

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

29.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios

2 0 0 8

Coordinador: José M Eiros Bouza

Autores: Inmaculada Casas Flecha
José M Eiros Bouza
Raúl Ortiz de Lejarazu
Pilar Pérez Breña
Francisco Pozo Sánchez
Guillermo Ruiz Carrascoso
Alberto Tenorio Abreu



ISBN-978-84-612-6087-4

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

- 1. Introducción**
- 2. Principales focalidades clínicas y agentes implicados**
- 3. Virus de la gripe**
 - 3.1. Morfología y estructura
 - 3.2. Variaciones antigénicas
 - 3.3. Epidemiología
 - 3.4. Protagonismo del virus de la gripe A H5N1
 - 3.5. Vigilancia
 - 3.6. Diagnóstico virológico
 - 3.6.1. Recogida y transporte de muestras
 - 3.6.2. Aislamiento mediante cultivo
 - 3.6.3. Detección de antígenos víricos
 - 3.6.4. Detección de ácidos nucleicos
 - 3.6.5. Técnicas de amplificación genómica basadas en la reacción en cadena de la polimerasa
 - 3.6.6. Técnicas de hibridación
 - 3.6.7. Caracterización genética de los virus gripales
 - 3.6.8. Secuenciación
 - 3.6.9. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
 - 3.6.10. Detección de la respuesta inmunitaria humoral específica
- 4. Virus respiratorio sincitial**
- 5. Virus parainfluenza**
- 6. Coronavirus**
- 7. Bocavirus humanos**
- 8. Metapneumovirus humanos**
- 9. Picornavirus**
- 10. Rinovirus**
- 11. Adenovirus**
- 12. Diagnóstico de otros virus respiratorios**
 - 12.1. Aislamiento mediante cultivo
 - 12.2. Tipos de muestra y conservación para el aislamiento de virus respiratorios
 - 12.3. Factores que influyen en el aislamiento vírico
 - 12.4. Principales líneas celulares para aislamiento de virus respiratorios
 - 12.5. Crecimiento de los principales virus respiratorios
 - 12.6. Amplificación genómica por técnicas moleculares
- 13. Bibliografía**
 - 13.1 Virus de la gripe
 - 13.2 Otros virus respiratorios

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT- VR-01. Detección de antígenos en cultivo (*shell vial*) para virus de la gripe y otros virus respiratorios**
- 2. PNT-VR-02. Diagnóstico de infecciones por virus gripales mediante inmunofluorescencia directa en muestras respiratorias**
- 3. PNT-VR-03. Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a inhibidores de neuraminidasa en virus gripales A epidémicos**
- 4. PNT-VR-04. Detección de metapneumovirus humano en muestras respiratorias**
- 5. PNT-VR-05. Detección de bocavirus humano en muestras respiratorias**

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

29. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR VIRUS RESPIRATORIOS. 2008

Coordinador: José M. Eiros Bouza

**Autores: Inmaculada Casas Flecha
José M Eiros Bouza
Raúl Ortiz de Lejarazu
Pilar Pérez Breña
Francisco Pozo Sánchez
Guillermo Ruiz Carrascoso
Alberto Tenorio Abreu**

1. INTRODUCCIÓN

La infección respiratoria aguda es la patología más frecuente a lo largo de toda la vida del ser humano. En nuestro país, atendiendo a los datos publicados en pacientes en edad infantil, las enfermedades infecciosas son el motivo de más del 60% de las consultas en pediatría extrahospitalaria. De ellas, aproximadamente el 70% corresponde a una infección respiratoria y más de la mitad de estas son de origen vírico. La mayoría de las infecciones respiratorias sólo afectan al tracto respiratorio superior y pueden ser consideradas leves, de curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis). Sin embargo, se estima que alrededor del 5% pueden implicar al tracto respiratorio inferior (bronquitis, bronquiolitis y neumonía). Son infecciones potencialmente más

graves que, en muchos casos, requieren el ingreso hospitalario.

En edad adulta las infecciones respiratorias de origen vírico son una causa importante de morbilidad, sin embargo los cuadros clínicos que precisan atención médica prácticamente se limitan a ancianos y a pacientes severamente inmunodeprimidos o con una patología pulmonar subyacente.

2. PRINCIPALES FOCALIDADES CLÍNICAS Y AGENTES IMPLICADOS

Además de los virus de la gripe A, B y C, se han identificado más de doscientos virus diferentes. Se distribuyen en seis familias (Tabla 1) y están implicados en la patogénesis del conjunto de cuadros clínicos que pueden reconocerse en la infección del tracto respiratorio.

Tabla 1. Virus asociados con síndromes respiratorios en el ser humano.

| Familia | Género | Virus | Tipos y subtipos | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| <i>Orthomyxoviridae</i> | <i>Influenzavirus A</i> | Virus de la gripe A | H1N1 | |
| | | | H3N2 | |
| | | | H5N1 | |
| | <i>Influenzavirus B</i> | Virus de la gripe B | H7N7 | |
| | | | <i>Influenzavirus C</i> | H7N3 |
| | | | <i>Respirovirus</i> | H9N2 |
| <i>Paramyxoviridae</i> | <i>Rubulavirus</i> | Virus parainfluenza 1 | | |
| | | Virus parainfluenza 3 | | |
| | | Virus parainfluenza 2 | VPI-4A | |
| | | Virus parainfluenza 4 | VPI-4B | |
| | <i>Metapneumovirus</i> | Metapneumovirus humano | | |
| | | | <i>Pneumovirus</i> | VRS-A |
| <i>Picornaviridae</i> | <i>Enterovirus</i> | | VRS-B | |
| | | | <i>Rhinovirus</i> | |
| <i>Coronaviridae</i> | <i>Coronavirus</i> | Coronavirus 229E | | |
| | | Coronavirus OC43 | | |
| | | Coronavirus SARS | | |
| | | Coronavirus NL63 | | |
| | | Coronavirus HKU1 | | |
| <i>Adenoviridae</i> | <i>Mastadenovirus</i> | Adenovirus | | |
| <i>Parvoviridae</i> | <i>Bocavirus</i> | Bocavirus humano | | |

Como característica general de estas infecciones, cada uno de los virus puede ser el agente etiológico de más de un síndrome diferente (Tablas 2 y 3). Sin embargo, cada uno de ellos se asocia mayoritariamente con un tipo particular de enfermedad, dependiendo en muchos casos del área geográfica, de la estacionalidad y de la edad del paciente. Como ejemplo, en nuestro entorno los rinovirus son la causa más frecuente de catarro común en los adultos, el virus respiratorio sincitial (VRS) es el más prevalente en las bronquiolitis de niños de corta edad y el virus parainfluenza tipo 1 es el agente responsable del mayor número de casos de laringotraqueobronquitis aguda. Sin embargo, estos mismos cuadros pueden estar también ocasionados por otros agentes víricos. Las características epidemiológicas de algunos de estos virus les confieren propiedades que también pueden ser identificativas. Los virus parainfluenza 1 y 2, de la gripe y VRS suelen aparecer de forma epidémica, habitualmente en otoño los virus parainfluenza, en tanto que los brotes de gripe y VRS se suelen producir en invierno y al comienzo de la primavera.

Las focalidades infecciosas, consideradas con un criterio didáctico, son las siguientes: resfriado común, faringitis aguda, laringitis aguda, laringotraqueobronquitis aguda, otitis media aguda, sinusitis, epiglotitis, bronquitis aguda, exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiolitis y neumonía.

El resfriado o catarro común deriva de la inflamación de las vías nasales y la faringe y con frecuencia de la afectación concomitante de los senos paranasales, el oído medio y el árbol traqueobronquial. Es una de las principales causas de morbilidad aguda en los países occidentales y en su etiología se implican diferentes virus (Tablas 2 y 3). Su período de incubación suele oscilar entre 12 y 72 horas y los síntomas suelen incluir obstrucción nasal, rinorrea, estornudos, molestias o dolor de garganta y tos. La máxima expresividad clínica se alcanza a los dos o tres días y la duración media se sitúa en torno a la semana. En la exploración los hallazgos suelen ser mínimos. El patrón estacional revela en nuestro medio su prevalencia más elevada en los meses fríos del invierno, si bien las variables que predicen su aparición no son bien conocidas.

La faringitis aguda es un síndrome inflamatorio de la faringe, que en la mayoría de los casos es de etiología vírica y se integra en otros cuadros como el catarro común y la gripe. Es importante señalar que además de los virus reflejados en las Tablas 2 y 3 también se documenta en el contexto de la primoinfección por el VIH y por algunos herpes virus tales como el virus de Epstein-Barr, los herpes simplex y el citomegalovirus, objeto de revisión en otros procedimientos. La mayoría de los casos de faringitis se producen en los meses fríos del año aunque se asocia mayoritariamente con los rinovirus en otoño y primavera. El síntoma clínico predominante suele ser el dolor y la irritación faríngea que disminuyen en escasos días.

