

Procedimientos de identificación viral en infección respiratoria

J. Aspa* y L. Cardenoso**

*Servicio de Neumología. **Servicio de Microbiología. Hospital de la Princesa. Madrid.

Introducción

Las infecciones virales respiratorias figuran entre las causas más frecuentes de enfermedad. Los niños menores de un año son los más afectados; hasta la edad de 6 años estas infecciones continúan siendo muy frecuentes, aproximadamente 6-7 episodios por año, y van disminuyendo paulatinamente según se alcanza la edad adulta, estimándose entonces una media de 3-4 episodios por año¹.

Más de 200 virus antigénicamente diferentes, pertenecientes a ocho diferentes géneros, se han asociado con infecciones respiratorias en humanos, pero desde el punto de vista clínico las infecciones virales más importantes son las que afectan al tracto respiratorio inferior, y éstas, por sus características, conviene dividir las según afecten a un paciente inmunocompetente o a un paciente inmunosuprimido.

En el paciente inmunocompetente, el diagnóstico etiológico de infección viral suele ser un diagnóstico de exclusión, realizándose en muchas ocasiones a posteriori, al presentar el paciente una seroconversión durante la convalecencia, y su diagnóstico, salvo raras excepciones (*Influenza A*, citomegalovirus), carece de significación práctica, ya que no existe tratamiento efectivo. El virus que en la edad pediátrica tiene especial significado es el sincitial respiratorio (VSR) por tres hechos: es frecuente su presentación como bronquiolitis, se dispone de una técnica de diagnóstico rápido y el tratamiento temprano, con ribavirina aerosolizada, influye en la supervivencia en los casos más graves. No obstante, estudios posteriores no han confirmado este extremo².

Es en el paciente inmunocomprometido donde el problema de la infección viral tiene mayor interés, fundamentalmente en el paciente trasplantado infectado por el citomegalovirus (CMV)³.

Los actores del drama son los siguientes: esta infección tiene una gran morbilidad y mortalidad³. Desde fecha reciente puede tratarse de forma efectiva, si bien el tratamiento es caro y no está exento de graves

complicaciones⁴. Su detección, mediante viremia o lavado broncoalveolar (LBA), permite realizar estrategias preventivas muy eficaces^{5,6}. La única técnica diagnóstica de certeza es la demostración histológica, siendo muy difícil de realizar en este tipo de pacientes. La demostración del virus en el LBA, por sí sola, no es diagnóstica⁷⁻¹⁰. Existen desde fecha reciente nuevas técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de antígenos virales tempranos, hibridación, etc., que pueden ser detectadas en el LBA y cuya significación clínica ha de ser aún correctamente evaluada^{4,8}. Frecuentemente, el clínico tiene que tomar importantes decisiones con información parcial¹¹.

Infecciones virales del tracto respiratorio inferior en pacientes inmunocompetentes

En el paciente inmunocompetente, los virus causan muchas más neumonías en el niño que en el adulto, las neumonías virales se encuadran dentro del síndrome de neumonía atípica; consideramos este diagnóstico ante un cuadro de tos seca o con producción de esputo no purulento, generalmente acompañado de prominentes síntomas extrapulmonares (mialgias, artralgias, dolor de cabeza, rinorrea) y fiebre. En la radiografía de tórax se aprecia un infiltrado pulmonar no lobar y en el examen del esputo encontramos escasos polimorfonucleares y una flora mixta^{12,13}. Además de los virus, muchos organismos pueden producir este cuadro clínico, incluyendo *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella species*, *Rickettsia* (especialmente *Coxiella burnetii*) y *Chlamydia* (*C. psittaci* y *C. pneumoniae*).

En lactantes, el virus sincitial respiratorio (VSR) es la causa principal de infecciones del tracto respiratorio inferior, produciendo cuadros de neumonía y bronquiolitis. Los restantes casos son producidos por el virus *Parainfluenza* tipos 1 y 3 y un pequeño número por *Adenovirus*, *Enterovirus* e *Influenza A* y B (tabla I). En niños son más frecuentes las infecciones del tracto respiratorio superior a las neumonías, siendo los agentes más frecuentes el *Influenza* tipo A y los *Parainfluenza* tipos 1 y 2^{1,2,12-15}.

En adultos, el virus *Influenza* tipo A es la causa más frecuente de neumonía viral entre la población civil, mientras que el *Adenovirus* es el principal agente entre

los campamentos militares, pudiendo producir también casos aislados entre la población civil. Otros virus que pueden producir episodios esporádicos son: *Parainfluenza* tipo 3, *VSR* y *Rhinovirus*. El virus del sarampión puede producir neumonías tanto en niños como en adultos¹²⁻¹⁵.

Los *Herpesvirus* son agentes ubicuos capaces de producir mortalidad y morbilidad tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunosuprimidos. En pacientes no inmunocomprometidos, tanto la varicella como el citomegalovirus (CMV) pueden producir manifestaciones pulmonares¹⁶. La presentación clínica del CMV es extremadamente variable, básicamente están descritos cinco patrones básicos de infección^{17,18}: 1) la forma más común consiste en una infección asintomática que es detectada solamente de forma retrospectiva por cambios en los tests serológicos; 2) la enfermedad congénita por CMV aparece en el 0,5 a 2% de todos los nacimientos, si bien sólo el 10% de los infectados están sintomáticos al nacimiento; 3) el tercer tipo es el que aparece en los pacientes inmunosuprimidos, y será comentado posteriormente; 4) existe otra forma de presentación secundaria a transfusión sanguínea o a *bypass* cardiopulmonar, y es la conocida como "síndrome posperfusión": después de una transfusión, alrededor del 14% de los pacientes están infectados por el CMV y alrededor del 4% desarrollan una enfermedad sintomática, y 5) finalmente, el CMV puede producir espontáneamente en un paciente inmunocompetente un síndrome de mononucleosis, heterófila negativa, con afectación de corazón, pulmones, sangre, piel, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central. Aparece neumonía en el 6% de estos casos. Recientemente, se ha descrito un caso de neumonía por CMV en un paciente inmunocompetente, tratado con ganciclovir, sin adición de gammaglobulina específica, y con respuesta espectacular¹⁹.

Dadas las características de las infecciones virales en pacientes inmunocompetentes, no podemos realizar un diagnóstico etiológico basándonos sólo en la clínica. La epidemiología nos ayuda en ocasiones, así, la historia natural de una epidemia de *Influenza* ha sido descrita en detalle^{20,21}: una epidemia suele presentar un pico de incidencia a las 2-3 semanas y dura aproximadamente 5-6 semanas. Inicialmente, aparece un aumento en las enfermedades respiratorias febriles en la infancia, seguido de un incremento similar en los adultos. Aumenta el número de ingresos hospitalarios por neumonía, *croup* y exacerbaciones de insuficiencia cardíaca congestiva y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Durante los años de grandes epidemias, se asocia un aumento en las tasas de mortalidad. La enfermedad suele afectar al 10-20% de la población, si bien están descritas afectaciones de hasta el 50% en poblaciones seleccionadas.

Los otros virus respiratorios distintos del *Influenza* se encuentran desplazados durante una epidemia, y casi todos los casos de *Influenza-like* que aparecen en medio de una epidemia son causados por infección del virus *Influenza* circulante, haciendo innecesario

un diagnóstico etiológico. No obstante, el diagnóstico viral puede ser necesario en ciertas situaciones¹³, fundamentalmente con fines epidemiológicos.

La neumonía por *Adenovirus* en adultos inmunocompetentes se produce principalmente en campamentos militares y puede ser causada por infección por los serotipos 4, 7, 21, 14 o 3 en orden descendente de frecuencia. También están descritas epidemias de sarampión y neumonías por *Parainfluenza* en campamentos militares¹².

