ESCOVAR.***

INTRODUCCION

La aplicación rutinaria de la microscopía electrónica en los laboratorios de virología y patología clínica se ha convertido en un método de primera línea para el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por virus. Cada vez se siente más la necesidad de utilizar esta elaborada pieza de equipo costoso en el diagnóstico virológico. Es nuestra intención en este artículo, tratar de definir el papel del microscopio electrónico como arma eficiente en el diagnóstico de importantes infecciones virales humanas. Para alcanzar este propósito será sustentado fundamentalmente por la experiencia de los autores y por una cuidadosa revisión de los avances más recientes en este tema.

TIPOS DE MICROSCOPIOS

El microscopio electrónico de transmisión, con frecuencia descrito como "Microscopio Invertido" por lo que hace referencia con la posición de sus lentes y por contraposición al microscopio de luz de tipo corriente. Consiste

esencialmente en un filamento de tungsteno en forma de "V" que al recibir alto voltaje emite electrones a través de una columna metálica aislada y al vacío; la fuente de electrones es orientada a lo largo de la columna, por una serie de lentes electromagnéticas, para que incida directamente sobre el espécimen que se examina, permitiendo la formación de su imagen, la cual se proyecta sobre una pantalla fluorescente. El equipo requiere que el alto voltaje y la corriente eléctrica sean muy estables; el perfeccionamiento del sistema aumenta en forma directamente proporcional el costo del aparato.

El microscopio electrónico de rastreo (Scanning) tiene en su funcionamiento un parecido con un televisor. Esencialmente requiere el mismo tipo de fuente de electrones del microscopio de transmisión, la cual, una vez enfocada sobre determinada área del espécimen, se permite que recorra, rastree o barra dicha área en la preparación. El barrido se logra mediante la interacción de una serie de alambres electromagnéticos. El resultado es una imagen aumentada

* Profesor Asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Sección Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Actualmente en entrenamiento: Department of Virology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston Texas, 77030, U.S.A.

** Profesor Asistente, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center and Staff Pathologist Veterans Administration Hospital, Medical Center, Houston Texas, 77211, U.S.A.

*** Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Actualmente en entrenamiento: Department of Pathology, M.D. Anderson Hospital and Tumor Research Institute, Texas Medical Center, Houston Texas, 77030, U.S.A.

del objeto o área rastreada, proyectada también sobre una pantalla.

EXAMEN DIRECTO DE ESPECIMENES

Una de las más importantes y primeras aplicaciones diagnósticas del microscopio electrónico en cuanto a la visualización de partículas virales ha sido la detección de viriones en fluido vesicular o material pustuloso obtenido de pacientes con viruela o con varicela-zoster. (1 - 8). En años recientes el microscopio electrónico ha sido usado con frecuencia en la búsqueda de rotavirus en preparaciones de materias fecales de pacientes con gastroenteritis viral (9 - 12). También ha sido posible demostrar partículas virales de tipo Herpes en el líquido cefalo-raquídeo de pacientes con encefalitis herpética y de pacientes con herpes zoster (13). Adicionalmente se ha utilizado para visualizar virus de las paperas en casos de encefalitis (14) y virus respiratorios en secreciones nasofaríngeas. Finalmente no se debe dejar de mencionar la gran utilidad que ha prestado esta poderosa arma diagnóstica en el hallazgo oportuno de citomegalovirus en la orina de infantes con infección congénita y en pacientes inmunosuprimidos. (15 - 17).

El procedimiento de tinción directa de especímenes fluidos para la microscopía electrónica, consiste esencialmente en depositar una gota de la muestra que se va a examinar sobre una superficie de cera previamente preparada en una caja de Petri; sobre este espécimen se coloca una rejilla de cobre para microscopía cubierta previamente con una fina película de colodión a la cual se le ha evaporado carbón en su superficie. La rejilla entra en contacto directo con el espécimen; después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y previniendo la hidratación de la preparación con hidróxido de sodio sólido como agente adsorbente, se remueve la rejilla y se sumerge cuidadosamente en agua destilada estéril. A continuación se coloca la rejilla sobre una gota de ácido fosfotúngstico al 2% durante 15 minutos y se lava nuevamente en agua destilada para remover el exceso de ácido fosfotúngstico. Queda así preparada la muestra para su estudio en el microscopio

electrónico. El procedimiento del examen directo de especímenes fluidos puede ser precedido por la centrifugación lenta de la muestra, con el fin de eliminar el material pesado contaminante, como bacterias y detritos celulares.