La laringitis se asocia a la presencia de ronquera con tos seca con una mediana de duración de tres

días. Todos los virus respiratorios clásicos se han implicado en su etiología.

La laringotraqueobronquitis aguda o crup es una infección vírica de las vías respiratorias superiores e inferiores que afecta preferentemente a niños pequeños. Cursa con inflamación en la zona subglótica y un cuadro llamativo de disnea acompañada de una inspiración estridente característica. En la Tabla 3 se indican los agentes etiológicos involucrados en el cuadro y su máxima prevalencia es variable en función del tipo de agente y de la estación del año.

En la otitis media aguda se documenta la presencia de líquido en el oído medio, acompañado de fiebre, dolor y alteraciones de la audición. Los virus suelen estar involucrados en su etiología de manera aislada, o más frecuentemente asociados a bacterias.

La sinusitis aguda consiste en una afección inflamatoria de uno o más senos paranasales. Su categorización obedece a diversos parámetros tales como el estado inmunitario del paciente y su origen comunitario o nosocomial. La etiología vírica de la misma se documenta en el contexto de otras focalidades respiratorias de vías altas entre las que destacan el resfriado común. Por ello la clínica coincide con la de aquel, si bien persiste en el tiempo.

La epiglotitis aguda consiste en una celulitis de la epiglotis y de las estructuras adyacentes que pueden condicionar la obstrucción de las vías respiratorias, afectando fundamentalmente a niños preescolares y siendo la etiología vírica poco prevalente.

La bronquitis aguda supone la existencia de un cuadro inflamatorio del árbol traqueobronquial de etiología fundamentalmente vírica y prevalencia invernal. En la Tabla 2 se reflejan los agentes etiológicos más frecuentemente implicados. Clínicamente la tos suele aparecer de forma preeminente sobre otros síntomas y su duración se mantienen a lo largo de varias semanas.

Los episodios de exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica pueden asociarse a la infección por virus respiratorios, entre los que destacan el VRS, si bien la etiología bacteriana mantiene un gran protagonismo.

La bronquiolitis es una enfermedad vírica aguda de las vías respiratorias inferiores que suele cursar con tos, rinorrea, taquipnea y disnea. La etiología vírica presenta un claro protagonismo tal como se refleja en la Tabla 3.

La neumonía está causada por gran número de microorganismos tanto bacterianos, víricos, micóticos y protozoarios. Conceptualmente presenta gran interés para el microbiólogo la caracterización de su adquisición comunitaria o nosocomial, así como establecer el estrato etario en el que se documenta. Por lo que hace referencia a su etiología vírica los agentes más frecuentemente implicados se reflejan en las Tablas 2 y 3, y sus características clínicas se describen con precisión en los protocolos clínicos de la SEIMC.

Tabla 2. Etiología vírica de los síndromes respiratorios en adultos

| Virus | Catarro común | Faringitis | Traqueobronquitis | Neumonía |
|------------------------------|---------------|------------|-------------------|----------|
| Virus respiratorio sincitial | + | + | + | - |
| Virus parainfluenza 1 | + | + | + | - |
| Virus parainfluenza 2 | + | + | + | - |
| Virus parainfluenza 3 | + | + | + | - |
| Virus parainfluenza 4 | + | + | + | - |
| Metapneumovirus humano | + | + | + | - |
| Virus influenza A | + | 2+ | 3+ | 2+ |
| Virus influenza B | + | 2+ | 2+ | + |
| Rinovirus | 4+ | 2+ | + | + |
| Coronavirus | + | + | + | + |
| Enterovirus | + | + | + | + |
| Adenovirus | + | + | + | + |

Símbolos de frecuencia relativa: + (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).

3. VIRUS DE LA GRIPE

3.1. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Los virus gripales se incluyen en la familia *Orthomyxoviridae*, que en la actualidad agrupa cinco géneros. Todos ellos son virus con ARN monocatenario, de tamaño medio, simetría helicoidal y provistos de una membrana de envoltura. La denominación de “myxovirus” se relaciona con su afinidad por la mucina, mucoproteína existente en el moco de diversas secreciones, en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero.

Los virus gripales A y B (virus influenza A y B) constituyen los géneros más importantes. El virus gripal C constituye un tercer género, con escaso interés en patología humana, y difiere en determinadas características del género anterior. El cuarto género es de descripción más reciente, se ha denominado “Virus Togoto”, con un interés también reducido en el ámbito clínico. El quinto género está integrado por los Isavirus, de interés veterinario.

En la Tabla 4 se exponen las características más relevantes de los virus gripales A y B. Los viriones poseen una forma esférica o filamentosa y en su interior albergan un nucleocápside que contiene ocho fragmentos de ARN monocatenario, una nucleoproteína y el complejo ARN-polimerasa. En el exterior de este nucleocápside y por debajo de la membrana de envoltura se sitúan la proteína matriz (M1), que confiere estabilidad a la partícula vírica y la proteína M2.

En la parte más externa se sitúa la membrana de envoltura, que procede de la membrana citoplasmática de la célula huésped y es de naturaleza lipídica. En ella asientan glucoproteínas de origen vírico, dispuestas a modo de proyecciones

denominadas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). El componente glucoproteico más importante es la HA, que constituye en torno al 25% de las proteínas víricas. Cada virión presenta alrededor de un millar de proyecciones, dispuestas a modo de espículas superficiales, formadas cada una por un trímero de tres subunidades idénticas, que en conjunto poseen un peso molecular de 250 kD. Entre sus funciones biológicas cabe destacar que es responsable tanto de la fijación del virus a los receptores mucoproteicos de las células del epitelio respiratorio (que contienen ácido N-acetilneuramínico) como de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular.

La NA representa alrededor del 5% de las proteínas totales del virión, el cual presenta del orden de 200 moléculas de la misma. Estas están constituidas por cuatro subunidades idénticas que forman un tetrámero de 240 kD. Su actividad funcional se caracteriza por ser una N-acetilneuraminilhidrolasa (sialidasa), provocando la liberación del ácido N-acetilneuramínico, constituyente de todas las mucinas. Por ello colabora con la HA en los procesos de fusión y penetración celular así como en la liberación de nuevos viriones, difusión de los mismos y apoptosis celular.

3.2. VARIACIONES ANTIGÉNICAS

Los virus gripales poseen dos clases de antígenos. En primer término en el centro del virión se encuentran los denominados antígenos “internos”, que son la nucleoproteína y la proteína M1, ambos específicos de tipo.

Tabla 3. Etiología vírica de los síndromes respiratorios en niños

| Virus | Catarro común | Faringitis | Laringotraqueo-bronquitis (crup) | Neumonía | Bronquiolitis |
|------------------------------|---------------|------------|----------------------------------|----------|---------------|
| Virus respiratorio sincitial | 3+ | 2+ | 2+ | 4+ | 4+ |
| Virus parainfluenza 1 | 3+ | 2+ | 4+ | 2+ | 2+ |
| Virus parainfluenza 2 | 2+ | + | + | + | + |
| Virus parainfluenza 3 | 3+ | 2+ | 2+ | 3+ | 3+ |
| Virus parainfluenza 4 | 2+ | + | + | + | + |
| Metapneumovirus humano | 2+ | 2+ | + | + | 3+ |
| Virus influenza A | 2+ | 2+ | 2+ | 3+ | 3+ |
| Virus influenza B | 2+ | 2+ | + | + | + |
| Rinovirus | 2+ | 2+ | + | + | + |
| Coronavirus | + | + | + | + | + |
| Enterovirus | + | + | + | + | + |
| Adenovirus | 3+ | 2+ | + | + | + |
| Bocavirus humano | 2+ | 2+ | + | 2+ | 3+ |

Símbolos de frecuencia relativa: + (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).

Tabla 4. Principales características de los virus gripales A y B.

| | |
|-----------------------------|--|
| Tipos | Dos. Definidos por la nucleoproteína: virus gripal A y virus gripal B |
| Subtipos | Diversos en el virus gripal A definidos por las glucoproteínas de superficie |
| Acido nucleico | ARN monocatenario de polaridad negativa |
| Simetría | Helicoidal |
| Envoltura | Lipídica con proyecciones glucoproteicas |
| Forma del virión | Esférica o filamentosa |
| Diámetro del virión | 50-120 nm |
| Genoma | 8 segmentos de ARN |
| Proyecciones glucoproteicas | Hemaglutinina (H) y Neuraminidasa (N) |

En segundo lugar y situados externamente, están los antígenos "superficiales", que son la Hemaglutinina y la Neuraminidasa, ambos específicos de subtipo. Los diferentes subtipos se denominan con la letra inicial H o N seguida de un número arábigo convencional. En el virus gripal A se han descrito dieciséis subtipos de H y nueve de N, pero sólo una pequeña proporción se implican en la gripe humana.