Infecciones virales del tracto respiratorio inferior en pacientes inmunosuprimidos

Como ya se ha comentado, el agente viral más importante, en términos de mortalidad y morbilidad, para el grupo de pacientes inmunosuprimidos y especialmente en aquellos con un déficit de la inmunidad celular es el citomegalovirus. Este virus junto con el herpes simple (VHS) tipos I y II, el virus *varicella-zoster*, el virus Epstein-Barr y el *Herpesvirus* humano tipo VI constituyen el grupo de los *Herpesvirus* humanos. La infección primaria con estos agentes ocurre de forma temprana en la vida, y suele ser subclínica o estar asociada con signos o síntomas autolimitados. Después de la infección primaria, los *Herpesvirus* establecen una infección latente en el huésped para el resto de la vida. La reactivación de esta infección puede ser asintomática como en el caso del CMV o VEB, o puede asociarse con síntomas clínicos como en el *varicella-zoster* y VHS. En los pacientes inmunosuprimidos pueden aparecer severas infecciones por estos virus, tanto por primoinfección como por reactivación.

Aparte del rechazo del injerto, uno de los problemas más significativos que afecta a los receptores de un trasplante de órganos es la infección por CMV³. Este organismo ha sido denominado por Balfour²² como el *troll of transplantation*. La infección por CMV es ubicua entre los receptores de trasplantes de órganos y se asocia con un aumento en la susceptibilidad a la sobreinfección por bacterias, hongos y protozoos, au-

TABLA I
Identificación de virus en 2 series de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad

Agentes	N.º (%) de casos en los que se aisló el virus	
	Niños	Adultos
Virus respiratorio sincitial	92 (36)	5 (5)
<i>Parainfluenza</i> tipo 1	41 (16)	3 (3)
<i>Parainfluenza</i> tipo 3	35 (14)	16 (16)
<i>Adenovirus</i>	25 (10)	0
<i>Enterovirus</i>	21 (8)	1 (1)
<i>Influenza B</i>	14 (5)	14 (14)
<i>Influenza A</i>	12 (5)	29 (29)
<i>Rhinovirus</i>	8 (3)	0
<i>Parainfluenza</i> tipo 2	7 (3)	4 (4)
Citomegalovirus	0	27 (27)
Virus herpes simple	0	1 (1)
Total	255	100

Tomada de Ruben FL. Postgrad Med 1993; 93: 57-64¹⁴.



menta el riesgo de rechazo e incrementa la mortalidad global³. Los receptores seronegativos de donantes seropositivos (infección primaria) son los que presentan mayor riesgo de padecer una enfermedad severa por CMV. Los receptores seropositivos de órganos provenientes de donantes seropositivos o seronegativos también presentan un elevado índice de infección (reactivación o reinfección), pero pocos pacientes presentan una enfermedad severa por CMV³. Quizás donde más extensamente ha sido estudiado este problema es en los pacientes con trasplante de médula ósea (TMO). En este grupo de pacientes, la incidencia de infección por CMV después de un trasplante alogénico varía del 50 al 70%, y aproximadamente un tercio de los pacientes infectados desarrolla neumonía por CMV (CMV-NI)²³. De este modo, un 15% de los pacientes sufre un episodio de CMV-NI, usualmente entre los días 50 a 60 postrasplante. En el TMO autólogo y singénico, la incidencia es mucho menor (1-3%)^{24,25}. Los factores de riesgo fundamentales para desarrollar CMV-NI en los trasplantes alogénicos son²³⁻²⁶: seropositividad al CMV, pacientes con edad elevada, acondicionamiento con irradiación corporal total, haber recibido globulina antitumoral o médula deplecionada de células T, presentar viremia, viremia, CMV en el LBA y presentar enfermedad injerto contra huésped. La infección por CMV es un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Por ello, incluso la presencia del CMV en el LBA, por sí misma, no es diagnóstica de enfermedad pulmonar. El CMV es aislado en un alto porcentaje de pacientes asintomáticos con TMO^{7-10,27}.

Varios estudios^{4,28,29} indican que la cuantificación viral, tanto en lavado como en tejido, no permite distinguir los pacientes en términos de severidad de la enfermedad, y que la carga viral no es predictiva de la evolución. El desarrollo de una respuesta citotóxica de linfocitos T HLA-específica es la respuesta inmune más importante para la protección del huésped frente a una enfermedad severa⁴.

El hecho aislado que distinguía la neumonía por CMV en el paciente con trasplante de médula ósea frente a la neumonía por CMV en los pacientes con trasplantes de órganos sólidos es la gran mortalidad²³. Vidarabina, interferón o altas dosis de aciclovir han sido uniformemente inefectivos, con una supervivencia inferior al 15%. Los trabajos iniciales en los que se combinan ganciclovir y globulina inmune intravenosa (ganciclovir/IVIG) con mejoría de la supervivencia en casos de CMV-NI fueron descritos por Bratanow et al³⁰ y Reed et al³¹. Después, otros centros han publicado sus resultados utilizando este tratamiento⁴. Aunque el mecanismo de acción sea desconocido y los resultados se deriven de estudios no controlados, el uso combinado de ganciclovir/IVIG es el tratamiento recomendado para esta enfermedad⁴.

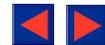
La elección del método óptimo para prevenir la CMV-NI también está sujeta a controversia. La cuestión está en cuál es la mejor opción, tratar de prevenir la reactivación de una infección latente o bien esperar a que la reactivación ocurra y entonces tratar de mo-

dificar el curso de la infección viral. Ambos métodos han sido empleados y ambos tienen sus ventajas y sus inconvenientes. Para prevenir la reactivación se han usado aciclovir, ganciclovir y foscarnet. El aciclovir ha demostrado en dos estudios que retrasa la reactivación del virus y reduce la probabilidad global de infección por CMV y su mortalidad^{32,33}. El ganciclovir ha reducido significativamente la reactivación viral y sus enfermedades asociadas³⁴⁻³⁷. El problema con este planteamiento es que todos los pacientes son tratados, independientemente del riesgo de enfermedad, incrementando el riesgo y el costo. El foscarnet aún se halla en fases I/II de ensayo clínico, y aunque previene la infección por CMV provoca nefrotoxicidad³⁸, si bien tiene la ventaja de no ser mielotóxico, lo que es muy importante sobre todo en TMO.

Otros estudios muestran que la presencia de CMV en sangre⁵ o en pulmones⁶, pero no en faringe, es el mejor predictor del desarrollo de posteriores enfermedades severas. Este tipo de tratamiento en el que primero se detecta la infección para posteriormente iniciar una actuación antes del comienzo de la enfermedad se denomina preventivo. Así, se ha demostrado que el uso de ganciclovir reduce significativamente la infección y la enfermedad y limita el uso de este fármaco aproximadamente a la mitad de los pacientes^{4,5,39}. Sin embargo, este método no está exento de problemas, en primer lugar significa una detección agresiva (se realiza LBA de rutina en pacientes con TMO asintomáticos) y además la reactivación del CMV y el comienzo de la infección pueden ocurrir casi simultáneamente en algunos pacientes. De hecho, en los estudios publicados de este tratamiento preventivo, los fallos han sido debidos a incapacidad para detectar CMV en broncoscopias prospectivas⁵ o a la concurrencia de la detección viral y la enfermedad clínica³⁹; un 20% de los casos de CMV-NI no tiene cultivos positivos previos.

