

La función del diagnóstico de laboratorio para la influenza

○ papel do diagnóstico laboratorial da influenza

The role of laboratory diagnosis of influenza

Wyller Alencar de Mello

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brazil
The World Health Organization National Influenza Center

INTRODUCCIÓN

Desde 1948 la Organización Mundial de Salud (OMS) ha organizado una red internacional de laboratorios destinada a la vigilancia de los virus Influenza. Actualmente la Red Mundial de Vigilancia de la Influenza (*Global Influenza Surveillance Network - GISN*) abarca 128 Centros de Referencia para la Influenza (*National Influenza Centers - NICs*) distribuidos en 89 países. Entre sus atribuciones, los NICs son responsables por coleccionar y recibir los especímenes y aislados de virus originados de pacientes bajo sospecha de estar infectados por los virus Influenza, bien como de conducir el análisis de laboratorio preliminar. Los aislados de virus representativos son entonces seleccionados y transportados para uno de los cuatro Centros Colaboradores de la OMS (*WHO Collaborating Centers - WHOCCs*) para referencia y análisis antigénico y genética avanzados. Con base en los resultados coleccionados, la OMS produce recomendaciones anuales para la composición de la vacuna contra la influenza. Los NICs también alertan a la OMS sobre brotes no comunes de influenza o enfermedades semejantes a la influenza y detectan aislados de virus no subtipados y de baja reactividad delante del uso de reactivos diagnósticos de la OMS, adquiridos por medio de la GISN. De acuerdo a los términos de referencia acordados (www.who.int/csr/disease/influenza/TORNICs.pdf), los NICs deben difundir las informaciones generadas en la red FluNet (www.who.int/flu-net), una herramienta con base en Internet destinada al apoyo y a la coordinación de la vigilancia y al registro de la influenza en escalas nacional e internacional.

El diagnóstico de laboratorio de la influenza es una importante herramienta para la salud pública y se volvió el factor fundamental para la prevención, contención, vigilancia y manejo terapéutico de pacientes. En este

contexto, hay muchos métodos de laboratorio que permiten la identificación de los virus Influenza circulando en las comunidades.

Los abordajes diagnósticos utilizadas para la identificación del virus incluyen el cultivo de virus, la detección de antígenos virales, como los ensayos de inmunofluorescencia y los métodos de prueba de ácido nucleico. Un diagnóstico presuntivo puede hacerse con una prueba rápida válida para determinar el antígeno. La detección de anticuerpos se hace normalmente por ensayos de neutralización del virus (NT) y de inhibición de la hemaglutinación (IH), que se realizan para el monitoreo de la seroconversión en una cepa viral específica o para determinar el estatus inmunológico (luego de vacunación, por ejemplo).

La sensibilidad y la especificidad de un análisis diagnóstico para influenza puede variar de acuerdo al laboratorio que aplica determinada técnica, al tipo de prueba utilizada y/o al tipo de espécimen analizado.

Como los ensayos de laboratorio para diagnóstico de influenza presentan limitaciones que pueden llevar a resultados equivocados, sus hallazgos deben ser interpretados en conjunto con el histórico clínico del paciente. Puede haber resultados falso negativos debido a la baja cantidad de analito viral; a la existencia de especímenes coleccionados manipulados y/o transportados de forma inadecuada; a la presencia de inhibidores virales; y a la emergencia de nuevos subtipos para los cuales las pruebas no presentan sensibilidad o especificidad. Los hallazgos de laboratorio falso positivos pueden resultar de errores del laboratorio, tanto de orden administrativo como operacional, bien como de la especificidad subóptima de la prueba en cuestión.

ESPECÍMENES RESPIRATORIOS CLÍNICOS

Los virus de la influenza humana se replican principalmente en las células del epitelio columnar del trato respiratorio. La principal vía de transmisión son las secreciones respiratorias transportadas por el aire. La colecta de muestras del trato respiratorio para el diagnóstico clínico del virus Influenza debe procurar maximizar la recolección de células epiteliales infectadas por el virus. Aspirados nasofaríngeos (ANF) tienen un tenor

Correspondencia / Correspondencia / Correspondence:

Wyller Alencar de Mello
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Rodovia BR 316, km 7, s/nº, Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
E-mail: wyllermello@iec.pa.gov.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Lota Moncada

celular mayor y son superiores a los hisopos nasofaríngeos (SNF) en lo concerniente al aislamiento del virus Influenza. Los hisopos y los lavados de garganta son de uso limitado en el diagnóstico de la influenza, una vez que la mayor parte de las células capturadas por medio de esta técnica es del epitelio escamoso. Los ANF, SNF y los lavados no se aceptan para cultivo, inmunofluorescencia y detección de antígeno viral.