La marcada capacidad de estos virus para sufrir variaciones en sus antígenos les otorga una especial trascendencia desde el punto de vista epidemiológico, fundamentalmente cuando éstas afectan a los antígenos superficiales. En este sentido se pueden establecer dos grandes grupos de variaciones. Las variaciones menores o deslizamientos antigénicos (*antigenic drift*) que afectan sobre todo a la HA y suponen la aparición de una nueva cepa o variante frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por

exposiciones anteriores a las cepas originarias. Con el cambio gradual de los antígenos superficiales surge una serie de nuevas variantes, cada una diferente de su predecesora y más alejada del subtipo inicial, pero conservándose éste. Los casos de gripe que se presentan en las estaciones frías y primavera, en forma esporádica o en brotes epidémicos más o menos extensos, están producidos por las variantes menores. Las variantes mayores o sustituciones antigénicas (*antigenic shift*) implican el cambio total del antígeno H, del antígeno N o de ambos. Suponen la aparición de un subtipo diferente del difundido hasta entonces en la población, frente al cual ésta carece totalmente de experiencia inmunológica y, por consiguiente, de inmunidad. Las pandemias gripales ocurren generalmente como consecuencia de la aparición de un nuevo subtipo del virus gripal A por una variación mayor.

Los virus gripales se clasifican por sus antígenos profundos, fundamentalmente la nucleoproteína, en dos tipos antigénicos, A y B. El tipo A se subdivide en subtipos por sus antígenos superficiales (H y N), y cada subtipo incluye un número ilimitado de variantes definidas por las características propias de los antígenos superficiales de una cepa determinada. La denominación de los virus aislados se establece consignando las características que se citan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características sobre las que asienta la denominación de los virus gripales

| |
|--|
| Tipo antigénico: A o B |
| Origen geográfico |
| Número de la cepa en el laboratorio de origen |
| Año de aislamiento |
| Fórmula de sus antígenos superficiales: subtipo H y subtipo N* |

*En el caso del virus B no existe este dato

3.3. EPIDEMIOLOGIA

Los virus gripales A y B constituyen los tipos más importante de Orthomyxovirus y son los causantes fundamentales del síndrome gripal, implicándose en menor medida el influenzavirus tipo C. Todos ellos producen infecciones respiratorias que provocan una repercusión sistémica importante.

Los virus gripales A están ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies animales. El estudio de su ecología resulta fundamental para el conocimiento de la historia natural de la gripe A. Diversos mamíferos sufren epizootias importantes, en particular los cerdos, caballos y mamíferos marinos (focas, ballenas), y de forma esporádica perros, gatos, bóvidos y monos; también se han descrito casos en murciélagos, visones y renos verosímilmente al entrar en el ciclo ecológico de las aves salvajes. Las aves salvajes, y en particular los patos y otras especies migratorias afines, constituyen el reservorio central de la gripe A. Pero más que un reservorio en el sentido epidemiológico clásico representan un depósito natural de un amplio *pool* de genes; un reservorio genético en el que existen frecuentes ocasiones para la recombinación genética, la diseminación por vía fecal y la difusión de los virus por todo el mundo. Las aves domésticas constituyen un reservorio secundario relacionado con el anterior. Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la posibilidad de persistencia de determinados subtipos y por constituir un probable eslabón para la infección humana. La transmisión interespecies de los virus gripales A es un hecho comprobado, pero la especificidad de especie es importante. Son raros los casos de infección humana con un virus de origen animal bien documentado.

La única fuente de infección es el hombre enfermo o portador de formas paucisintomáticas. La transmisión ocurre siempre por mecanismo aéreo directo, como resulta obligado por la fragilidad del virus en el medio externo. Los fenómenos de

agregación, más frecuentes en los meses fríos y en las instituciones cerradas, favorecen la difusión de los virus gripales, cuya transmisibilidad es una de las más importantes entre todas las infecciones humanas. Toda la población es susceptible; la única limitación se debe a la existencia de inmunidad por contactos previos con virus idénticos o antigénicamente próximos.

La gripe se presenta en forma de brotes epidémicos más o menos importantes, habitualmente todos los años y durante los meses fríos, como consecuencia de las variaciones menores de los virus A y B. Las epidemias progresan en la población a través de los grupos familiares y en las instituciones cerradas (tales como guarderías, colegios o residencias de ancianos) y pueden afectar a la mayoría de las personas.

La gripe A puede, además, ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición de variantes mayores frente a las que la población carece absolutamente de inmunidad. Se presentan varias ondas epidémicas, que no ocurren necesariamente en los meses fríos, y afectan en pocos meses a todo el mundo.

Desde el punto de vista de la salud pública su importancia reside tanto en la elevada mortalidad que origina en las poblaciones, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardiorrespiratoria en grupos denominados de riesgo. Por último, origina importantes costes sociales y sanitarios, derivados del absentismo laboral que provoca y merced a los gastos que ocasiona su asistencia.

3.4. PROTAGONISMO DEL VIRUS DE LA GRIPE A H5N1

El protagonismo que ha alcanzado el virus de la gripe A del subtipo H5N1 se remonta, hasta donde conocemos, a finales de 1997, fecha en la que tuvo lugar en Hong Kong (China) un brote de gripe aviar ocasionado por este agente. Además de los millones de aves afectadas se registraron al menos 18 casos en humanos, seis de ellos mortales. Con posterioridad se han documentado otros episodios por virus gripal A aviar del subtipo H9N2 en China; por H7N7 en Holanda en 2003 con un caso mortal y en 2004 en Canadá por H7N3, hechos que ilustran el vínculo existente entre virus gripales humanos y animales. Este riesgo se ha visto confirmado por el brote actual del subtipo A H5N1 en Asia con casi tres centenares de casos, más de la mitad mortales, hasta el momento actual. La endemia asiática del subtipo H5N1, la existencia de infecciones silenciosas o asintomáticas en aves domésticas, la infección de otros mamíferos y la posible transmisión de persona a persona son acontecimientos epidémicos que justifican la preocupación expresada por los expertos y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por este subtipo aviar respecto a la aparición de una nueva pandemia de gripe.

Desde el punto de vista epidemiológico la gripe ha dejado de ser considerada una enfermedad

exclusivamente humana para pasar a valorarse la importancia de la gripe animal y su influencia en la génesis de pandemias. En la última década este tema ha vuelto a ser objeto de máxima atención debido a la necesidad de poner a punto planes de medidas ante la posibilidad de difusión de un subtipo de virus gripal aviar con potencial pandémico. De manera consecutiva expondremos algunos aspectos relativos a la estructura, espectro de huéspedes y ecología de los virus de la gripe A H5N1 y a continuación comentaremos su potencial pandémico.

Existen tres razones por las cuales los virus de la gripe A persisten en la naturaleza: a) la existencia un amplio reservorio aviar, b) los fenómenos de variabilidad genética y c) la posibilidad de salto a otras especies. La variabilidad genética en los virus gripales afecta a sus antígenos y a otras propiedades biológicas como la virulencia o el espectro de huéspedes a los que es capaz de infectar. Dicha variabilidad puede afectar a las 10 proteínas codificadas por sus 8 genes siendo las más importantes las de los genes 4 (Hemaglutinina) y 6 (Neuraminidasa) por codificar antígenos superficiales relacionados con la protección y afinidad por receptores celulares (HA) y capacidad de difusión (NA). En el salto de especie de un virus animal de la gripe A a los seres humanos son importantes los receptores en las células diana. Los virus de linajes humanos muestran afinidad por receptores de tipo Neu, α 2,6 mientras que los aviares son Neu, α 2,3 y su localización anatómica es distinta. En los humanos con receptores preferentemente de tipo Neu, α 2,6 existen algunos de tipo aviar (Neu, α 2,3) que se encuentran localizados en vías más profundas a nivel alveolar y pulmonar. Ello explica la posibilidad de que en ambientes con elevadas concentraciones de virus éstos puedan llegar a las partes más distales del aparato respiratorio, logrando infectar a huéspedes que tienen otros receptores distintos. Sin embargo esta circunstancia no explica la aparente dificultad de salto de barrera genética. Otros genes internos del complejo polimerasa (PB1, PB2, PA) intervienen en la eficaz replicación del virus en células no aviares.

