



DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA GRIPE.

Dra. M^a Angeles Marcos, Servicio de Microbiología. CDB. Hospital Clínic de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La gripe es una infección respiratoria aguda que puede afectar a las vías respiratorias altas y bajas, suele presentar un patrón epidémico y es causa importante de morbilidad en la población general y de mortalidad en personas de alto riesgo.

Los virus gripales se agrupan en tres géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, pertenecientes a la familia Orthomyxoviridae. La gripe humana está causada fundamentalmente por los virus de la gripe A y B. Son virus RNA monocatenarios segmentados (los virus de la gripe A y B contienen 8 segmentos) con simetría helicoidal y provistos de membrana de envoltura, en la que se encuentran las glucoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La HA y NA en el caso de los *Influenzavirus A* van a definir el subtipo. Se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La HA es la responsable principal de la infecciosidad del virus y de su entrada en las células mediante fusión de la envoltura vírica con la membrana de la célula diana. La NA es importante en la replicación vírica, interviniendo en su liberación de la célula huésped y facilitando la difusión de célula a célula, lo que facilita la infecciosidad del virus. El virus de la gripe está sujeto a cambios genéticos inherentes a su condición de virus ARN carente de actividad correctora por parte de la polimerasa y a su genoma fragmentado que permite la recombinación entre los distintos segmentos. La variabilidad genética es mayor para los virus A que para el virus B. Los pequeños cambios genéticos o mutaciones puntuales dan lugar a la aparición de cepas suficientemente diversas como para dar origen a las epidemias estacionales que determinan la necesidad de una reformulación anual de la vacuna. Por otro lado, en el virus gripal A pueden existir reagrupaciones genéticas con intercambio de segmentos completos entre dos virus A distintos, incluso de diferentes orígenes (mamíferos, aves) denominado reordenamiento genético, lo cual origina un nuevo subtipo que nunca haya circulado entre la población humana y da lugar a un virus con potencial pandémico. El espectro de reservorios víricos tiene implicaciones importantes en la epidemiología de la gripe. El virus de la gripe B infecta exclusivamente al hombre, mientras que el virus de la gripe A es un virus fundamentalmente aviar que se replica asintóticamente en

el intestino y tracto respiratorio de las aves acuáticas y constituyen un importante reservorio de virus potencialmente pandémico que se transmiten periódicamente a otras especies, incluyendo los mamíferos.

DIAGNÓSTICO DE LA GRIPE. (TABLA 1)

El diagnóstico de la gripe generalmente es clínico, ya que en la mayoría de los casos se trata de un cuadro leve, de curso benigno y autolimitado, limitándose al tracto respiratorio superior. Sin embargo se estima que en un 5 % implican al tracto respiratorio inferior y pueden requerir ingreso hospitalario.

El diagnóstico virológico es el único que confiere certeza etiológica y va a ser de gran ayuda en pacientes con factores de riesgo y en pacientes graves en los que el tratamiento antivírico precoz es fundamental. Además, el diagnóstico microbiológico es una herramienta muy importante en el contexto de la vigilancia epidemiológica. Probablemente el aspecto más importante en el diagnóstico virológico es la recogida de la muestra. En el caso de la gripe se utilizan muestras del tracto respiratorio, fundamentalmente superior, las cuales deben tener el mayor número posible de células epiteliales que son en las que se replica el virus. En el paciente adulto son adecuados los frotis nasal y faríngeo, ambos incluidos en un único tubo con medio de transporte para virus; en los niños menores de 3 años son preferibles los lavados nasofaríngeos. Sin embargo en aquellos pacientes con evidencia clínica o radiológica de afectación del tracto respiratorio inferior se debería realizar un lavado broncoalveolar ya que podemos obtener falsos negativos en las muestras del tracto superior.

Las muestras se deben recoger tan pronto como sea posible, preferentemente en las primeras 48 horas del comienzo de síntomas y se deberán guardar a 4 °C hasta su procesamiento que idealmente será en las primeras 24 h, si éste se demora más de 72 h se congelarán a -70 °C. Si se tiene el propósito de realizar cultivo celular, las muestras se guardarán en nitrógeno líquido.

El diagnóstico virológico podemos dividirlo en métodos directos de detección del virus en la muestra clínica que incluirían el cultivo, las técnicas de detección de antígeno y los métodos moleculares y los métodos indirectos como la serología.