Mediante este procedimiento es relativamente simple detectar en heces de pacientes con diarrea: Rotavirus, Enterovirus, Astrovirus, Calicivirus y Coronavirus. La técnica ha sido particularmente útil para realizar un diagnóstico rápido en fluido vesicular de un gran número de pacientes inmunosuprimidos, bien sea por problemas patológicos directos, como leucemias o linfomas, por situaciones iatrogénicas como trasplantes de órganos o por situaciones de terapia anticancerosa intensiva. Usualmente las lesiones vesiculares son causadas por virus *Herpes simplex* y virus de *Varicela-Zoster* (Figura 1). El diagnóstico oportuno de la causa de estas lesiones permite una pronta terapia específica mediante compuestos antivirales o la iniciación de un tratamiento con gamaglobulina hiperinmune para virus de *Herpes-Zoster* en los pacientes afectados o en contactos inmunodeficientes.

Cuando se estudian tejidos, de biopsias o de autopsias, usualmente los especímenes se cortan en forma de pequeños cubos de 1 milímetro de lado y se colocan sobre una placa metálica para facilitar el procedimiento que sigue, de congelación y descongelación y microtomía. Los cortes se montan sobre una rejilla para microscopía electrónica y se colorean con una gota de fosfotungstato de sodio al 2%; el exceso de colorante se remueve con papel de filtro. Usando este procedimiento ha sido posible detectar virus de *Herpes simplex* en biopsias de tejido cerebral de pacientes con encefalitis herpética, permitiendo un tratamiento oportuno. El diagnóstico puede hacerse en cuestión de minutos después de haberse recibido el material de tejido cerebral.

PROCEDIMIENTOS PARA INCREMENTAR LA CAPACIDAD DE VISUALIZACION DE VIRUS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

El examen fructífero de especímenes clínicos mediante microscopía electrónica está limitado por la concentración de par-

tículas virales en la preparación. Se estima que se requieren alrededor de 10^6 a 10^9 partículas virales por mililitro de muestra (18) para que una persona con experiencia en microscopía electrónica pueda visualizar las partículas virales en una preparación.

El hecho de necesitarse altas concentraciones de partículas virales, no obstante ser limitante, ha contribuido al desarrollo de varios procedimientos de concentración: la pseudo-réplica y la ultracentrifugación.

Pseudo-réplica

Esta técnica fue creada por Sharp (19) en 1958 y modificada por Smith y Melnick (20). El procedimiento ha sido ampliamente usado para concentrar Rotavirus en muestras de heces (21, 22). La ilustración esquemática de este procedimiento aparece en la figura 2. El espécimen que se va a examinar se coloca en la parte superior de un bloque de agarosa al 2% y se deja difundir la fase fluída a través del gel hasta permitir la concentración de las partículas virales en la superficie. En seguida se vierte sobre la superficie una gota de colodion al 0,5% y, una vez formada la película, se sumerge el bloque en una solución acuosa al 0,5% de acetato de uranilo; la película se desprende entonces del bloque y se recoge en una rejilla para microscopía electrónica, la cual se fija sobre un pequeño soporte de fibra de vidrio. Finalmente se colorea el espécimen con ácido fosfotúngstico al 2%.