En nuestro centro, desde agosto del 91 se realiza una profilaxis combinada en pacientes con TMO alogénico que consiste en: 1) altas dosis de aciclovir en todos los pacientes seropositivos para CMV o seronegativos con donante seropositivo; 2) realización de LBA en todos los pacientes entre los días +30-50; en los grupos con paciente y/o donante seropositivos si este LBA es negativo para CMV (cultivo convencional, citología y cultivo-centrifugación), un nuevo LBA es repetido entre los días +80-100; 3) se realiza un tratamiento preventivo con ganciclovir (durante 12 semanas) en todos los pacientes asintomáticos con LBA positivos para CMV. Después de 2-4 semanas de tratamiento con ganciclovir, se realiza un tercer LBA para valorar el estado del CMV en el pulmón. Todas las CMV-NI se tratan con ganciclovir/IVIG. Este protocolo ha sido bien tolerado. La probabilidad de CMV-NI al día +100 fue del 30% en el grupo control frente al 4% en el grupo con tratamiento preventivo combinado⁴⁰.

En un estudio realizado entre los centros miembros de la European Bone Marrow Transplantation con el objeto de investigar las técnicas diagnósticas, el uso de



la profilaxis y las estrategias terapéuticas entre sus miembros¹¹, se analizaron las respuestas a un cuestionario entre 75 centros de 20 países; las conclusiones muestran una gran disparidad en los procedimientos diagnósticos, disponibilidad de medios, intensidad de búsqueda, tratamiento y profilaxis. Dentro del apartado que más nos puede interesar en este trabajo, "procedimientos diagnósticos para la neumonía por CMV", el LBA fue siempre realizado en 55 centros, 11 centros frecuentemente no usan LBA y 4 centros no pueden realizar LBA. En cuanto a los criterios para iniciar tratamiento, 12 centros requieren síntomas (cambios radiológicos con o sin hipoxia) combinados con la detección en LBA u otros especímenes pulmonares para el diagnóstico e iniciación del tratamiento, 16 centros aceptan síntomas combinados con detección de viremia, 31 centros aceptan síntomas combinados con detección de CMV en cualquier localización. Sin embargo, varios centros inician tratamiento con la sospecha de neumonía por CMV, pero requieren verificación por LBA o tejido para consignar la neumonía como causada por CMV.

En los pacientes con TMO, además del CMV, se han referido infecciones pulmonares por otros virus, particularmente, *Adenovirus*, herpes simple y *varicella-zoster*^{23,24,26}. La más común de éstas es la producida por *Adenovirus*; la infección por este agente se produce en un 5% de los pacientes dentro de los primeros 3 meses post-TMO, y es atribuible en la mayoría de los casos a reactivación de un virus latente. Aproximadamente, un 20% de los pacientes con TMO con infección por *Adenovirus* desarrolla una neumonía. Las neumonías por VHS o VVZ son poco comunes; la neumonía por VHS se produce generalmente por diseminación por contigüidad de los virus desde la tráquea o aspiración de material de la orofaringe, si bien más raramente se puede producir en el seno de una infección generalizada con viremia²⁶.

También han sido descritas en los pacientes con TMO neumonías producidas por los virus respiratorios típicos, incluyendo *Parainfluenza* 1 y 3⁴¹, *Influenza* tipos A y B y VSR. Recientemente se ha descrito una posible relación entre el *Herpesvirus* humano tipo VI⁴² y neumonitis idiopáticas en estos pacientes, si bien esta relación necesita de posteriores estudios^{43,44}.

En los pacientes con trasplante renal o hepático han sido descritas neumonías por CMV, *Influenza*, *Adenovirus* y herpes simple^{3,45,46}; así mismo, en los sometidos a trasplante cardíaco y/o pulmonar^{47,48-58} están descritas infecciones por CMV, VHS, virus Epstein-Barr y referencias esporádicas a infecciones por VSR y *Coxsackie* B. En todos estos pacientes afectados de trasplante de órgano sólido, el agente viral más importante de morbimortalidad es de nuevo el CMV.

Si bien el CMV es una importante causa de patología ocular y gastrointestinal en los pacientes infectados por VIH, la relación entre la infección pulmonar por CMV y la neumonía por CMV estuvo sujeta a controversia. Entre el 30 y el 40% de los pacientes con sida y neumonía de diversas etiologías presentan CMV en el LBA. En muchos de los casos aparecen las

típicas inclusiones en el núcleo y en el citoplasma de las células recogidas por el LBA o en las muestras de biopsia. Esta prevalencia llega al 69-90% en las series que incluyen estudios necrópsicos. Sin embargo, la mayoría de los pacientes tiene otros patógenos acompañantes, particularmente *P. carinii*, y el curso clínico de estos pacientes no parece verse alterado por la presencia de CMV⁵⁹⁻⁶⁸.

Centrándonos en el diagnóstico de las infecciones virales en pacientes inmunosuprimidos, conviene recordar que la recuperación de un patógeno potencial en el LBA sólo debe ser considerada diagnóstica si se conoce que ese organismo no coloniza el tracto respiratorio⁷⁻¹⁰. Así, neumonías causadas por *Influenza* o virus respiratorio sincitial, los cuales normalmente no residen en el pulmón, pueden diagnosticarse cuando estos virus son aislados en el LBA. Sin embargo, en el caso del CMV y VHS, ni el cultivo ni la detección de sus componentes antigénicos en el LBA son suficientes, por sí mismos, para establecer un diagnóstico de neumonía. Esto es así porque se conoce que personas sanas pueden excretar estos virus desde el tracto respiratorio en ausencia de neumonía. No obstante, el diagnóstico de neumonía puede tomarse en consideración si se encuentran los característicos cuerpos de inclusión intranucleares o intracitoplasmáticos en el examen citológico de las células epiteliales pulmonares en el líquido del LBA⁷. La verificación histológica constituye el patrón oro para el diagnóstico de estas neumonías. Hoy día existen nuevos métodos de diagnóstico rápido que nos permiten actuar tempranamente una vez que el virus ha sido "descubierto". Los métodos más utilizados son el cultivo-centrifugación, habitualmente conocido como *shell-vial*, la detección del antígeno pp65 en sangre y la técnica de PCR para la detección del ADN viral^{4,69-77}.

El LBA es la muestra más comúnmente usada para detectar el CMV⁶; además, el LBA permite el diagnóstico de otros gérmenes oportunistas que pueden coexistir. De las técnicas que suelen ser aplicadas al LBA para detectar la presencia de CMV, el cultivo es el que muestra generalmente mayor sensibilidad⁸⁻⁷⁸⁻⁸². Las sensibilidades más altas se han referido cuando se usan cultivos-centrifugación seguidos de detección de los antígenos virales tempranos^{76,83-86}.

Técnicas de tinción directa de células alveolares mononucleares infectadas, empleando anticuerpos monoclonales aislados o agrupados frente a una variedad de antígenos virales tanto tempranos como tardíos, muestran una alta sensibilidad^{77,78,80,84}. Estas técnicas muestran alguna variabilidad dependiendo del método utilizado.