Los SNF deben tener puntas de algodón, rayón, o dacrón. Los hisopos de madera deben evitarse a causa del potencial de lixiviado de los conservantes utilizados en la fabricación de la madera en los medios de transporte e inhibición del transporte posterior para el cultivo de células y detección del ácido nucleico del virus. Los hisopos de alginato de calcio también deben ser evitados, ya que el alginato puede tener una acción inhibidora para algunos cultivos de células.

Las condiciones de transporte deben ser optimizadas para garantizar una máxima recuperación de los especímenes. Los especímenes deben ser transportados a una temperatura de 4° C o congelados a -70° C. El medio de transporte viral (MTV) utilizado puede ser determinante para la garantía de la buena recuperación de los virus. Se sugiere que el MTV incluya una solución salina balanceada con pH neutro y estabilizadores de proteína, como la gelatina o la albúmina sérica bovina (ASB) y antibiótico para reducir/inhibir el crecimiento de organismos comensales y bacterias. Debe ser evitado el uso de suero fetal bovino en MTV para el transporte de especímenes para que haya el aislamiento del virus Influenza. Entre los medios apropiados, puede citarse el Hank's Balanced Salt Solution y Earle's Minimal Essential Medium con infusión agar de ternera, gelatina o ASB.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

CULTIVO VIRAL

El aislamiento viral es una técnica altamente sensible y muy útil para el diagnóstico de infecciones virales, cuando se utiliza con especímenes clínicos de buena calidad. El estándar oro para la detección en laboratorio del virus Influenza continúa siendo el cultivo de aislado. El virus puede ser cultivado en células y en huevos embrionados.

Para un máximo aislamiento en huevos, embriones con cerca de 10 a 11 días de edad son administrados simultáneamente vía inoculación intra-amniótica e intra-alantoidea con un espécimen clínico. Los huevos se incuban a 33-35° C, y las muestras de los fluidos amniótico y alantoideo son analizadas para verificar la presencia del virus. A pesar de que la inoculación en huevos está considerada como muy laboriosa, su utilización todavía es bastante recomendada, ya que este aún es el mejor método para la generación rápida de títulos muy elevados de virus. Otro argumento a ser considerado a favor de la inoculación en huevos es el de que los virus candidatos a vacuna tienen que ser aislados en huevos. La tendencia de aislar el virus Influenza en cultivos de células, en vez de en huevos resultó en la disminución de la disponibilidad de virus vacunales

apropiados. Por este motivo, los laboratorios que tienen esta capacidad han sido bastante estimulados a continuar realizando el aislado viral en huevos.

La replicación del virus Influenza en cultivo de células, generalmente hecha con células del tipo MDCK, se detecta por la observación del efecto citopático (EC) y/o de la expresión de la hemaglutinina viral (HA) en la superficie de las células infectadas. El cultivo de células es un método muy sensible, pero, mientras que las expresiones del EC o de la HA normalmente llevan de dos a tres días para desarrollarse, esta puede demorar hasta siete a diez días.

Se acepta ampliamente la tesis de que el aislamiento de virus en huevos embrionados /cultivos de células con su posterior identificación por técnicas inmunológicas o genéticas, o por microscopia electrónica, es el método estándar para el diagnóstico viral.

De modo general, la mayor ventaja presentada por el método de aislamiento del virus es el hecho de que amplifica el virus del espécimen original y lo torna disponible para una posterior caracterización antigénica y genética, bien como la prueba de susceptibilidad a drogas, caso sea necesaria.

PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Las pruebas de inmunofluorescencia (IF) han sido utilizadas para la identificación directa del virus Influenza en especímenes respiratorios que contengan células exfoliadas. Las células en ANF o en hisopo nasal se lavan en solución tampón helada, se resuspenden y se colocan en láminas microscópicas. Luego de la fijación en acetona, el preparado de las células reacciona con anticuerpos específicos disponibles comercialmente. Estos anticuerpos son conjugados directamente al fluorocromo (IF directa) o reaccionan con un segundo anticuerpo especie-específico y conjugado a un fluorocromo (IF indirecta). Las muestras de suero policlonal utilizadas como anticuerpos para la detección presentan niveles demasiadamente altos de tinción para los restos celulares y bacterias, y normalmente se utilizan anticuerpos monoclonales para suministrar la sensibilidad y la especificidad requeridas para esta prueba. La IF indirecta es, generalmente, más sensible que la IF directa, aunque esta última es más popular por su menor tiempo de realización. Cuando comparados al cultivo de virus Influenza, ambos métodos se consideran menos sensibles actualmente. Especímenes colectados o transportados inadecuadamente (con ausencia de material celular o no colocados en medios de transporte, o refrigerados durante el transporte, por ejemplo) también contribuyen a la reducción de la sensibilidad.