Los aislados recientes de virus A H5N1 han demostrado capacidad de ampliar paulatinamente el espectro de animales mamíferos susceptibles de ser infectados. Además de los casos humanos, se ha demostrado la infección en tigres, leopardos, gatos y cerdos por ingestión de carcasas y restos de aves infectadas por virus H5N1. El espectro de huéspedes y la patogenia de los virus gripales A están condicionados por la constelación genética final. Para infectar a un nuevo huésped, se precisa una adaptación al nuevo organismo que probablemente requiera de múltiples infecciones fallidas. La HA ejerce las funciones más importantes para su infectividad, proporcionando además la especificidad para receptores, las condiciones para su escisión proteolítica en HA1 y HA2, necesaria para la fusión de membranas, paso previo a la infección celular. Por ello es extremadamente importante identificar los cambios mínimos de aminoácidos necesarios que

permitan anticipar si un virus gripal aviar puede replicarse y transmitirse eficientemente en el hombre.

Los virus de la gripe aviar presentaban habitualmente una virulencia baja para las aves domésticas. A partir de los años 60 se describieron cepas de alta patogenicidad, con una gran virulencia en granjas avícolas de gallinas, pollos y pavos. Estas cepas aviares de alta virulencia poseen hemaglutininas H5 o H7 con características peculiares en su HA aparecidas por mutación. Estas hemaglutininas poseen un dominio rico en aminoácidos básicos en el péptido de unión de la región H1 y H2, lo cual facilita la hidrólisis por distintas proteasas además de la tripsina. Dichas proteasas son muy ubicuas y facilitan la afectación de distintos órganos y tejidos. Desde 1959 hasta ahora se han contabilizado centenas de epizootias y en algunos episodios, los virus de alta virulencia se han mantenido durante varios años, incluso tras el sacrificio y reposición de aves. En otros brotes, se ha vuelto de nuevo a la presentación esporádica de infecciones por cepas de baja patogenicidad.

Existe un nuevo escenario condicionado por los actuales acontecimientos de la gripe aviar. En primer término debido a una amplia distribución en países asiáticos y posteriormente en la mayoría de países de Europa y algunos de África. En segundo término, la velocidad de propagación y adaptación del virus a las aves domésticas ha sido notable. El número de granjas avícolas afectadas ha sido enorme en todos los países implicados y las aves sometidas al sacrificio (la única medida eficaz inicialmente) se cuentan en centenares de millones. Un hecho epidemiológico de especial trascendencia ha sido la constatación de brotes por subtipos H5N1 en diversas granjas de Asia con menos mortalidad de la habitual entre aves domésticas, lo que hace más difícil establecer antecedentes de relación epidemiológica entre casos humanos y contacto con animales enfermos y disminuye la primera sospecha de gripe aviar en el ámbito rural.

La capacidad de transmisión al ser humano por contacto o inhalación ha experimentado una gravedad muy importante. Si el incidente de Hong Kong en 1997 supuso una mortalidad humana del 35% en el conjunto de países que han declarado casos humanos hasta 2007 la mortalidad ronda el 60%. Tras los esfuerzos de los expertos de la OMS y las autoridades sanitarias de los países afectados, se asiste ahora a un periodo de preocupación lógica. El sacrificio interrumpe sólo temporalmente la propagación entre las aves domésticas. El riesgo de infección persiste mientras exista un reservorio salvaje que infecta regularmente al doméstico. El virus responsable (A H5N1) ha mostrado una extraordinaria difusión en los distintos corredores migratorios del continente asiático y euroasiáticos, exigiendo una extraordinaria vigilancia en el comercio de aves entre países. Estudios recientes demuestran que en los brotes ocurridos en 2006 en diversos países africanos se han descrito distintos linajes genéticos de H5N1 lo que apunta a múltiples entradas del virus ligadas al comercio incontrolado de aves procedentes de países infectados.

Desde hace algunos años se han realizado diferentes predicciones sobre la proximidad de una pandemia que nadie puede precisar cuándo va a aparecer. Los elementos para formular hipótesis sobre el lugar (Sudeste Asiático) e incluso sobre la forma, mecanismo de aparición y los subtipos candidatos implicados añaden nuevo valor a las predicciones. En el momento actual los subtipos H5 son los que más atención epidemiológica y virológica suscitan pero a renglón seguido no se puede menospreciar el riesgo derivado de los subtipos H7 y H9 así como los subtipos H2 de antigua circulación en humanos (pandemia de gripe asiática, H2N2 de 1957-58).

3.5. VIGILANCIA

La vigilancia epidemiológica en la gripe tiene un doble objetivo: por una parte, conocer con prontitud las características epidemiológicas y clínicas de la actividad gripal en la población y, por otra, obtener aislamientos representativos de los virus circulantes para su análisis antigénico; ambos fines sirven como mecanismo de alerta para la toma de las decisiones pertinentes.

Existen diferentes sistemas de vigilancia que varían de unos países a otros en función de su sistema sanitario. La vigilancia puede utilizar múltiples indicadores de variada sensibilidad y especificidad y de diversos orígenes. Los datos de morbilidad, clínicos y epidemiológicos, se obtienen de la declaración de casos de gripe y, eventualmente, de infección respiratoria aguda y neumonía. Otro indicador de gran utilidad es el análisis de la mortalidad por gripe y neumonía. También pueden monitorizarse otros datos médicos, como hospitalizaciones, número de consultas, consultas de urgencias y consumo de medicación antigripal. Los datos indirectos no médicos más útiles son los de absentismo laboral y escolar. En cualquier caso, una adecuada vigilancia exige la combinación de varios indicadores.

El estudio de la morbilidad se basa en algunos países en la información generada por los médicos

generales, pediatras y servicios de salud que informan semanalmente de la actividad gripal; en otros, se atiende más a la información recogida por redes de médicos centinelas sobre los casos de gripe e infección respiratoria aguda registrados en la población que atienden. La información facilitada por la red de vigilancia puede ser recogida y difundida por métodos convencionales o por vía telemática, que tiene, además de su rapidez, la indudable ventaja de una adecuada retroinformación de los servicios de la red. Es fundamental que los datos epidemiológicos se correlacionen con la adecuada información sobre los virus causales circulantes en la población. La información obtenida con los diversos sistemas puede completarse con el control particularizado de algunas instituciones cerradas (residencias de ancianos, guarderías) y determinadas muestras de población, como la militar y la laboral en distintas empresas.

En la actualidad disponen de programas específicos de vigilancia de la gripe la mayoría de los países occidentales y se promueve la comunicación entre las redes de los diversos países europeos. En España existe también una amplia experiencia en la vigilancia de la gripe, y en el momento actual existen programas específicos para la vigilancia en diversas Comunidades Autónomas. Además desde la temporada 1993-1994 se ha puesto en marcha una coordinación de la información facilitada por los laboratorios de diversos centros con capacidad de aislamiento de virus gripales para su difusión a través del Centro Nacional de Epidemiología.

La gripe tiene evidentemente una importancia supranacional. Por ello ha merecido especial atención por la OMS, que en 1954 estableció un Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe (PIVG) que, cada vez más perfeccionado, continúa en la actualidad. Algunos de cuyos objetivos se reflejan en la Tabla 6

Tabla 6. Algunos objetivos del Programa Internacional de Vigilancia de la Gripe (PIVG) de la OMS.

-
1. Recogida y análisis de información epidemiológica
 2. Diagnóstico etiológico de los casos
 3. Aislamiento y caracterización de los virus causales
 4. Realización de estudios seroepidemiológicos sobre inmunidad de la población frente a las diferentes variantes y subtipos
 5. Apoyo a la investigación sobre los virus gripales humanos y animales, la enfermedad gripal y la vacunación antigripal
 6. Recomendaciones sobre la composición de la vacuna
-

3.6. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

En el diagnóstico de la gripe resulta fundamental su documentación virológica, que representa una ayuda primordial en el manejo del paciente y en el control de los brotes epidémicos anuales. Desde un punto de vista teórico este diagnóstico puede adoptar una doble estrategia. De una parte la que se fundamenta en métodos directos,

como los que son capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular y aquellos que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y de ácidos nucleicos). De otra parte se sitúa la estrategia de diagnóstico indirecto que valora la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo

humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

La detección de antígenos y ácidos nucleicos permite la realización de un diagnóstico de laboratorio rápido y preciso ayudando a la toma de decisiones terapéuticas. Por el contrario, el aislamiento en cultivo celular es un diagnóstico lento y tardío en la historia natural de la infección gripal, pero de extraordinaria importancia en su caracterización ya que permite realizar estudios epidemiológicos, antigénicos y filogenéticos con objeto de controlar y actualizar continuamente los datos de la circulación de estos virus. En estos datos se basan las recomendaciones anuales de composición de la vacuna de la gripe. En la actualidad, el interés de la serología reside principalmente en la realización de estudios poblacionales de cobertura vacunal.