Ultracentrifugación

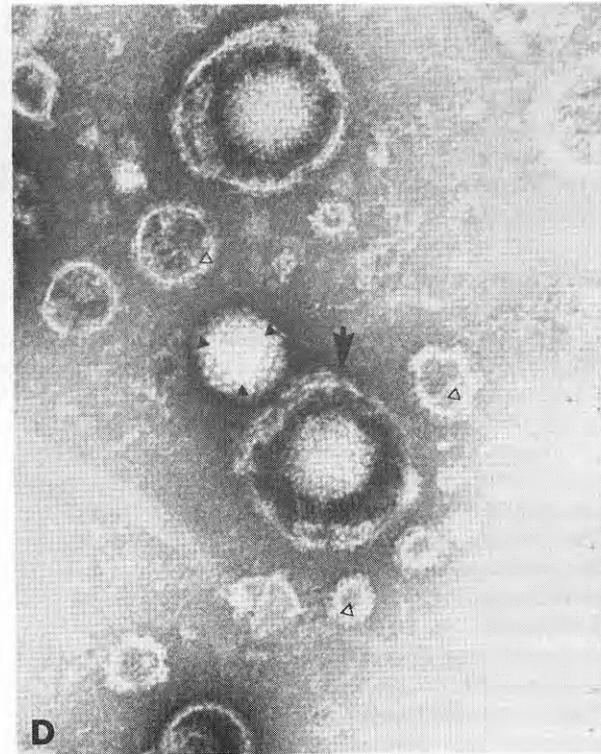
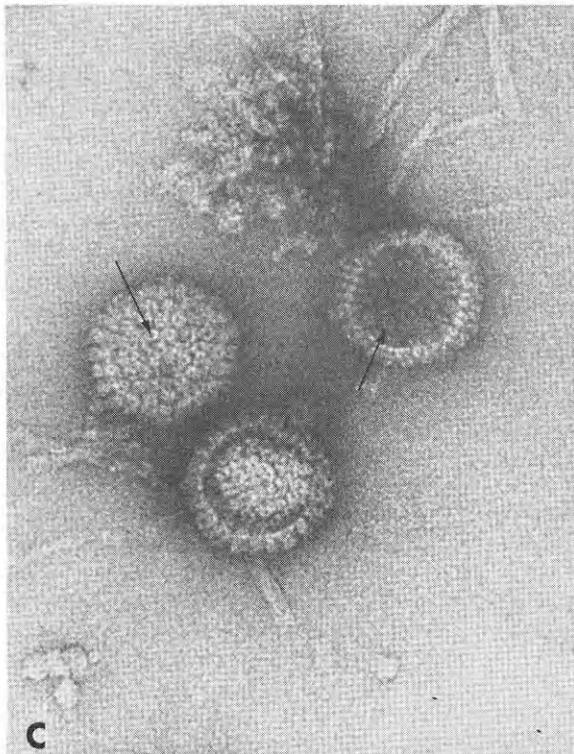
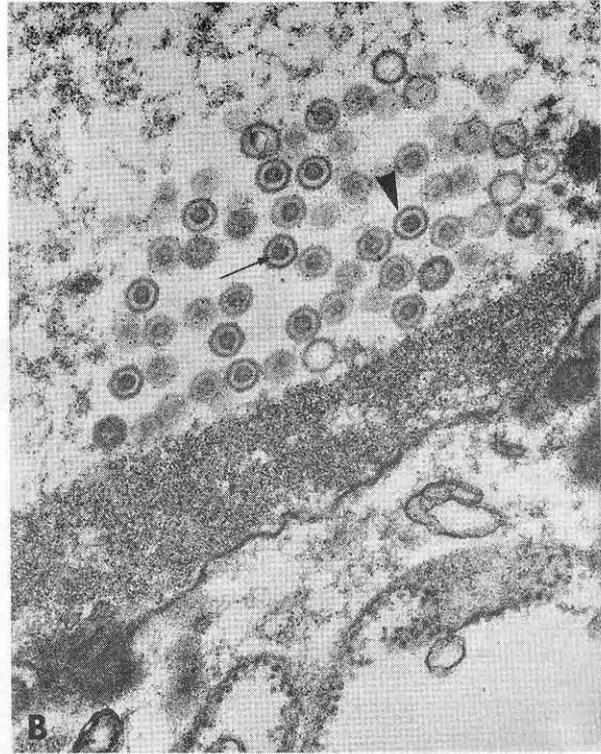
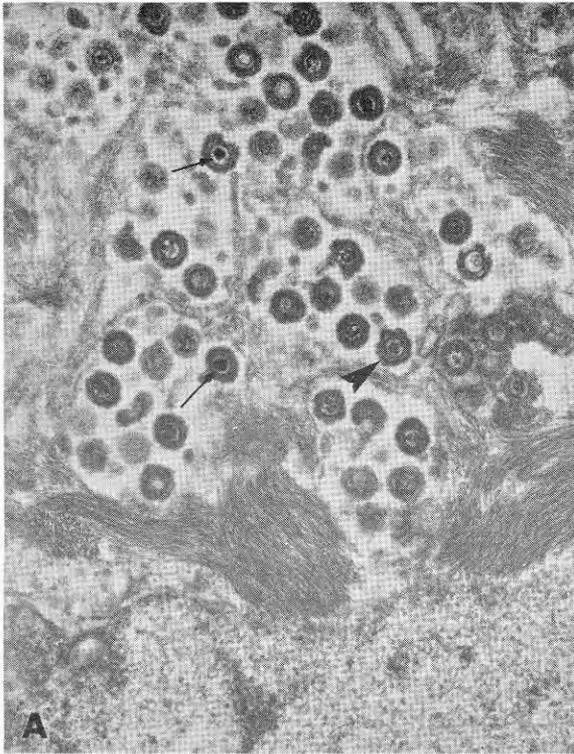
Existen dos procedimientos de ultracentrifugación los cuales son aplicables en el diagnóstico virológico por microscopía electrónica. El primero de estos procedimientos se basa en la propiedad que tienen las partículas virales de flotar en sales de cesio. La técnica consiste en someter la muestra que se va a examinar a un gradiente de flotación por ultracentrifugación en sales de sulfato de cesio. Antes de la preparación del gradiente se requiere homogeneizar la muestra y centrifugarla a baja velocidad utilizando una centrifuga de tipo corriente; 2.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos son generalmente suficientes para