1.- Métodos serológicos.

Consiste en detectar la presencia de anticuerpos frente al antígeno hemaglutinina del virus influenza en el suero del paciente. Las técnicas más utilizadas son la fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y la neutralización. La principal limitación de la serología es la necesidad de tener sueros pareados. Esto se requiere debido a que la infección por los virus de la gripe es frecuentemente una reinfección. Por tanto, se necesita un suero de la fase aguda del cuadro gripal y otro suero entre 2 y 4 semanas después del mismo para poder observar un aumento significativo, es decir seroconversión, en el título de anticuerpos. Esto hace que el diagnóstico sea retrospectivo. Raramente se utilizan en la práctica clínica habitual, aunque pueden ser útiles en la vigilancia epidemiológica de la circulación del virus.

2.- Detección de antígenos víricos.

Los métodos de inmunofluorescencia (IF), utilizan anticuerpos monoclonales específicos para la detección de antígenos víricos directamente en la muestra clínica o bien en las células del cultivo en las que previamente se ha inoculado la muestra (Figura 1). Se requiere un microscopio de fluorescencia y entrenamiento en la observación de las preparaciones. Nos permiten diferenciar virus de la gripe A y B e incluso podemos determinar los subtipos H1 y H3 del virus de la gripe A.

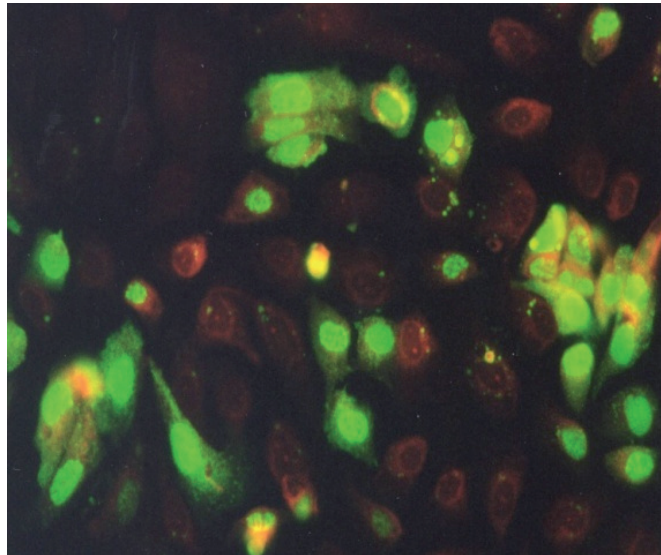


Figura 1. Resultado positivo de Inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de la gripe.

En los últimos años se han comercializado técnicas de inmunocromatografía (IC) que permiten detectar antígeno vírico en pocos minutos de una manera sencilla y con buena especificidad (Figura 2). Con estas técnicas sólo se puede llegar a la diferenciación del virus de la gripe A del tipo de la gripe B.

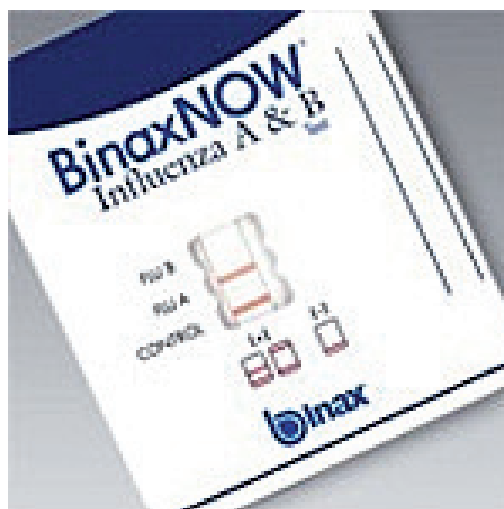


Figura 2. Prueba positiva de inmunocromatografía para la detección del virus de la gripe.

La principal ventaja de estas técnicas es la rápida obtención de resultados (aproximadamente 4 horas en la IF y 30 minutos en la IC). Sin embargo su mayor limitación es la sensibilidad por debajo del cultivo y de las técnicas moleculares; por otro lado, a menudo los resultados van a ser difíciles de interpretar y dependerá de la experiencia de la persona que los realice.

En este tipo de técnicas la calidad de las muestras es fundamental, obteniéndose los mejores resultados en los niños (los cuales presentan una carga viral mayor que los adultos) y cuando las muestras se recogen en las primeras 48 horas del comienzo de los síntomas.