La evidencia citopatológica de las inclusiones nucleares o citoplasmáticas muestra una especificidad de prácticamente el 100% en todos los estudios^{76,77,79,81,84,85}; sin embargo, la sensibilidad es uniformemente baja, generalmente inferior al 50%. Uno de los estudios quizás más representativo es el de Crawford⁸⁴, en el que compara la sensibilidad y especificidad de los métodos más comúnmente usados en la práctica clínica: citología, inmunofluorescencia,



TABLA II
Sensibilidad y especificidad de los métodos más comúnmente usados para el diagnóstico de infección pulmonar por CMV

Hechos evaluados	Citología	Inmunofluorescencia	Cultivo viral	
			Convencional	Centrifugación
Sensibilidad (n/n)	29% (6/21)	59% (13/22)	91% (21/23)	96% (22/23)
Especificidad (n/n)	100% (9/9)	100% (9/9)	100% (10/10)	100% (10/10)
Valor predictivo				
Positivo (n/n)	100% (6/6)	100% (13/13)	100% (21/21)	100% (22/22)
Negativo (n/n)	38% (9/24)	50% (9/18)	83% (10/12)	91% (10/11)

Tomada de Crawford SW²⁶, modificada de Ann Intern Med 1988; 108: 180-185⁸⁴.

cultivo convencional y cultivo-centrifugación (tabla II).

Como ya hemos comentado, la infección por CMV ha de ser diferenciada de la enfermedad por CMV. Cathomas⁸⁷ señala cómo su grupo y otros autores han referido la alta especificidad de la detección de CMV mediante anticuerpos monoclonales en las células alveolares de pacientes con TMO y la presencia de neumonitis por CMV^{77,78,80,84}. Para este autor⁸⁷, la inmunodetección de antígenos de CMV en las células alveolares implica infección tisular, mientras que la detección de CMV por PCR y cultivo sólo implica la presencia de CMV-ADN y virus viables en la muestra.

Este autor compara tres técnicas de detección de CMV en LBA: PCR, cultivo de virus e inmunotinción de las células alveolares. Los criterios para diagnosticar CMV-NI son muy estrictos. La PCR fue la técnica más sensible para la detección de CMV en el LBA. Para el diagnóstico de CMV-NI, la sensibilidad de la PCR y de la inmunotinción fue del 100%, mientras que la sensibilidad del cultivo de virus fue del 85,7%. El valor predictivo positivo de cada test, usado individualmente, para la identificación de neumonitis por CMV fue bajo. Sin embargo, cuando los resultados de la técnica PCR se utilizan en combinación con la inmunotinción, la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de esta estrategia fueron del 100%. Los autores proponen el siguiente algoritmo para el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de la neumonitis por CMV en TMO (fig. 1).

Como el CMV, el VHS puede estar presente en las secreciones respiratorias de los pacientes inmunosuprimidos⁸⁸ y en la orofaringe de los pacientes con neumonía gravemente enfermos⁸⁹ en ausencia de enfermedad respiratoria inferior atribuible a dicho virus. No obstante, como ya se ha comentado²⁶, puede producirse neumonía por diseminación por contigüidad, o menos frecuentemente por diseminación hematogena a los pulmones. Como consecuencia de esto, en las muestras broncoscópicas y particularmente en el LBA, el VHS puede detectarse como contaminante o patógeno⁸. La experiencia de las técnicas diagnósticas es mucho más limitada que para el CMV, pero puede

asumirse que van a dar resultados similares, así el cultivo, la inmunofluorescencia directa y la hibridación in situ serán relativamente sensibles pero poco específicas y la histología y la citología serán relativamente insensibles pero muy específicas⁸.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias virales

Durante la última década, el diagnóstico virológico ha experimentado un gran desarrollo al que han contribuido diferentes factores, como las mejoras en las técnicas de cultivo celular, la disponibilidad de anticuerpos monoclonales altamente específicos, el desa-

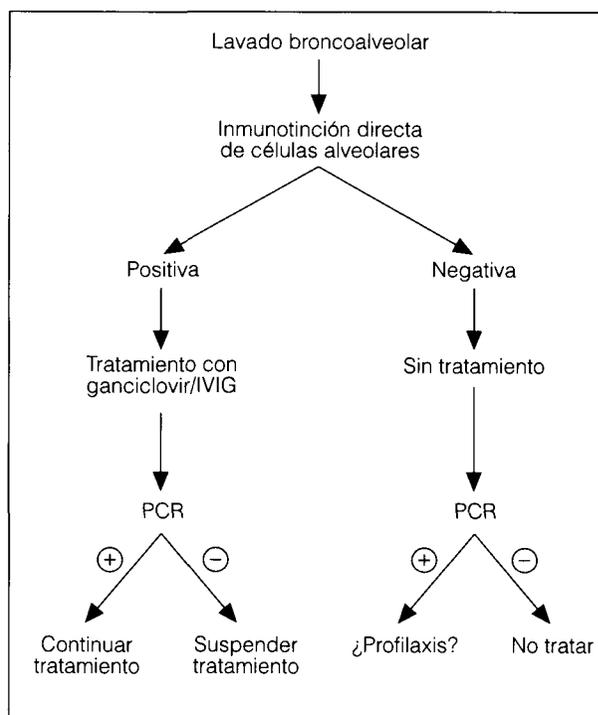


Fig. 1. Algoritmo para el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de la neumonitis por CMV en pacientes con trasplante de médula ósea (TMO). Tomada de Cathomas G. Blood 1993; 81: 1.909-1.914⁸⁷.



rollo de métodos inmunoenzimáticos y quizás lo más importante, el desarrollo de métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

Selección de la muestra para detección de virus

Para optimizar la detección del virus es fundamental la recogida de la muestra adecuada en el momento preciso, de forma estéril, lo antes posible en el curso de la enfermedad y transportarse inmediatamente al laboratorio o mantener en frío.

En el caso de sospecha de infección respiratoria viral, las muestras recomendadas son: los frotis faríngeos para recuperar *Enterovirus*, *Adenovirus* y herpes simple. El frotis nasofaríngeo está recomendado para la detección de los virus respiratorio sincitial, *Influenza* y *Parainfluenza*⁹⁰. Las muestras nasales son válidas para *Rhinovirus*. El esputo no es una muestra recomendable. El LBA es la muestra con mayor valor en el diagnóstico de infecciones virales del tracto respiratorio inferior. Biopsias pulmonares se pueden estudiar para detectar virus como citomegalovirus, VHS, *Parainfluenza*, *Influenza*, *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Adenovirus*.

Métodos de cultivo celular

El aislamiento de los virus en líneas celulares, conocido como cultivo celular convencional, es el soporte del diagnóstico virológico. El desarrollo de nuevas técnicas, como el cultivo-centrifugación o *shell-vial*, ha permitido a los laboratorios proporcionar información en un período de tiempo clínicamente relevante⁹¹.

Cultivo convencional. El aislamiento de virus mediante cultivo celular se considera el *gold standard*. Existe una gran variedad de líneas celulares con diferente sensibilidad a virus individuales; el uso simultáneo de varias de ellas optimiza su aislamiento.

Según el tipo de línea celular, los virus producen un efecto citopático (ECP) característico. Se trata de cambios degenerativos que se producen en las células cuando los virus se multiplican dentro de ellas. La morfología del ECP, tamaño y tiempo de aparición dependerán del tipo de línea celular, del propio virus y de la concentración viral. La identificación definitiva de los virus requiere la tinción de las células infectadas con anticuerpos tipo específicos marcados.

Cultivo-centrifugación. En 1985, Gleaves et al describieron la eficacia de la centrifugación del inóculo sobre la monocapa celular, realizando posteriormente sobre ella una inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales frente a antígenos tempranos de CMV⁹²⁻⁹⁴. Hoy en día este procedimiento se usa para multitud de virus. El cultivo-centrifugación es altamente sensible y específico, aunque aún se debe complementar con las técnicas de cultivo convencional, para muestras con bajas concentraciones de virus y para infecciones virales mixtas o cuando se trata de patógenos no sospechados.