obtener un sobrenadante libre de bacterias y detritos. Después de esta centrifugación se ajusta el índice de refracción del sobrenadante mediante la adición de sal sólida de cesio y se procede a la ultracentrifugación. El índice de refracción deseado y por consiguiente el tipo de gradiente requerido depende de la densidad de las partículas virales que se desean detectar. En el caso de virus con envoltura de lípidos se prefiere preparar un gradiente de sucrosa para concentrarlos según su tamaño y su coeficiente de sedimentación. Lógicamente las partículas se sedimentarán de acuerdo con las concentraciones de sucrosa y el tiempo de centrifugación utilizados. Para el caso de virus desnudos (sin envoltura lipídica), son suficientes 35.000 r.p.m. durante 18 horas para alcanzar el equilibrio por flotación. Cuando se utilizan los gradientes de sucrosa, el tiempo de centrifugación depende de la concentración de sucrosa en el gradiente.

En este procedimiento de ultracentrifugación se utilizan generalmente tubos de nitrocelulosa, de 2 pulgadas de largo por media pulgada de diámetro, adaptables a un rotor de titanio tipo SW (50.1).

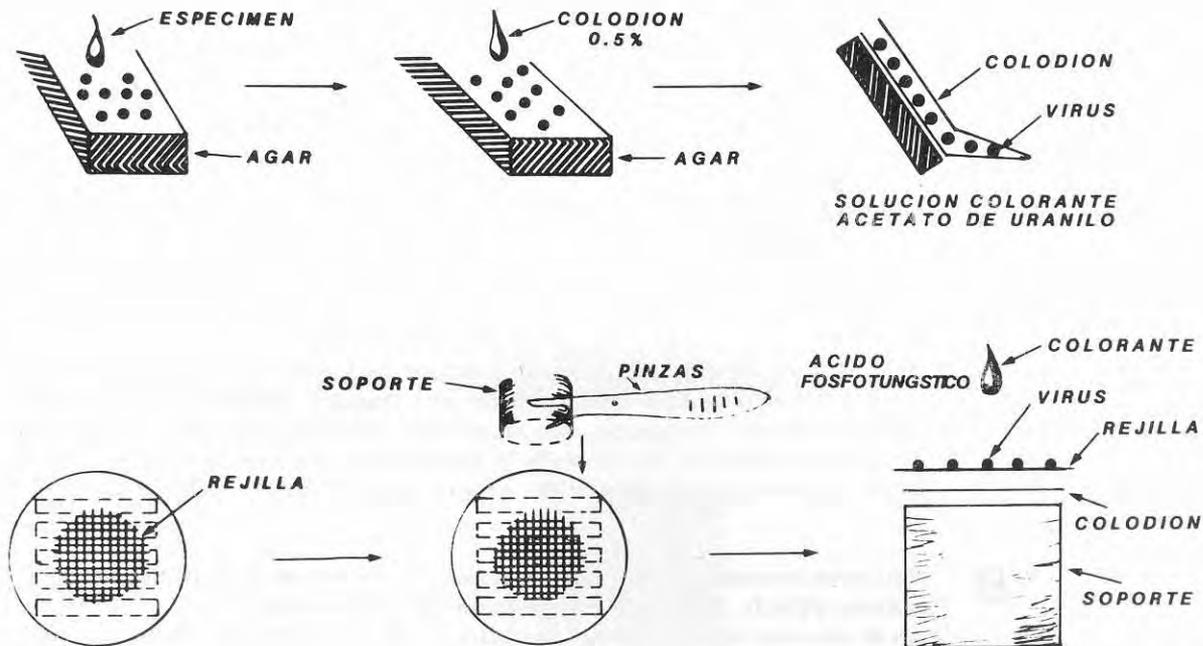
Los virus quedan contenidos en las bandas que origina el gradiente las cuales se observan mediante trans-iluminación del tubo de centrifuga sobre un fondo oscuro o negro. Una vez localizada las posiciones de las bandas se obtiene el material para estudio mediante perforación lateral del tubo y aspiración con una jeringa de tipo tuberculina con aguja calibre 26. El material así obtenido se deposita sobre una rejilla para microscopía previamente cubierta con película de colodión y contrastada con carbón evaporado y se tiñe con alguno de los colorantes utilizados en microscopía electrónica, generalmente ácido fosfotúngstico al 2%. Un aumento de 12.000 diámetros es apropiado para realizar el estudio de localización de las partículas virales.

Recientemente se describió el procedimiento de centrifugación mediante fuerza ultracentrífuga producida por aire a presión, que requiere una centrifuga llamada "air-fuge" (fuga de aire), cuyo principio es similar al de los motores de los aviones de



← FIGURA 1

- A** Partículas de virus de *Herpes simplex* en una célula epitelial de una biopsia del labio inferior de la boca de un paciente con leucemia. Obsérvese el acumulo de partículas virales redondeadas, con un centro o nucleoide electrodenso (→). Se aprecia también en las partículas la presencia de doble envoltura característica de las partículas virales maduras del virus del grupo Herpes. (▶). 37500 X.
- B** Partículas inmaduras de virus de *Herpes simplex* en una célula de cultivo de tejidos (células VERO). Nótese la presencia de un nucleoide electrodenso (→) rodeado de una sola capa o envoltura de lípidos (▶). A diferencia de las partículas maduras se observa un espacio electro-lúcido prominente separando al nucleoide de la envoltura. Nótese que hay numerosas partículas sin nucleoide. 37.500 X.
- C** Partículas de virus de *Herpes simplex* parcialmente purificadas mediante un gradiente homogéneo de sucrosa al 10 o/o. En esta figura se observan los capsómeros característicos de la cápside de este virus. Nótese la presencia de capsómeros huecos, (→). La apariencia morfológica de las partículas es exagonal delineando la estructura icosaédrica de este virus. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2 o/o, 142.000 X.
- D** Partículas de virus *Herpes simplex* detectadas en líquido vesicular, de una lesión bucal de un paciente con Herpes recidivante. Nótese la presencia de partículas completas con envoltura de lípidos (→). Se ven también los capsómeros huecos y una partícula viral desnuda, la cual presenta una estructura icosaédrica característica. (▶). Hay fragmentos de partículas virales. (▷). Tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2 o/o, 132.000 X.