3.6.1. Recogida y transporte de muestras. El requisito fundamental a la hora de valorar las muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio es que éstas deben contener el mayor número posible de células epiteliales, que son en las que fundamentalmente se replica el virus. En este sentido resultan apropiadas para la investigación de virus gripales las muestras respiratorias tales como los frotis de faringe o nasofaringe y los lavados o aspirados nasales o bronquiales. Estas muestras deben ser tomadas durante los primeros días de la enfermedad.

El transporte de las muestras debe realizarse a 4°C (o en su defecto congeladas a -70°C) con objeto de asegurar la infectividad de las partículas víricas. La recuperación de los virus gripales a partir de la muestra se favorece utilizando un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores de proteínas, como el suero de albúmina bovina, y antibióticos para reducir el crecimiento de bacterias que integran la microbiota acompañante.

3.6.2. Aislamiento mediante cultivo. Los virus de la gripe son capaces de replicarse en diferentes líneas celulares primarias, diploides o continuas, aunque la susceptibilidad a la infección es baja en la mayoría de ellas. La línea celular más comúnmente utilizada son las células Madin Darby de riñón de perro (MDCK).

Las líneas celulares inoculadas con las muestras respiratorias de los pacientes se incuban a 33-35°C en presencia de tripsina para asegurar la activación proteolítica de los virus. La identificación de la existencia de crecimiento del virus sobre la monocapa de células se realiza de modo convencional mediante la observación del efecto citopático causado sobre ellas, que consiste en la aparición de células degenerativas y redondeadas que se desprenden de la monocapa. La caracterización del virus aislado se efectúa por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. En ocasiones el efecto citopático es difícil de apreciar por lo que es necesario disponer de otros métodos para identificar el crecimiento vírico en los cultivos celulares, como son la hemaglutinación, la hemadsorción o la

detección de antígenos víricos utilizando técnicas de inmunofluorescencia.

Una de las principales limitaciones del aislamiento de los virus de la gripe es el tiempo necesario de crecimiento e identificación en cultivo celular (4-7 días). Existen varios métodos capaces de detectar la presencia de los virus de la gripe de modo más precoz, entre uno y tres días después de la inoculación de la línea celular y antes de la aparición del efecto citopático. El más comúnmente utilizado es el *shell vial*, en el que las muestras son directamente centrifugadas sobre la monocapa celular para facilitar la adherencia y penetración vírica. Posteriormente, a las 24h-48h se detecta la presencia de proteínas víricas mediante inmunofluorescencia.

Los virus de la gripe también pueden aislarse tras inocular la muestra en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados, ya que estos virus se replican profusamente en las células de la cavidad alantoidea del huevo. Los huevos inoculados se incuban a 33-35°C durante tres días para los aislados de virus de la gripe procedentes de mamíferos, y a 37°C para los aislados aviares de virus de la gripe A. Una vez finalizada la incubación, se deben analizar por hemaglutinación los fluidos amniótico y alantoideo en busca de la presencia de actividad vírica. Los virus de la gripe C, sin embargo, solamente crecen en la cavidad amniótica de los embriones de pollo.

3.6.3. Detección de antígenos víricos. La principal ventaja de los métodos basados en la detección de los antígenos víricos es su independencia de la infectividad del virus, aunque la calidad de la muestra es muy importante, ya que debe estar en condiciones óptimas después de su recogida y el transporte hasta el laboratorio. Entre sus ventajas destaca el hecho de que permite una rápida obtención de resultados, generalmente en unas pocas horas después de la recepción de la muestra. Como limitación reseñable cabe apuntar que los resultados a menudo son difíciles de interpretar, la especificidad dependerá de la experiencia del personal que los realice y la sensibilidad suele ser baja. Los métodos de inmunofluorescencia y EIA (enzimo-inmuno análisis) se emplean habitualmente para la detección de los antígenos víricos directamente en la muestra clínica o bien en las células del cultivo en las que previamente se ha inoculado la muestra.

Los antígenos víricos utilizados generalmente para el diagnóstico son en principio las moléculas que se sitúan en la superficie del virus, la hemaglutinina y la neuraminidasa, y que también pueden encontrarse frecuentemente en la superficie de las células infectadas. No obstante, puesto que estas moléculas están sometidas a una continua variación evolutiva, también es posible emplear otras proteínas menos accesibles del virus, como la nucleoproteína, y por ello menos variables. Un aspecto adicional derivado de la actividad de los profesionales en laboratorios de Referencia de Gripe es que con objeto de realizar vigilancia y estudios epidemiológicos, es importante realizar el subtipado

de los virus de la gripe A. La diferenciación del virus de la gripe A del tipo B es tan importante como la diferenciación de los subtipos H1 y H3 dentro de los virus de la gripe A. Por ello, también se comercializan actualmente anticuerpos monoclonales que permiten distinguir específicamente el subtipo H1 del H3.

Adicionalmente se han comercializado técnicas de inmunocromatografía capilar y de enzimoanálisis de membrana que posibilitan detectar la presencia de virus gripales o sus antígenos en pocos minutos y de lectura visual sin la necesidad de instrumental. Estos ensayos ofrecen resultados rápidos y pueden ayudar al clínico en el tratamiento individual de los pacientes. No obstante, su utilidad se ve limitada debido a su elevado coste y baja sensibilidad y especificidad. Por su amplia implantación en la asistencia urgente y en el ámbito pediátrico, en la Tabla 7 se recogen diferentes pruebas de detección rápida disponibles comercialmente en el momento actual aludiendo a sus características operacionales intrínsecas.

3.6.4. Detección de ácidos nucleicos. Los métodos moleculares de diagnóstico que permiten la detección de ácidos nucleicos están basados en la

búsqueda y el reconocimiento del genoma vírico en la muestra clínica o en el cultivo vírico. El empleo de estas técnicas se está incrementando rápidamente, habiendo transformado el diagnóstico de otras entidades infecciosas de etiología vírica; si bien el papel de estos métodos en la rutina diagnóstica de la infección respiratoria y en la detección y caracterización de virus gripales en particular, es aún limitado y de reciente incorporación. En la Tabla 8 están resumidos los métodos moleculares que pueden ser utilizados en la detección y/o caracterización de virus gripales.

3.6.5. Técnicas de amplificación genómica basadas en la reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más empleada tanto en su vertiente clásica o a tiempo final como en la PCR a tiempo real. En ambas la reacción de amplificación tiene que ir precedida de una transcripción reversa para transformar en ADN cualquiera de los 8 segmentos de ARN que contiene el genoma de los virus de la gripe A y B o de los 7 segmentos del genoma del virus de la gripe C.

Tabla 7. Diferentes pruebas de detección rápida de antígenos disponibles para virus gripales.

| Denominación | Compañía | Virus detectados | Muestras aceptables | Sensibilidad | Especificidad |
|--------------------------------|---------------|------------------|---|--------------------------|------------------------|
| Directigen Flu A® | BD | A | Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea | 67-96% | 88-100% |
| Directigen Flu A+B® | BD | A y B | Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea | A: 96% B: 88% | A: 99% B: 97% |
| FLU OIA® | Biostar | A y B | Aspirado nasal, esputo torunda nasofaríngea | 62-88% | 52-80% |
| FLU OIA A/B® | Biostar | A y B | Aspirado nasal, esputo torunda nasofaríngea | 80-95% | 60-70% |
| XPECT FLU A&B® | Remel | A y B | Lavado nasal, torunda nasofaríngea | A: 89-100% B: 93-100% | A: 100% B: 100% |
| NOW Influenza A&B® | Binax | A y B | Lavado nasal, torunda nasofaríngea | A: 100% B: 92-100% | A: 92-93% B: 94-99% |
| QuickVue Influenza Test® | Quidel | A y B | Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea | 73-81% | 96-99% |
| QuickVue Influenza A+B® Test | Quidel | A y B | Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea | A: 72-77% B: 73-82% | A: 96-99% B: 96-99% |
| SAS FluAlert® | SA Scientific | A y B | Aspirado y lavado nasofaríngeo | 65-84% | 95-99% |
| ZstatFlu® | Zyme Tx | A y B | Torunda nasofaríngea | 65-96% | 77-98% |
| Clearview Exact Influenza A&B® | Inverness | A y B | Lavado nasal, torunda nasofaríngea | A: 81,7% B: 88,6 % | A: 98% B: 97% |

Normalmente estas técnicas de PCR se encuentran diseñadas en genes muy conservados como los que codifican para la proteína matriz (M), la nucleoproteína (NP) o el segmento génico NS, que permiten diferenciar entre los tres géneros: *Influenzavirus* A, B o C. Otros genes diana considerados de interés en el conocimiento de la infección por virus gripales, y en concreto en la detección de *Influenzavirus* A, son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), los cuales permiten conocer el subtipo del virus gripal. Los subtipos más importantes desde el punto de vista clínico-epidemiológico son H3N2 y H1N1, por ser los virus de carácter epidémico que circulan en el ser humano durante las temporadas de gripe. Desde 1997 que se produjo el salto interespecífico del virus del subtipo H5N1, su detección va a suponer gran interés, no sólo por la gravedad y elevada mortalidad que supone la infección, sino por tratarse como ya se ha avanzado de un virus con potencial pandémico cuya instauración de una transmisión eficiente interhumana implicaría una urgencia sanitaria de repercusión a nivel mundial.