Se ha aplicado para virus de sarampión, *Adenovirus*, *Influenza*, *Parainfluenza*, VSR y VVZ^{91,92,95-99}. La principal diferencia entre el cultivo-centrifugación y cultivo convencional es la capacidad de identificar el virus antes de que se produzca el ECP. Otra ventaja es que el virus es detectado en 1-5 días en vez de las 1-4 semanas requeridas para el cultivo convencional.

Estudio de muestras clínicas para detección de partículas virales, antígenos o ácidos nucleicos

La detección rápida y segura de partículas virales, antígenos o ácidos nucleicos en muestras clínicas es ahora posible en muchos laboratorios con experiencia limitada en virología. Se dispone de distintas técnicas que dividimos en dos grandes grupos: métodos inmunológicos y métodos no inmunológicos.

Métodos inmunológicos

Técnicas de inmunofluorescencia

La tinción inmunofluorescente de muestras clínicas ha demostrado ser un buen método, rápido y disponible para un gran número de antígenos virales como VHS, VVZ, CMV, virus Epstein-Barr, *Influenzavirus* A y B, *Parainfluenza* tipos 1, 2, 3 y 4, VSR, *Adenovirus*, sarampión, paperas^{91,100-104}, así como para otros agentes virales más inusuales. Como técnica rápida, la IF ha sido la más ampliamente aplicada. Se trata de detectar el antígeno (Ag) en las células infectadas con el uso de anticuerpos monoclonales (Ac) tipo específicos marcados con un fluorocromo.

Ensayos con inmunoperoxidasa

Como alternativa a la IF para detectar Ag virales dentro de las células, se pueden utilizar anticuerpos marcados con enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante^{97,105-107}. Esta técnica tiene las mismas aplicaciones que la IF.

Inmunoanálisis en fase sólida

Son útiles para la detección de Ag en muestras clínicas. El principio básico de estas técnicas consiste en que el anticuerpo es inmovilizado sobre una fase sólida o soporte y va a capturar Ag libre en la muestra. Según el tipo de marcaje usado, dará lugar a las distintas modalidades del ensayo: marcaje radiactivo para radioinmunoanálisis (RIA) o enzimas de enzimoanálisis (EIA).

La aplicación de estas técnicas respecto a virus con implicación en la patología respiratoria se puede referir a *Adenovirus*, VHS, CMV, VSR, *Influenza* A y *Coronarivirus* humano. Gracias al desarrollo de la tecnología robótica durante la última década, se ha previsto de sistemas completamente automatizados y otros semiautomatizados de EIA.

Antigenemia

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método válido para la cuantificación y detección rápida de Ag de CMV en PMNL mediante el uso de anticuerpos monoclonales¹⁰⁸. La antigenemia consiste en la detección inmunocitoquímica del Ag pp65, una proteína estructural temprana (fosfoproteína de la matriz interna) del CMV, en el núcleo de los PMNL de sangre periférica¹⁰⁹. La utilidad clínica de esta técnica ha sido demostrada tanto en trasplantados de órgano sólido como en TMO, así como en pacientes con sida¹¹⁰⁻¹¹². La mayor ventaja de la antigenemia es que se puede disponer de resultados a las 4-6 horas de obtener la muestra.

Métodos no inmunológicos

Tinción histológica

Existen numerosos trabajos^{113,114} que describen los cambios celulares asociados a diversas infecciones virales respiratorias: *Adenovirus*, VHS, VVZ, sarampión, CMV, *Parainfluenza* y VSR. Estos cambios celulares pueden dividirse en tres grandes grupos. En primer lugar, cilicitoria, o desprendimiento del penacho de cilios, que puede afectar a las células ciliadas y es inespecífico. En segundo lugar, regeneración y atipia del epitelio respiratorio, con frecuente aparición de nucléolos prominentes y que también son cambios inespecíficos; por último, alteraciones propias de determinadas infecciones virales.

Microscopia electrónica

La microscopia electrónica (ME) se ha considerado como la única técnica útil para la identificación rápida de partículas virales de variedad de muestras clínicas¹¹⁵. Permite la detección de virus no cultivables con la ventaja de que la pérdida de viabilidad viral no va a interferir. La técnica ME es aplicable cuando el título de virus en la muestra es al menos de 10^6 a 10^7 partículas por ml. El método utilizado es la tinción negativa de las partículas virales con sales electrodenas del ácido fosfotúngstico, que es rápido y sencillo de realizar. Las muestras adecuadas son las secreciones nasofaríngeas y lavados pulmonares o suero, entre otras, así como secciones ultrafinas de tejido procedente de biopsias o autopsias. El examen de secreciones de personas con infección respiratoria ha revelado VSR, *Enterovirus* y *Coronavirus*, así como *Influenza*, *Parainfluenza*, sarampión y virus de las paperas.

Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos

Los métodos de hibridación de ácidos nucleicos fueron muy prometedores para el diagnóstico de enfermedades virales¹¹⁶⁻¹²⁰. En la actualidad, un gran número de virus puede ser detectado mediante el uso de sondas. Aunque estos procedimientos no han desplazado a los métodos tradicionales de detección de virus, por su falta de sensibilidad.

El genoma de los virus puede ser ADN o ARN de cadena doble o sencilla. Las sondas de ácidos nucleicos son fragmentos cortos de ADN o ARN marcados, que se unen específicamente (hibridan) con una secuencia complementaria del ácido nucleico diana. Tradicionalmente se marcan con radisótopos, lo que tiene inconvenientes, por lo que hoy día se dispone de otros métodos alternativos.

Amplificación de ácidos nucleicos

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1985 ha reavivado el interés por las técnicas moleculares, al mejorar la detección de ácidos nucleicos virales¹²¹⁻¹²⁸.

La PCR consiste en ciclos repetidos de síntesis de ADN donde se consigue un incremento del número de copias originales de forma exponencial. Para ello, hay que conocer una secuencia específica del ADN viral exclusiva de ese virus o grupo de virus. Esta región se elegirá como ADN molde para ser amplificada. Se sintetizará una pareja de oligonucleótidos (cebadores o iniciadores), complementarios a los extremos del fragmento elegido como diana. Para detectar los productos de amplificación, se pueden usar los métodos de hibridación descritos o bien visualizarlos directamente mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción del mismo con bromuro de etidio, aunque esto es menos sensible.

La gran sensibilidad de la PCR es su gran ventaja y su mayor limitación; la generación de millones de copias de ADN puede ocasionar la contaminación cruzada de nuevas muestras con el producto de la amplificación de PCR previas. Para evitar falsos resultados positivos se deben tomar precauciones. Esta técnica será útil para detectar virus no cultivables o muy difíciles de diagnosticar por métodos habituales y en caso de infecciones virales mixtas. Los resultados deben interpretarse con respecto al tipo de virus, la localización y la clínica.

Interpretación de los resultados de la detección viral

El criterio a seguir debe considerar la epidemiología, la clínica, la localización anatómica y la historia natural de la infección¹²⁹. El conocimiento del fenómeno de la persistencia viral es crucial. La presencia, tanto de virus infeccioso como del Ag viral o de su ácido nucleico, no le confirma necesariamente como agente etiológico^{129,130}. La reactivación de virus latentes o la eliminación persistente de virus de infecciones previas pueden originar una interpretación inadecuada ante un resultado positivo. Por ejemplo, los *Adenovirus* se asocian con múltiples formas de enfermedad respiratoria; sin embargo, pueden eliminarse de forma persistente del tracto respiratorio superior sin que su presencia sea significativa. La excreción asintomática de CMV, VEB o VHS del tracto respiratorio superior es común. El aislamiento de CMV de un lavado bronquial es sospechoso pero no diagnóstico de enfermedad. Los *Enterovirus* se pueden recuperar de la faringe

de niños asintomáticos durante el período otoñal en países templados y no suponen infección aguda¹³¹. Sin embargo, la recuperación de virus del sarampión, *Rhinovirus*, *Influenza*, *Parainfluenza*, *VSR*, *VVZ*, entre otros, tiene una elevada correlación con enfermedad respiratoria aguda.