Dada la limitada sensibilidad de estas técnicas, un resultado negativo no descartará la infección por virus influenza y se deberá confirmar con el cultivo celular o técnicas de detección de ácidos nucleicos. Sin embargo un resultado positivo es útil debido a que presentan buena especificidad.

3.- Aislamiento del virus mediante cultivo celular

Los virus de la gripe son intracelulares obligados y por tanto capaces de replicarse en diferentes líneas celulares, siendo la línea más utilizada la compuesta de células Madin Darby de riñón de perro (MDCK). La identificación del crecimiento del virus sobre la monocapa de células se realiza mediante la observación del efecto citopático causado en ellas. Sin embargo este efecto citopático no es específico y puede estar causado por diversos virus respiratorios, por tanto la identificación del virus aislado se efectúa generalmente por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. Una de las principales limitaciones de este cultivo celular convencional es el tiempo necesario para el crecimiento e identificación del virus, aunque generalmente es de 4 - 5 días puede prolongarse hasta 14 días. Para resolver este inconveniente, se ha desarrollado la técnica de shell-vial, en la cual las muestras son directamente centrifugadas sobre la monocapa celular para favorecer la adherencia y penetración vírica; posteriormente, a las 24 - 48 horas y antes de la aparición del efecto citopático, se detecta la presencia de partículas víricas mediante inmunofluorescencia.

El aislamiento viral ha sido clásicamente el método de referencia en el diagnóstico de los virus respiratorios, sin embargo actualmente sólo se realiza en laboratorios especializados con una infraestructura adecuada. Generalmente es más sensible que las técnicas de detección de antígenos, presenta las ventajas de poder recuperar las cepas para realizar estudios posteriores de tipificación y sensibilidad a los antivíricos y en contraste a los métodos moleculares es capaz de detectar virus viable lo cual puede ser fundamental para el manejo del paciente.

4.- Detección de ácidos nucleicos

Estas técnicas están remplazando al cultivo celular como técnica de referencia, debido a su alta sensibilidad y especificidad, además de permitirnos dar un resultado en horas. En este tipo de técnicas aunque la calidad de la muestra es importante, es menos crítica que para el cultivo, ya que no es necesario que las células estén preservadas y el virus viable.

Entre los métodos de biología molecular aplicados a la detección de los virus gripales, la amplificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más empleada, ya sea a tiempo final o real, tanto casera como comercializada.

Los métodos de PCR a tiempo real están desplazando a los de tiempo final ya que permiten la cuantificación, lo cual puede ser útil en el estudio de la evolución del paciente y en su respuesta al tratamiento, además de reducir el riesgo de contaminación y el tiempo requerido en la emisión de resultados. Siempre la reacción de amplificación debe ir precedida de una transcripción reversa para transformar en ADN cualquiera de los segmentos de ARN que contiene el genoma de estos virus. Los segmentos diana suelen seleccionarse en genes muy conservados como los que codifican para la proteína de matriz (M), nucleoproteína (NP) o el segmento génico NS, que permiten diferenciar entre los 3 géneros (A, B, C) con independencia de las tasas de evolución del virus. Los genes considerados de más interés para vigilar la infección producida por virus gripales son la HA y NA, que en el caso de los virus gripales A definen el subtipo. La variabilidad genética, consecuencia de mutaciones espontáneas, es más evidente en estos genes codificantes de proteínas de superficie, que son los que están sujetos a presión inmunológica. Existen técnicas de PCR seguidas de hibridación con sondas mediante enzimoanálisis (PCR-EIA) o microarrays y biochips. Estas técnicas nos permiten el procesamiento de una elevada cantidad de muestras por cada ensayo y posibilitan el análisis simultáneo de varios genes pertenecientes a un mismo organismo. Sin embargo, no permiten el análisis posterior del producto amplificado.