PROCEDIMIENTO DE PSEUDOREPLICA PARA LA CONCENTRACION Y COLORACION DE ESPECIMENS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

turbo-reacción. Los elementos fundamentales de este novedoso procedimiento (Figura 3), están constituidos por el rotor, los sellos o tapas de éste y los tubos de nitrocelulosa, especialmente adaptables al rotor. Los tubos tienen por lo general una capacidad para alojar como máximo 240 microlitros. La velocidad que desarrolla el rotor puede llegar hasta 178.000 g ó 95.000 r.p.m. Esta ventaja tecnológica ha resultado muy útil para detectar en muestras clínicas cualquier tipo de virus, especialmente los virus desnudos, sin que se altere sustancialmente su morfología. El procedimiento incrementa, entre 1,000 y 10.000 veces, sobre el método directo, la posibilidad de detectar virus en las muestras. Se han podido detectar partículas virales en concentraciones tan bajas como 10^4 /mililitro. Conviene anotar que, antes de proceder con la ultracentrifugación, se debe someter el espécimen a una centrifugación a baja velocidad, como se indicó antes.

VIRUS DEL GRUPO HERPES. FAMILIA HERPETOVIRIDAE

Los virus herpes son un grupo heterogéneo (23), que se identifican por su estructura, la cual consiste esencialmente en una parte central densa, o nucleoide, rodeada por una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros huecos, organizados en una simetría axial de 5:3:2. La cápside está rodeada por una membrana o envoltura lipídica que contiene proteínas virales específicas. El DNA de estos virus es de doble hélice. Los varios tipos de este grupo se diferencian considerablemente, por su tamaño (50 a 135×10^6 daltones de peso molecular), por su contenido de citosina y guanina (44 a 74%) y por su complejidad estructural. El DNA de los virus herpes es suficiente para codificar de 80 a 100 proteínas; de las cuales han sido aisladas 50. Por lo menos 30 de estas pueden ser estructurales de la partícula viral, mientras

que otras pueden ser enzimas inducidas por los virus, como la timidinakinasa (TK), la DNA polimerasa y algunas DNA-asas.

Los virus herpes son notables por su habilidad para establecer infecciones latentes y persistentes. Las infecciones latentes pueden permanecer durante toda la vida de los huéspedes, aún en presencia de anticuerpos circulantes. Especial interés se ha

generado en el estudio de este grupo de virus por la asociación del virus de Epstein-Barr con el Linfoma de Burkitt y el Carcinoma Nasofaríngeo y por el papel de los virus herpes genitales (*Herpes simplex tipo 2*) en el cáncer del cuello uterino. Varios virus herpes de simios han mostrado ser oncogénicos en infecciones experimentales de algunas especies animales. Las infecciones por especies heterólogas de virus herpes son, en la mayoría de los casos, muy serias; ejemplos de este fenómeno son: La infección fatal del hombre por uno de los herpes virus simianos, el llamado virus B y la infección del ganado por el virus de la pseudorrabia de los cerdos.

Las enfermedades humanas incluyen el herpes oral y el genital, la Varicela-Zoster, la enfermedad de inclusión citomegálica y la mononucleosis infecciosa. Son numerosos los miembros de la familia herpetoviridae. Sin embargo, hasta la fecha solo se ha reconocido formalmente un género, *Herpesvirus*, del cual el virus *Herpes simplex* es la especie "Tipo". La clasificación de los *Herpesvirus* en subgrupos A y B, basada en el hecho de que los virus se pudieran encontrar libres o asociados a la célula, solo tuvo validez y utilidad antes del advenimiento de la virología molecular.