Serología viral

Los estudios serológicos siguen vigentes en el diagnóstico de las infecciones virales¹³². El panel de virus a estudiar en el síndrome respiratorio debería incluir *Influenza*, *VSR*, *Parainfluenza* y *Adenovirus*. En caso de que la detección sea negativa o de que el significado del aislamiento sea equívoco, estaría indicado realizar un estudio serológico paralelo de sueros de las fases aguda y convaleciente.

La seroconversión o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos se considera significativa; sin embargo, se debe considerar cada caso en particular y tener en cuenta posibles reactivaciones de virus latentes por otras causas, infecciosas o no.

Aunque conocidos por todos conviene recordar los siguientes hechos: 1) se requieren de 3 a 4 semanas para que se produzca la seroconversión; 2) la seroconversión depende de la capacidad del paciente para producir anticuerpos, así en los pacientes inmunosuprimidos este hecho no suele ocurrir, y 3) sólo se encuentra lo que se busca.

BIBLIOGRAFÍA

- Dolin R. Pneumonia caused by viruses other than *Herpesvirus*. En: Shelhamer, Pizzo Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott Company, 1991; 398-408.
- Schutze GE, Jacobs RF. Lower respiratory tract infections of infants and children. En: Niederman, Sarosi, Glassroth, editores. Respiratory infections. A scientific basis for management. Filadelfia: Saunders, 1994; 103-113.
- Ettinger NA, Trulock EP. State of the art. Pulmonary considerations of organ transplantation. Part I. Am Rev Respir Dis 1991; 143: 1.386-1.405.
- Forman SJ, Zaia JA. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? Review article. Blood 1994; 83: 2.392-2.398.
- Meyers JD, Ljungman P, Fisher LD. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. J Infect Dis 1990; 162: 373-380.
- Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. A randomized controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants. N Engl J Med 1991; 324: 1.005-1.011.
- Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, Block ER, Daniele RP, Dantzker DR et al. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 481-486.
- Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 533-558.
- Pisani RJ, Wright AJ. Clinical utility of bronchoalveolar lavage in immunocompromised hosts. Mayo Clin Proc 1992; 67: 221-227.
- Baughman RP. Use of bronchoscopy in the diagnosis of infection in the immunocompromised host. Thorax 1994; 49: 3-7.
- Ljungman P, Bock RD, Cordonier C, Einsele H, Engelhard D, Grundy A et al. Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. Bone Marrow Transplant 1993; 12: 399-403.
- Kauffman RS. Viral pneumonia. En: Pennington, editor. Respiratory infections: diagnosis and management (3.ª ed.). Nueva York: Raven Press, 1994; 515-532.
- Cate TR. Viral pneumonia in immunocompetent adults. En: Niederman, Sarosi, Glassroth, editores. Respiratory infections. A scientific basis of management. Filadelfia: Saunders, 1994; 471-485.
- Ruben FL. Viral pneumonias. Postgrad Med 1993; 93: 57-64.
- Ruben FL, Nguyen MLT. Viral pneumonitis. Clin Chest Med 1991; 12: 223-235.
- Schooley RT. Pneumonia due to herpesviruses. En: Shelhamer, Pizzo, Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott, 1991; 398-408.
- Cohen JI, Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. Medicine 1985; 64: 100-114.
- Horwitz CA, Henle W, Henle G, Snover D, Rudnick H, Balfour HH et al. Clinical laboratory evaluation of cytomegalovirus-induced mononucleosis in previously healthy individuals. Medicine 1986; 65: 124-134.
- Manian FA, Smith T. Ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus pneumonia in an immunocompetent host. Clin Infect Dis 1993; 17: 137-138.
- Glezen WP, Couch RB. Interpandemic *Influenza* in the Houston area, 1974-1976. N Engl J Med 1978; 298: 587-592.
- Spera RV, Shepp DH. *Influenza* viruses. En: Chmel H, Bendelli M, Friedman H, editores. Pulmonary infections and immunity. Infectious agents and pathogenesis. Nueva York: Plenum Press, 1994; 281-318.
- Balfour HH. Cytomegalovirus: the troll of transplantation (editorial). Arch Intern Med 1979; 139: 279-280.
- Ettinger NA, Trulock EP. State of the art. Pulmonary considerations of organ transplantation. Part 2. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 213-223.
- Chan CK, Hyland RH, Hutcheon MA. Pulmonary complications following bone marrow transplantation. Clin Chest Med 1990; 11: 323-332.
- Enright H, Haake R, Weisdorf D, Ramsay N, McGlave P, Kersey J et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Transplantation 1993; 55: 1.339-1.346.
- Crawford SW, Meyers JD. Respiratory disease in bone marrow transplant patients. En: Shelhamer, Pizzo, Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott, 1991; 595-623.
- Ruutu P, Ruutu T, Volin L, Tukianen P, Ukkonen P, Hovi T. Cytomegalovirus in frequently isolated bronchoalveolar lavage fluid of bone marrow transplant recipients without pneumonia. Ann Intern Med 1990; 112: 913-916.
- Churchill MA, Zaia JA, Forman SJ, Sheibani K, Azumi N, Blume KG. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in lungs from bone marrow transplant recipients with interstitial pneumonia. J Infect Dis 1987; 155: 501-509.
- Slavin MA, Gleaves CA, Schoch HG, Bowdwen RA. Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid after allogeneic marrow transplantation by centrifugation culture. J Clin Microbiol 1992; 30: 2.776-2.779.
- Bratanow NC, Ash RC, Turner PA, Smith R, Haasler G, Chitambar C et al. Successful treatment of serious cytomegalovirus disease with 9 (1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanine and intravenous immunoglobulin in bone marrow transplant patients. Exp Hematol 1987; 15: 541-544.
- Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS, Meters JD. Treatment of cytomegalovirus (CMV) pneumonia in bone marrow transplant (BMT) patients (PTS) with ganciclovir (GCV) and CMV immunoglobulin (CMV-IG) [resumen]. Blood 1987; 70 Supl 1: 313a.
- Meyers JD, Reed EC, Shepp DH, Thornquist M, Dandliker PS, Vicary CA et al. Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation. N Engl J Med 1988; 318: 70-75.