Los métodos de PCR pueden acoplarse a técnicas de tipado y caracterización, como la determinación del polimorfismo genómico en función de los fragmentos obtenidos tras su digestión de éste con enzimas de restricción (RFLP) y especialmente, la secuenciación completa o parcial de los segmentos génicos virales. La PCR-RFLP es capaz de subtipar HA y NA, a la vez de caracterizar genes internos, lo que facilita la detección de recombinantes y la determinación del origen de los distintos segmentos (humano o zoonótico). Tiene el inconveniente de no permitir la automatización ni la diferenciación entre genes con bajo nivel de polimorfismo. Una caracterización genética más precisa puede realizarse mediante secuenciación seguida de análisis filogenético y del estudio de aquellas posiciones (aminoácidos) clave implicadas en alguna actividad biológica: unión a receptores, capacidad antigénica, actividad enzimática o unión de antivíricos y cuyo cambio pueda tener repercusión clínica y patogénica de la cepa estudiada. Por tanto, la secuenciación de genes como la HA, NA y el segmento M aportan mucha información en la caracterización y la epidemiología molecular. La HA es el principal determinante antigénico de los virus gripales y la secuenciación proporciona información referente a las características antigénicas y de afinidad por el receptor. La NA, presenta menor capacidad antigénica que la HA y una de las principales aplicaciones de su secuenciación es el seguimiento de las resistencias genotípicas a los inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir y oseltamivir). De igual manera la secuenciación del segmento M, permite detectar cambios que confieren resistencia a los adamantanos (amantadina y rimantadina).

Finalmente, hay que tener en cuenta que la clínica de la infección respiratoria no es específica y puede ser debida a otros virus respiratorios distintos al virus de la gripe. Actualmente, existe una gran diversidad de técnicas de PCR múltiple que permiten detectar simultáneamente los virus gripales A y B, además de adenovirus, virus respiratorio sincitial, parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus, bocavirus y coronavirus. Tampoco debemos olvidar, que la neumonía bacteriana puede ser una complicación de la infección por el virus de la gripe. Por tanto en paciente graves, la detección del virus de la gripe no debe excluir el estudio de bacterias, principalmente *Streptococcus pneumoniae*, ya que el resultado va a ser muy importante en el manejo del paciente.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	TIEMPO EN OBTENER EL RESULTADO	VENTAJAS
Detección de ácidos nucleicos	2 h-2 días	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad y especificidad • Distingue tipos y subtipos de virus influenza • Detecta otros virus respiratorios simultáneamente usando técnicas de PCR múltiple • Permiten realizar estudios de caracterización y epidemiología molecular
Detección de antígenos víricos		<ul style="list-style-type: none"> • Rápido • IC requiere mínima infraestructura y experiencia técnica
- Inmunocromatografía (IC)	<30 min	
- Inmunofluorescencia (IF)	– 4 h	
Aislamiento del virus en cultivo celular	2-14 días	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor sensibilidad que la detección de antígenos • Permite recuperar las cepas para realizar estudios de tipificación y sensibilidad a los antivíricos • Detecta virus viable
Métodos serológicos	3-10 días	<ul style="list-style-type: none"> • Útiles en la vigilancia epidemiológica de la circulación del virus

Tabla 1. Comparación de métodos diagnósticos.

BIBLIOGRAFÍA

Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostics tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 156: 500-511.

Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA* 2013; 16: 275-282.

De Roux A, Marcos MA, Garcia E, Mensa J, Ewig S, Lode H, et al. Viral community-acquired pneumonia in nonimmunocompromised adults. *Chest* 2004; 125:1343-1351

Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 79-82

Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 2009; 361: 1935-1944.

Kuypers J, Campbell AP, Cent A, Corey L, Boeckh M. Comparison of conventional and molecular detection of respiratory viruses in hematopoietic cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 298-303.

Li IW, Cha KH, To KW, Wong SS, Ho PL, Lau SK, et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5 N1 viruses. *J Clin Virol* 2009; 46:325-330

Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48:217-249.

Marcos MA, Camps M, Pumarola T, Martinez JA, Martinez E, Mensa J, et al. The role of viruses in the aetiology of community-acquired pneumoniae in adults. *Antivir Ther* 2006; 11: 351-9.

Reinois F, Talmud D, Huguenin A, Moutte L, Strady C, Chosson J, et al. Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray system. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3836-3842.

To KK, Chan KH, Li LW, Tsang TY, Tse H, Chan JF, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* 2010; 82:1-7.

Wang R, Taubenberger JK. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 517-527.

WHO information for laboratory diagnosis of influenza www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recomendations/en/index.html. Consultado en <http://www.who.int/topics/influenza/en> 2013

Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH, et al. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1889-1892.

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

M. Rodríguez (*presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, MC. Villà

ISSN 1887-6463 – Noviembre 2013 (recibido para su publicación Mayo 2013)