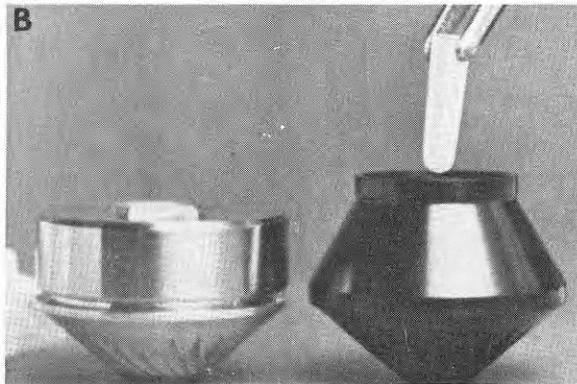


Figura 3. A. Ultracentrífuga tipo "fuga de aire" (air fuge), (A); con sus rotores y el tubo de nitrocelulosa, (B).

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida JD, et al. Morphology of varicella (chickenpox) virus. *Virology* 1962; 16: 353.
2. Cruickshank JG, et al. Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet* 1966; 2: 527.
3. Evans AS, Melnick JL. Electron microscope studies of trevesicle and spinal fluids from a case of herpes zoster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1949; 71: 283.
4. Flewett TH. Some recent contributions form electron microscope laboratories. *Brit. Med. J.* 1972; 1: 667.
5. Nagington J. Electron Microcopy in differential diagnosis of poxvirus infections. *Brit. Med. J.* 1964; 2: 1499.
6. Nagler FPO, Rake G. The use of the electron microscope in diagnosis of variola, vaccinia and varicella. *J. Bact.* 1948; 55: 45.
7. Smith KO, Melnick J L. Recognition and quantitation of herpes-virus particles in human vascular lesions. *Science* 1962; 137: 543.

HENRY HANSEN. GONZALO URIBE. GENARINA ESCOVAR

8. Van Rooyen C E, Scott G D. Smallpox diagnosis with especial reference to electron microscopy. *Can. J. Public Health.* 1948; 39:467.
9. Bishop R F, et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1974; 1:149.
10. Flewett T H, et al. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1497.
11. Kapikian A Z et al. Reovirus-like agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic test. *Science* 1974; 185: 1049.
12. Middleton, P J. et al. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1974; 1: 1241.
13. Doane F W. Identification of virus by immunoelectron microscopy. In: *Viral Immunodiagnosis.* 1974; 237. Academic Press, New York.
14. Doane F W, et al. Rapid laboratory diagnosis of paramyxovirus infections by electron microscopy. *Lancet* 1967; 2: 751.
15. Henry C, et al. Detection of viremia in cytomegalovirus-infected infants by electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.* 1978; 69: 435.
16. Lee F K, et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy. *N. Engl. J. Med.* 1978; 299: 1266.
17. Montplaisis S, et al. Electron microscopy in the rapid diagnosis of cytomegalovirus: Ultrastructural observation and comparison of methods of diagnosis. *J. Infect. Dis.* 1972; 125: 533.
18. Doane F W, et al. Application of electron microscopy to the diagnosis of virus infections. *Can Med. Assoc. J.* 1969; 100: 1043.
19. Smith K O, Melnick J L. A method for staining virus particles and indentifying their nucleic acid type in the electron microscope. *Virology* 1962; 17: 480.
20. Martin M L, et al. Ultrastructure of infantile gastroenteritis virus. *Virology* 1975; 68: 146.
21. Flewett T H, Boxall E. The hunt for viruses in infections of the alimentary system: An immunoelectronmicroscopical approach. *Clin. Gastroenterol.* 1976; 5: 359.
22. Kapikian A Z, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 1972; 10: 1075.
23. Kaplan A S. (ed): *The Herpesviruses.* New York, Academic, 1973.