33. Ljungman P, Prentice G, Gluckman E, Powles R, Milpied N, Ranada J et al. The European Acyclovir in CMV prophylaxis Group: the effect of intravenous acyclovir followed by oral acyclovir on CMV infections following bone marrow transplantation. A randomized double-blind controlled trial. En: Michelson S, Plotkin SA, editores. Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease, proceedings of the fourth international cytomegalovirus workshop. Nueva York: Excerpta Medica, 1993.
34. Atkinson K, Downs K, Golenia M, Biggs J, Marshall G, Dodds A et al. Prophylactic use of ganciclovir in allogeneic bone marrow transplantation; absence of clinical cytomegalovirus infection. *Br J Haematol* 1991; 79: 57-62.
35. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, DuMond C, Ebeling DF, Buhles WC et al. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Ann Intern Med* 1993; 118: 179-184.
36. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 1993; 118: 173-178.
37. Von Bueltingsloewen A, Bordigoni P, Witz F, Bene MC, Schmitt C, Lacour B et al. Prophylactic use of ganciclovir for allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 197-202.
38. Reusser P, Gambertoglio JD, Lilleby K, Meyers JD. Phases I-II of foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in autologous and allogeneic marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1992; 166: 473-479.
39. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Gleaves MS, DuMond C, Cays M et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1.601-1.606.
40. Aspa J, Cámara R, Jareño J, Ramos R, Ancochea J, Cardeñoso L et al. Bronchoalveolar lavage as a routine sample for pre-emptive treatment of CMV infection in allogeneic bone marrow transplantation. *Eur Respir J* 1993; 6: 557s.
41. Wendt CH, Weisdorf DJ, Jordán MC, Balfour HH, Hertz MI. Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1992; 326: 921-926.
42. Cone RW, Hackman RC, Huang MLW, Bowden RA, Meyers JD, Metcalf M et al. Human *Herpesvirus* 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1993; 329: 156-161.
43. Agut H. Puzzles concerning the pathogenicity of human *Herpesvirus* 6. *N Engl J Med* 1993; 329: 203-204.
44. Clark JG, Hansen JA, Hertz MI, Parkmen R, Jensen L, Peavy HH. Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.601-1.606.
45. Johnson RP, Rubin RH. Respiratory disease in Kidney and liver transplant recipients. En: Shelhamer, Pizzo, Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott, 1991; 567-594.
46. Marsano L, Perrillo RP, Flye W, Hanto DW, Spitzer ED, Thomas JR et al. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in Kidney and liver transplant recipients. *J Infect Dis* 1990; 161: 454-461.
47. Brooks RG, Theodore J, Remington JS. Pulmonary disease in heart and heart-lung transplant recipients. En: Shelhamer, Pizzo, Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott, 1991; 625-639.
48. Ettinger NA, Trulock EP. State of the art. Pulmonary considerations of organ transplantation. Part 3. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 433-451.
49. Buffone GJ, Frost A, Samo T, Demmler GJ, Cagle PT, Lawrence EC. The diagnosis of CMV pneumonitis in lung and heart/lung transplant patients by PCR compared with traditional laboratory criteria. *Transplantation* 1993; 56: 342-347.
50. Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP, Storch GA, Anderson D, Raab S et al. And the Washington University Lung Transplant Group. Cytomegalovirus infection and pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.017-1.023.
51. Horvath J, Dummer S, Loyd J, Walker B, Merrill WH, Frist WH. Infection in the transplanted and native lung after single lung transplantation. *Chest* 1993; 104: 681-685.
52. Grossi P, Revello MG, Minoli L, Percivale E, Zavattoni M, Poma G et al. Three-years experience with human cytomegalovirus infections in heart transplant recipients. *J Heart Transplant* 1990; 9: 712-719.
53. Duncan AJ, Dummer JS, Paradis IL, Dauber JH, Yousef SA, Zenati MA et al. Cytomegalovirus infection and survival in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10: 638-646.
54. Smyth RL, Higenbottam TW, Scott JP, Wreghitt TG, Stewart S, Clelland CA et al. Herpes simplex infection in heart-lung transplant recipients. *Transplantation* 1990; 49: 735-739.
55. Steinhoff G, Behrend M, Wagner TOF, Höper MH, Haverich A. Early diagnosis and effective treatment of pulmonary CMV infection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10: 9-14.
56. Maurer JR, Tullis DE, Scavuzzo M, Patterson A. Cytomegalovirus infection in isolated lung transplantations. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10: 647-649.
57. Duncan SR, Grgurich WF, Iacono AT, Burckart GJ, Yousem SA, Paradis IL et al. A comparison of ganciclovir and acyclovir to prevent cytomegalovirus after lung transplantation. *Am J Crit Care Med* 1994; 150: 146-152.
58. Smyth RL, Borysiewicz LK, Shaples LD, Stewart S, Wreghitt TG, Gray JJ et al. Cytomegalovirus infection in heart-lung transplant recipients: risk factors, clinical associations and response to treatment. *J Infect Dis* 1991; 164: 1.045-1.050.
59. Suffrendini AF, Shelhamer JH. Pulmonary disease in the HIV-infected patient. En: Shelhamer, Pizzo, Parrillo, Masur, editores. Respiratory disease in the immunosuppressed host. Filadelfia: Lippincott, 1991; 537-566.
60. Gallant JE, Chaisson RE. Respiratory infections in persons infected with human immunodeficiency virus. En: Niederman, Sarosi, Glassroth, editores. Respiratory infections. A scientific basis for management. Filadelfia: Saunders, 1994; 199-215.
61. Polis MA, Masur H. Cytomegalovirus infections in patients with HIV infection. En: Broder S, Merigan TC, Bolognesi D. Textbook of AIDS medicine. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994; 359-371.
62. Aspa J. Patología pulmonar en el paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana. Diagnóstico mediante lavado broncoalveolar. Aspectos clínicos, citológicos e inmunológicos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Medicina. Departamento de Medicina. Madrid, 1992.
63. Jacobson WA, Mills J. Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical findings, diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1988; 108: 585-594.
64. Millar AB, Patou G, Miller RF, Grundt JE, Katz DR, Weller IV et al. Cytomegalovirus in the lungs of the patients with AIDS. Respiratory pathogen or passenger? *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1.474-1.477.
65. Miles PR, Baughman RP, Linnermann CC. Cytomegalovirus in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with AIDS. *Chest* 1990; 1.072-1.076.
66. Lawrence Drew. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 608-615.
67. Jiménez ML, Aspa J, Padilla B, Ancochea J, González A, Fraga J et al. Fiberoptic bronchoscopic diagnosis disease in 151 HIV-infected patients with pneumonitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 491-497.
68. Jacobson WA, Mills J. Cytomegalovirus infection. *Clin Chest Med* 1988; 8: 443-448.
69. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 917-919.
70. Martin WJ, Smith TF. Rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens by a monoclonal antibody method. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 1.006-1.008.
71. Van Der Bij W, Torensma R, Van Son WJ. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J Med Virol* 1988; 25: 179-188.
72. Hsia K, Spector DH, Lawrie J, Spector SA. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.802-1.809.
73. Grefte JMM, Van Der Gun BTF, Smochlke S, Van Der Gies-