Con respecto a la detección mediante técnicas de PCR convencional a tiempo final, además de las técnicas “artesanales” (“caseras” o *in house*), existen *kits* comerciales, en formato múltiple, como el Seeplex RV Detection 16 Kit (Seegene Inc. Seoul, Korea), basado en tecnología DPO (*Dual Priming Oligonucleotide*) que consiste en el diseño de cebadores formados por dos segmentos con el objeto de aumentar la especificidad, uno más largo que el otro y separados entre sí por un espaciador de polideoxiinosinas. Este *kit* además de permitir el diagnóstico de la infección gripal por virus A y B, proporciona el diagnóstico diferencial con adenovirus, metapneumovirus, coronavirus humano 229E, OC43 y NL63, virus parainfluenza 1, 2, y 3, virus respiratorio sincitial A y B y rinovirus. Uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional o a tiempo final es que se trata de un método cualitativo, que muchas veces requiere la aplicación de una PCR secuencial (PCR anidada o *nested-PCR*) para obtener una sensibilidad similar a la que se alcanza utilizando una PCR a tiempo real, lo que comporta mas carga de trabajo, un incremento del tiempo necesario hasta la obtención de los resultados y un mayor riesgo de contaminaciones.

El empleo de diferentes sondas marcadas fluorogénicamente (TaqMan, sondas de hibridación, *molecular beacon*), cebadores marcados que dan lugar a un amplicón autofluorescente (*primers scorpions*, *primers sunrise*) o de agentes intercalantes, como el Sybr-Green, en un sistema de PCR a tiempo real, están desplazando el uso de la PCR convencional. Estos métodos de PCR a tiempo real permiten la cuantificación, además de reducir el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en la emisión de los resultados, eliminando la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos. Si a esto se añade la posible utilización de una PCR múltiple que además de detectar los tres géneros de virus gripales con interés humano

permitan el subtipado de los virus gripales A y/o la detección simultánea de otros patógenos implicados en la infección respiratoria, el valor de esta metodología se ve incrementado notablemente. No obstante se debe tener en cuenta que un paso limitante para el desarrollo de técnicas basadas en PCR a tiempo real con formato múltiple es el número de canales de detección que posea el termociclador.

Otra técnica poco utilizada en la detección de virus gripales en humanos, pero que está adquiriendo mayor protagonismo en veterinaria para la detección de virus gripales del subtipo H5 en aves de granja, es el método NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) que se fundamenta en una retrotranscripción-amplificación y posterior detección basada en un método de electroquimioluminiscencia.

De cara a garantizar la necesidad de efectuar un diagnóstico rápido están disponibles diversos ensayos comerciales de PCR a tiempo real; algunos permiten solo detectar *Influenzavirus* A y B, mientras que otros posibilitan diagnosticar la infección por H5N1 (Tabla 9). La FDA ha aprobado un ensayo de PCR a tiempo real para la identificación del sublinaje asiático de virus gripales A del subtipo H5 desarrollado en los CDC. La OMS también ha publicado procedimientos para la detección de infección por H5N1 en humanos utilizando RT-PCR convencional y PCR a tiempo real, disponible en la siguiente dirección de internet: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html

3.6.6. Técnicas de hibridación. Son técnicas que permiten el procesamiento de una elevada cantidad de muestras por cada ensayo y entre ellas cabe destacar las basadas en PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis (PCR-EIA) y los *microarrays* o biochips que posibilitan el análisis simultáneo de varios genes pertenecientes a un mismo organismo.

La PCR-EIA consiste en una amplificación cuyos productos se detectan mediante sondas en solución marcadas. La unión de la sonda se detecta mediante un enzimoimmunoanálisis cuyo anticuerpo es reactivo frente al marcador. En la actualidad existe una técnica comercial basada en la PCR-EIA: Hexaplex® (Prodesse, Inc., Milwaukee, Wis.) capaz de diferenciar *Influenzavirus* A y B además de detectar virus parainfluenza 1, 2, 3 y virus respiratorio sincitial.

El crecimiento en número de infecciones en humanos por virus gripales pertenecientes a subtipos distintos de los habituales y la diseminación de la epizootia por virus del subtipo H5N1, ha acrecentado el interés por la caracterización detallada de los virus gripales circulantes, tanto en el ámbito de la salud humana como en el terreno veterinario. Estos acontecimientos han derivado en el desarrollo de una serie de técnicas para el tipado y subtipado de virus gripales que utilizan la hibridación con sondas, en este caso inmovilizadas en una superficie, y que se incuban con el material genético a analizar marcado, son los *microarrays* o

biochips. En la actualidad existen publicados diversos sistemas “artesanales” no comerciales y específicos para el tipado y subtipado de virus gripales basados en esta tecnología, y cabe destacar entre ellos: el Mchip que es un *microarray* de baja densidad (15 oligonucleótidos marcados) dirigidos frente al gen que codifica para la proteína M de los virus gripales A, que al coevolucionar con los antígenos de superficie (hemaglutinina y neuraminidasa) permite obtener información sobre el subtipo y el FluChip compuesto por 55 sondas capaces de detectar virus gripales B y diferenciar todos los subtipos de *Influenzavirus A*.

El descubrimiento en los últimos años de nuevos virus implicados en patología respiratoria (SARS-CoV, metapneumovirus, virus gripe A H5N1, coronavirus humanos HKU1 y NL-63, bocavirus humano) ha estimulado el interés por el conocimiento de la infección respiratoria vírica y la disponibilidad de técnicas comerciales basadas en la amplificación múltiple con posterior detección mediante sondas de hibridación. El NGEN RVA ASR (Nanogen, San Diego, CA) combina la amplificación múltiple con un *array* electrónico (NanoChip 400) que utiliza sondas fluorescentes marcadas, capaz de detectar virus gripales A y B, además de virus parainfluenza 1, 2, 3 y virus respiratorio sincitial.

También están disponibles métodos comerciales para la aplicación exclusiva en el tipado y subtipado de virus gripales como el equipo *CombiMatrix Influenza A Detection System* (CombiMatrix) que contiene un *microarray* capaz de subtipar todas las hemaglutininas y las neuraminidasas de los virus gripales A, junto con un analizador y el *software* para interpretar los resultados.

El *kit* ResPlex™ III (Genaco Biomedical Products, Inc, Huntsville AL), está basado en un tipo de tecnología muy reciente que permite la detección e identificación simultánea de los genes H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1, y N2 de los virus gripales A, y los genes NS de *Influenzavirus A* y B, capacitando a la técnica de una gran versatilidad no sólo a la hora de genotipar virus gripales que circulan habitualmente durante las temporadas de gripe (H3N2 y H1N1), sino también para aquellos que puedan infectar de forma esporádica a humanos (H5, H7, H9). El ensayo utiliza una tecnología denominada XMAP®, fundamentada en una PCR múltiple que origina productos de amplificación marcados con biotina que posteriormente se detectan mediante microesferas, en este caso marcadas con estreptavidina, y analizados con un instrumento Luminex (Luminex Corporation) cuya tecnología está basada en los principios de la citometría de flujo. El planteamiento es similar al de un *microarray* pero con la ventaja de utilizar sondas impresas sobre partículas en suspensión en lugar de fijar sobre una superficie con objeto de aumentar la sensibilidad. Emparentado con este equipo y desarrollado por la misma compañía está disponible el denominado ResPlex™ II, el cual utiliza la misma tecnología para la detección de *Influenzavirus A* y B, virus

parainfluenza 1, 2, 3, y 4, virus respiratorio sincitial A y B, metapneumovirus, rinovirus, enterovirus y SARS-CoV; al igual que el ID-Tag™ *Respiratory Viral Panel* (Tm Bioscience 17 Corp., Toronto, Canada) que permite el diagnóstico de infecciones por virus de la gripe A, subtipado de los virus gripales A H1, H3 y H5, virus de la gripe B, adenovirus, metapneumovirus, coronavirus humano 229E, OC43, HKU1 y NL63, SARS-CoV, virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, virus respiratorio sincitial A y B y rinovirus.