PRUEBAS RÁPIDAS PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Hay análisis rápidos comerciales que pueden detectar los virus Influenza en hasta 15 minutos. Algunos ya están aprobados para su utilización en ambiente de ambulatorio, mientras que otros tienen que ser usados en laboratorios clínicos con un grado de complejidad moderado. Estos análisis rápidos difieren de acuerdo al tipo de virus Influenza que pueden detectar y si pueden o no distinguir entre tipos de influenza. Los diferentes análisis

pueden detectar: 1) apenas los virus de la Influenza A; 2) tanto los virus de la Influenza A como los de la Influenza B, pero no entre uno y otro; 3) tanto los virus de la Influenza A y de la Influenza B y pueden distinguir uno de otro.

Ninguno suministra información sobre los subtipos de Influenza A. Los tipos de especímenes aceptables para uso (i.e., ANF, SNF y lavados) también varían de acuerdo al análisis. La especificidad y, en particular, la sensibilidad de los análisis rápidos es menor que las de cultivo viral y varía de acuerdo al análisis. Debido a la menor sensibilidad de los análisis rápidos los médicos deben considerar la hipótesis de confirmar los análisis negativos por cultivo viral u otros métodos, pues existe la posibilidad de que ocurran falsos negativos en los análisis rápidos, especialmente durante períodos de pico de la actividad del virus Influenza en las comunidades. En comparación, resultados falsos negativos de análisis rápidos son menos frecuentes aunque pueden existir en períodos de baja actividad del virus Influenza. Por lo tanto, al interpretar los resultados de un análisis rápido para el virus Influenza, los médicos deben llevar en consideración los valores predictivos positivos y negativos de la prueba en el contexto del nivel de actividad del virus Influenza en la comunidad. Deben consultarse folletos explicativos y el laboratorio responsable por la ejecución de la prueba para obtener mayores detalles acerca del uso de análisis rápidos de diagnóstico.

Las pruebas rápidas de diagnóstico se utilizan más en hospitales e instituciones. En estos lugares, pueden facilitar el reconocimiento precoz de la gripe por su diferenciación de otras causas de fiebre en pacientes con histórico clínico complejo (pacientes con inmunidad comprometida, por ejemplo). Este procedimiento hace con que se evite el uso inadecuado de drogas antibacterianas, genera discusiones informadas acerca del aislamiento de

pacientes y permite el alta en menor tiempo. Además, las pruebas rápidas podrían llevar a un reconocimiento precoz de brotes en instituciones y a un uso más eficaz de estrategias de prevención.

PRUEBAS DE ÁCIDO NUCLEICO

La prueba de ácido nucleico más común para el diagnóstico de la influenza es la reacción en cadena de la polimerasa vía transcriptasa reversa (RT-PCR), pero la amplificación basada en la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos también ha sido aplicado de forma eficaz. Estos análisis son considerados sensibles, específicos y versátiles para el diagnóstico de la influenza. Una vez extraído del espécimen, el ARN viral puede utilizarse en el análisis de RT-PCR no apenas para identificar el virus como siendo Influenza, sino también para determinar su subtipo y cepa por medio del análisis secuencial. Los genotipos virales pueden ser rápidamente determinados a través de la secuenciación de algunos o de todos los genes virales, aunque el genotipado de los virus directamente de los especímenes de los pacientes generalmente requiera algún nivel de amplificación en el cultivo celular.

La principal ventaja de estos análisis moleculares es la posibilidad de presentar resultados el mismo día, sin cualquier comprometimiento de su sensibilidad. Sin embargo, la colecta de especímenes clínicos para el cultivo viral es esencial, ya que apenas aislados de cultivo pueden ser utilizados para la producción de vacunas.

Recebido en / Recibido em / Received: 23/7/2009
Aceito en / Aceito em / Accepted : 1/10/2009