- sen M, Van Son WJ, Plachter B et al. Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *J Infect Dis* 1992; 166: 683-684.
74. Cassol SA, Poon MC, Pal R, Naylor MJ, Culver-James J, Bowen TJ et al. Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplantation. *J Clin Invest* 1989; 83: 1.109-1.115.
 75. Myerson D, Lingenfelter PA, Gleaves CA, Meyers JD, Bowden RA. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by the polymerase chain reaction with archived frozen lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 100: 407-413.
 76. Woods GL, Thompson AB, Rennard SL, Linder J. Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens. Spin amplification and staining with a monoclonal antibody to the early antigen for diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. *Chest* 1990; 98: 568-575.
 77. Emanuel D, Peppard J, Stover D, Gold J, Armstrong D, Hammerling U. Rapid immunodiagnosis of cytomegalovirus pneumonia by bronchoalveolar lavage using human and murine monoclonal antibodies. *Ann Intern Med* 1986; 104: 476-481.
 78. Cordonier C, Escudier E, Nicolas JC, Fleury J, Deforges L, Ingrand D et al. Evaluation of three assays on alveolar lavage fluid in the diagnosis of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1987; 155: 495-500.
 79. Hilborne LH, Nieberg RK, Cheng L, Lewin KJ. Direct in situ hybridization for rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 766-769.
 80. Paradis IL, Grgurich WF, Dummer JS, Dekker A, Dauber JH. Rapid detection of cytomegalovirus pneumonia from lung lavage cells. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 697-702.
 81. Springmeyer SC, Hackman RC, Holle R, Greemberg GM, Weems CE, Myerson C et al. Use of bronchoalveolar lavage to diagnose acute diffuse pneumonia in the immunocompromised host. *J Infect Dis* 1986; 154: 604-610.
 82. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, Lange M, Gold J, Armstrong D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med* 1984; 101: 1-7.
 83. Gleaves CA, Myerson D, Bowden RA, Hackman RC, Meyers JD. Direct detection of cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage samples by using a rapid in situ DNA hybridization assay. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2.429-2.432.
 84. Crawford SW, Bowden RA, Hackman RC, Gleaves CA, Meyers JD, Clerk JG. Rapid detection of cytomegalovirus pulmonary infection by bronchoalveolar lavage and centrifugation culture. *Ann Intern Med* 1988; 108: 180-185.
 85. Ericc A, Hertz MI, Snyder LS, Englund J, Ekelman CK, Balfour HH. Evaluation of centrifugation cultures of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 10: 205-212.
 86. Martin WJ, Smith TF, Brutinel WM, Cockerill FR, Douglas WW. Role of bronchoalveolar lavage in the assessment of opportunistic pulmonary infections: utility and complications. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 549-557.
 87. Cathomas G, Morris P, Pekle K, Cunningham I, Emanuel D. Rapid Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and direct immunostaining of alveolar cells. *Blood* 1993; 81: 1.909-1.914.
 88. Ramsey PG, Fife KH, Hackman JD, Meyers JD, Corey L. Herpes simplex pneumonia. Clinical, virologic and pathologic features in 20 patients. *Ann Intern Med* 1992; 97: 813-820.
 89. Tuxen DV, Cade JF, McDonald MI, Buchanan MRC, Clar RJ, Pain CF. Herpes simplex virus from the lower respiratory tract in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 416-419.
 90. Wiedbrauk DL, Johnston. *Manual of clinical virology*. Nueva York: Raven Press, 1993; 11.
 91. Minnich LL, Smith TF, Ray CG. Cumitech 24, rapid detection of viruses by immunofluorescence. En: S. Specter. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1988.
 92. Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and others agents. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 150-175.
 93. Gleaves CA, Hursh DA, Rice DH, Meyers JD. Detection of cytomegalovirus from clinical specimens in centrifugation culture by in situ DNA hybridization and monoclonal antibody staining. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 21-23.
 94. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell-vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 217-221.
 95. Bartholoma NY, Forbes BA. Successful use of shell-vial centrifugation culture and 16 to 18 hours immunofluorescent staining for the detection of *Influenza A* and *B* in clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 487-490.
 96. Gleaves CA, Lee CF, Bustamante CI, Meyers JD. Use of murine monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of *varicella-zoster* virus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1.623-1.625.
 97. Johnston SLG, Siegel CS. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.394-2.397.
 98. Rabalais GP, Stout GG, Ladd L, Cost M. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell-vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1.505-1.508.
 99. Thiele GM, Woods GL. The effect of dexamethasone on the detection of cytomegalovirus in tissue culture and by immunofluorescence. *J Virol Methods* 1988; 22: 319-328.
 100. Emmons RW, Riggs JL. Application of immunofluorescence to diagnosis of viral infections. *Methods Virol* 1977; 6: 1-28.
 101. Gardner PS. Immunofluorescence. En: Specter S, Lancz G, editores. *Clinical virology manual*. Nueva York: Elsevier, 1986; 95-109.
 102. Gardner PS, McQuillin J. *Rapid virus diagnosis: applications of immunofluorescence* (2.^a ed.). Boston: Butterworths, 1980.
 103. Riggs JL. Immunofluorescence staining. En: Schmidt NJ, Emmons RW, editores. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections* (6.^a ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association, 1989; 123-133.
 104. Rossier E, Miller R, Phipps PH. *Rapid viral diagnosis by immunofluorescence: an atlas and practical guide*. Canadá: University of Ottawa Press, Ottawa, 1989.
 105. Benjamin DR. Use of immunoperoxidase for rapid diagnosis of mucocutaneous herpes simplex virus infection. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 571-573.
 106. Benjamin DR, Ray CG. Use of immunoperoxidase for the rapid identification of human myxoviruses and paramyxoviruses in tissue cultures. *Appl Microbiol* 1974; 28: 47-51.
 107. Forghani B. Radioimmunoassay systems. En: Lennette EL, editor. *Laboratory diagnosis of viral infections* (2.^a ed.). Nueva York: Marcel Dekker, 1992; 89-104.
 108. Van Der Bij W, Schirm J, Tornsmma R, Van Son WJ, Tegzess AM. Comparison between viremia and antigenemia for the detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2.531-2.535.
 109. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1.045-1.048.
 110. Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992; 80: 1.358-1.364.
 111. Landry ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2.851-2.856.
 112. Mazzulli T, Rubin RH, Ferraro MJ, D'Aquila RT, Doveikis SA, Smith BR et al. Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2.824-2.827.
 113. Rosenthal DL. *Cytology of pulmonary disease*. En: Wied GL, Kayer SH, editores. *Monographs in clinical cytology*, 1988.
 114. Johnston WW, Elson CE. *Respiratory tract*. En: Bibbo M, editor. *Comprehensive cytology*. Filadelfia: Saunders, 1991; 340-341.



115. Oshiro LS, Miller SE. Application of electron microscopy to the diagnosis of viral infections. En: Lennette EL, editor. *Laboratory diagnosis of viral infections* (2.^a ed.). Nueva York: Marcel Dekker, 1992; 45-68.
116. Cone RW. Assay for nucleic acids. En: Lennette EL, editor. *Laboratory diagnosis of viral infections* (2.^a ed.). Nueva York: Marcel Dekker, 1992; 175-194.
117. Landry ML. Nucleic acid hybridization in viral diagnosis. *Clin Biochem* 1990; 23: 267-277.
118. Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 82-101.
119. Tenover FC. DNA probes for infectious diseases. Boca Raton: CRC Press, 1989.
120. Zwadyk P Jr, Cooksey RC. Nucleic acid probes in clinical microbiology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1987; 25: 71-103.
121. Oste C. Polimerase chain reaction. *Biotechniques* 1988; 6: 162-167.
122. Persing DH. Polimerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1.281-1.285.
123. Persing DH, Landry ML. In vitro amplification techniques for the detection of nucleic acids: new tools for the diagnostic laboratory. *Yale J Biol Med* 1989; 62: 159-171.
124. Wiedbrauk DL. Molecular methods for viral detection. *Lab Med* 1992; 23: 737-742.
125. Wold AD. Shell-vial assay for the rapid detection of viral infections. En: Isenberg HD, editor. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington D.C.: American Society of Microbiology, 1992; 8.6.1.-8.6.10.
126. Erlich HA. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Nueva York: Stockton Press, 1989.
127. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR: a practical approach. Nueva York: Oxford University Press, 1991.
128. Williams SD, Kwok S. Polimerase chain reaction: applications for viral detection. En: Lennette EL, editor. *Laboratory diagnosis of viral infections* (2.^a ed.). Nueva York: Marcel Dekker, 1992; 147-173.
129. Chernesky MA, Ray CG, Smith TF. Cumitech 15. En: Drew WL, coordinating ed. *Laboratory diagnosis of viral infections*. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1982.
130. Menegus MA. Diagnostic virology. En: Belshe RB, editor. *Textbook of human virology* (2.^a ed.). St. Louis: Mosby, 1991; 156-166.
131. Menegus MA. Enterovirus. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editores. *Manual of clinical microbiology* (5.^a ed.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991; 943-946.
132. James K. Immunoserology in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 131-152.