3.6.7. Caracterización genética de los virus gripales. El material genético fragmentado de los virus gripales está compuesto de ARN monocatenario de polaridad negativa. La replicación y transcripción de estos segmentos a cargo de la ARN polimerasa ocasiona errores por carecer de actividad reparadora, originando mutaciones que se conocen como variaciones menores, deriva genética o *drift*. La frecuencia con la que ocurren espontáneamente estas mutaciones es más elevada para las proteínas de superficie, hemaglutinina y neuraminidasa, que son los principales determinantes antigénicos, siendo las tasas de mutación menores para el resto de segmentos génicos.

Otra particularidad genética que presentan los virus gripales A es su capacidad de recombinación que puede tener lugar entre los segmentos génicos de virus de distintos orígenes (mamíferos, aves). Si en este reordenamiento están implicados los segmentos que codifican para las glucoproteínas de superficie, puede originarse un nuevo subtipo de virus que nunca haya circulado entre la población humana, dando lugar a un virus con potencial pandémico. Estos fenómenos de cambio e intercambio genético son los que determinan la alta variabilidad de los virus gripales y la importancia y necesidad de realizar una caracterización genética en el contexto de la vigilancia de la infección gripal.

La amplificación de los ácidos nucleicos por PCR puede llevarse a cabo directamente en las muestras respiratorias proporcionando un método diagnóstico que puede acoplarse a técnicas de tipado rápido y caracterización, como la determinación del polimorfismo del virus en función de los fragmentos obtenidos tras la digestión del mismo con enzimas de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y, especialmente, la secuenciación de fragmentos de los genes.

La caracterización genética ha experimentado un gran avance en los últimos años gracias al desarrollo de técnicas rápidas de PCR y a la introducción de secuenciadores automáticos que permiten la caracterización genética de los linajes de virus circulantes, mejorando el seguimiento de la evolución de los virus de la gripe y la calidad de los datos de vigilancia de la circulación de los mismos. Esta se centra en el estudio de los virus gripales A y B debido a que los *Influenzavirus C* apenas sufren cambios genéticos, en general carecen de estacionalidad y habitualmente producen casos esporádicos.

3.6.8. Secuenciación. Una caracterización genética concisa se realiza mediante la secuenciación de la hemaglutinina y la neuraminidasa, seguida de su 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 antiviricos y cuyo cambio pueda tener repercusión clínica y patogénica de la cepa estudiada. No hay una correlación absoluta entre los perfiles de caracterización antigénica mediante inhibición de la hemaglutinación de las cepas variantes dentro de un determinado subtipo, y el árbol filogenético originado al comparar sus secuencias de hemaglutinina. Se ha podido comprobar que la evolución genética avanza de forma gradual mientras la antigénica lo hace de forma discontinua debido a que no siempre los cambios genéticos reflejan variaciones antigénicas en las proteínas.

En el caso del análisis de los virus gripales actuales, la disponibilidad de amplias bases de datos, y de proyectos nuevos para el depósito de secuencias

(<http://www.niaid.nih.gov/dmid/genomes/mscs/influenza.htm>), ha facilitado la comparación de un elevado número de virus aislados a lo largo de un período de hasta 90 años. En estas bases podemos incluso encontrar secuencias del virus gripal causante de la pandemia de 1918. En el caso de la emergencia del virus gripal H5N1, los estudios filogenéticos realizados han permitido situarlo entre sus ancestros, en el linaje euroasiático, e identificar mutaciones relacionadas con su virulencia y su posible transmisibilidad, ayudando a comprender el brote y sus posibles consecuencias.

La hemaglutinina es el principal determinante antigénico de los virus gripales. Forma espículas en la envoltura mediante la unión de tres moléculas o monómeros idénticos. El monómero de hemaglutinina contiene dos subunidades HA1 y HA2, en la subunidad HA1 es donde se encuentran los aminoácidos responsables de la antigenicidad y de la unión al receptor celular, por tanto, la secuenciación de esta región aporta información referente a las características antigénicas y de afinidad por el receptor que se pueden comparar con respecto a virus originarios de un brote, virus vacunales o cepas de referencia.

La neuraminidasa es una glucoproteína de superficie con actividad enzimática que, al igual que la hemaglutinina, presenta capacidad antigénica, aunque en menor grado que esta. Desde el desarrollo y comercialización en 1999 de los antiviricos inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir y oseltamivir), una de las principales aplicaciones de la secuenciación de este gen es la monitorización de las resistencias genotípicas a este grupo de antiviricos. El conocimiento de la sensibilidad a los inhibidores de la neuraminidasa de los virus circulantes tiene particular interés en niños e inmunodeprimidos que reciban o vayan a recibir tratamiento. En este grupo de pacientes la probabilidad de seleccionar virus resistentes está

incrementada por presentar mayor tasa de replicación vírica y una excreción más prolongada de virus en el tiempo.

De igual manera la secuenciación del segmento M y en concreto la zona que codifica para la proteína M2, permite detectar aquellos cambios que confieren resistencia a los adamantanos (amantadina y rimantadina). La adquisición de resistencia a este grupo de antiviricos puede ser independiente de la presión selectiva ejercida por el fármaco. Los cambios genotípicos responsables de la resistencia pueden originarse de forma espontánea, dando lugar a virus genéticamente estables que conservan su capacidad de replicación y transmisibilidad. Utilizando tecnología basada en la pirosecuenciación (Pirosequencing™) la compañía Biotage ha desarrollado un método para la detección de resistencias a adamantanos. Este método de secuenciación consiste en una cascada de reacciones enzimáticas para detectar la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de ADN, de forma que cuando un nucleótido es incorporado se produce una reacción lumínica. La ventajas que ofrece este sistema de secuenciación son su rapidez y relativo bajo coste. En comparación con otras técnicas de secuenciación automática, este método tiene la desventaja de permitir solamente la secuenciación de un máximo de 100 pares de bases.

3.6.9. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. La técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) o polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, consiste en una primera amplificación mediante RT-PCR de el (los) gen (es) diana seguido de un tratamiento mediante enzimas de restricción que origina fragmentos, y por tanto, patrones de banda característicos de la cepa estudiada y que se comparan con una cepa control. Dependiendo del abordaje, este método de genotipado es capaz de caracterizar genes que codifican para la hemaglutinina y la neuraminidasa (subtipo) y a la vez genes internos, lo que facilita la detección de recombinantes y la determinación del origen de los distintos segmentos (humano o zoonótico). La PCR-RFLP también se ha utilizado para la detección de resistencias a adamantanos. Tiene los inconvenientes de no permitir la automatización ni la diferenciación entre genes con bajo nivel de polimorfismo.

La secuenciación, al proporcionar una caracterización genética más precisa, ha desplazado a este método que puede resultar útil en aquellos laboratorios que no dispongan de un secuenciador o de un servicio centralizado de secuenciación automática.

Tabla 8. Características de los métodos moleculares disponibles para la detección de virus gripales.

| Método | Ventajas | Desventajas |
|--------------------|---|---|
| PCR simple | Sensible y específico Permite análisis posteriores del producto amplificado | Una diana por ensayo |
| PCR múltiple | Sensible y específico Permite detectar más de una diana por ensayo Permite análisis posteriores | Los métodos no comerciales requieren una optimización exhaustiva para asegurar la ausencia de falsos negativos y la competición entre iniciadores |
| PCR-EIA | Sensible y específico Elevado rendimiento Puede ser múltiple | No permite el análisis posterior de los productos Requiere evaluación y validación minuciosa antes de la integración en la rutina de trabajo del laboratorio |
| PCR a tiempo real | Sensible y específico Rápido Permite cuantificar Puede ser múltiple | Requiere equipamiento específico No siempre es posible el análisis del producto La capacidad de analizar varios genes o patógenos en formato múltiple está limitada por las características del termociclador |
| NASBA | Sensible y específico Permite cuantificar | Utiliza tres enzimas Procedimiento largo y costoso No siempre es posible el análisis del producto |
| <i>Microarrays</i> | Sensible y específico Detección de muchas dianas en un solo ensayo | Requiere equipamiento específico y amplio desarrollo No permite el análisis posterior de los productos |

Tabla 9. Ensayos comerciales para la detección de virus gripales mediante amplificación genómica a tiempo real

| Ensayo | Proveedor | Termociclador | Dianas | Características |
|--|--------------------|----------------------|--------------------------------|---|
| Artus® Influenza RT-PCR Kit | Qiagen, Bonsai | Lightcycler® | <i>Influenzavirus</i> A+B | Detecta ambos pero no permite diferenciar entre virus gripales A y B |
| Artus® Influenza/H5 LC RT-PCR Kit | Qiagen, Bonsai | Lightcycler® | <i>Influenzavirus</i> A+B y H5 | Detecta ambos pero no permite diferenciar entre virus gripales A y B distintos de H5 |
| LightMix for Influenza A H5N1 detection (TIB Molbiol) | Roche | Lightcycler® | <i>Influenzavirus</i> A H5N1 | Se debe transformar el ARN vírico en ADNc en un ensayo independiente. Único ensayo que detecta N1 |
| LightMix® for the detection of Avian Influenza A Virus (Subtype Asia) H5 (TIB Molbiol) | Roche | Lightcycler® | H5 | Se debe transformar el ARN vírico en ADNc en un ensayo independiente |
| Flu A/B Analyte Specific Reagent (Cepheid) | IZASA | SmartCycler® | <i>Influenzavirus</i> A y B | Diferencia entre ambos tipos de virus |
| TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit | Applied Biosystems | ABI PRISM® | <i>Influenzavirus</i> A H5 | Detección de <i>Influenzavirus</i> A y H5 pero en ensayos separados |

3.6.10. Detección de la respuesta inmunitaria humoral específica. La identificación indirecta de la infección por los virus de la gripe se realiza mediante ensayos serológicos, en los cuales se detecta la presencia de anticuerpos frente al antígeno hemaglutinina del virus gripal en el suero de un paciente. Esta aproximación al diagnóstico de la gripe, raramente se utiliza en la práctica clínica habitual, aunque puede ser una herramienta básica en la vigilancia epidemiológica de la circulación de los virus gripales. No obstante, un análisis retrospectivo puede establecer un diagnóstico clínico en ausencia de aislamiento de virus a partir de la muestra o de detección de sus antígenos o ácidos nucleicos.

Una de las principales dificultades del diagnóstico serológico es la necesidad de evaluar muestras de sueros en pares. Esto se requiere debido a que la infección por los virus de la gripe es frecuentemente una reinfección. Así, debe constatar un incremento significativo del título de anticuerpos entre dos muestras consecutivas separadas entre dos y cuatro semanas. Los ensayos más frecuentemente utilizados son la reacción de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y la neutralización. No obstante, los dos últimos constituyen la base del análisis de la respuesta serológica frente a la infección gripal y permiten determinar la concentración de anticuerpos frente a los antígenos específicos de subtipo y de variante.

La reacción de fijación del complemento se utiliza para la determinación de anticuerpos frente a la nucleoproteína de los virus de la gripe, que está altamente conservada. A diferencia de la hemaglutinina, se emplea básicamente para diferenciar en el suero de pacientes la presencia de anticuerpos dirigidos frente a los virus de la gripe tipos A y B. Estos ensayos tienen un valor importante en el caso de la circulación de nuevas variantes antigénicas, frente a las cuales no haya disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a la hemaglutinina, altamente variable en función de la deriva genética de los virus gripales. También tiene utilidad en el caso de transmisión de los subtipos del virus de la gripe A entre distintas especies. No obstante, el aumento en el título de fijación del complemento después de una infección gripal es lento y el ensayo por sí solo tiene una sensibilidad relativamente baja. Por otro lado, este ensayo solamente mide las clases de anticuerpos que están implicadas en la fijación del complemento.

La inhibición de la hemaglutinación se usa habitualmente para el diagnóstico y tipado de los virus de la gripe A y B y para el subtipado de los virus de la gripe A (H1 y H3). El título de anticuerpos presentes en una muestra de suero, calculado mediante esta técnica, se relaciona de manera fidedigna con la protección o susceptibilidad del paciente frente a la infección gripal. Por ello se utiliza ampliamente para medir la respuesta del paciente a la administración de la vacuna de la gripe. Sin embargo, la realización e interpretación de esta técnica es compleja y, frecuentemente, subjetiva, por lo que precisa para su realización de personal

calificado. Es por ello muy habitual que esta técnica carezca de reproducibilidad cuando se realiza por distintos laboratorios. Por otro lado, aunque su ventaja más evidente es su elevada especificidad, se contrarresta por la baja sensibilidad.

El principio básico del ensayo de neutralización del suero es la inhibición de la replicación vírica mediante anticuerpos específicos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero del paciente, obtenidos mediante esta técnica, se correlacionan perfectamente con los obtenidos en los ensayos de inhibición de hemaglutinación. El mayor inconveniente que presenta esta técnica es que los anticuerpos monoclonales utilizados tienen que ser validados a menudo con objeto de comprobar que son capaces de reaccionar frente a las nuevas variantes de virus de la gripe.

4. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

4.1. ASPECTOS VIROLOGICOS

El VRS es un virus perteneciente al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, donde se incluyen, además, otros virus respiratorios comunes. La morfología de los viriones de VRS coincide con aquella que define a los paramyxovirus: son esféricos, filamentosos o pleomórficos y poseen una envuelta procedente de la membrana plasmática de la célula infectada donde pueden distinguirse unas espículas correspondientes a glicoproteínas de membrana. El genoma, de alrededor de 15.000 nucleótidos, consta de una única molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa que se asocia con proteínas de origen vírico constituyendo el nucleocápside, que presenta simetría helicoidal. Un armazón proteico, denominado matriz, separa al nucleocápside de la envuelta exterior.

El genoma del VRS codifica para diez proteínas, siendo tres de ellas no estructurales (NS1, NS2 y M2). De las siete proteínas estructurales restantes, tres forman parte del complejo del nucleocápside, la nucleoproteína N, la fosfoproteína P y polimerasa L, y cuatro se localizan en la envuelta, dos de las cuales, la proteína de fusión (F) y la que está implicada en el reconocimiento del receptor celular (G) son glicoproteínas de membrana que se corresponden con las espículas que se proyectan desde la envuelta del virus, una es la proteína que conforma el armazón de la matriz (M), y por último existe una proteína pequeña e hidrófoba (SH) de función desconocida. Atendiendo a variaciones antigénicas y genéticas los diferentes aislados de VRS pueden diferenciarse en dos grupos denominados VRS-A y VRS-B.

4.2. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

El VRS es la principal causa de enfermedad respiratoria del tracto inferior en niños de corta edad. En los países de nuestro entorno, en los que la epidemiología de este virus es relativamente homogénea, el VRS es el responsable del 42-45% de las hospitalizaciones por esta causa en niños menores de 2 años. En estos pacientes, particularmente en neonatos, con los pulmones aún inmaduros, el riesgo de bronquiolitis o neumonía

asociados a la primoinfección con VRS es elevado. Las reinfecciones son relativamente frecuentes, incluso en una misma temporada, dado que la inmunidad frente a este virus no es totalmente eficaz. Las infecciones repetidas a partir de los 2 años de edad suelen tener un curso más benigno manifestándose en la mayor parte de las ocasiones como una enfermedad de vías respiratorias altas o traqueobronquitis. Los ancianos y adultos inmunodeprimidos también se reconocen como pacientes en los que se observan complicaciones debidas a infección por VRS, en muchas ocasiones de adquisición nosocomial.

En países con un clima templado la infección por VRS ocurre fundamentalmente en los meses de invierno y a comienzos de la primavera en brotes que se repiten anualmente. Durante un mismo brote circulan de manera simultánea cepas de ambos grupos, pero las proporciones de VRS-A y VRS-B varían entre un brote y otro.

5. VIRUS PARAINFLUENZA

5.1. ASPECTOS VIROLOGICOS

Actualmente se reconocen cinco virus parainfluenza diferentes, los virus parainfluenza 1 y 3 (VPI-1 y VPI-3) encuadrados en el género *Respirovirus*, y los virus parainfluenza 2, 4A y 4B (VPI-2, VPI-4A y VPI-4B), pertenecientes al género *Rubulavirus*, ambos en la familia *Paramyxoviridae*. Comparten con todos los miembros de esta familia las características morfológicas descritas anteriormente. Sin embargo, presentan características diferenciales, como el hecho de que reconozcan el ácido siálico de algunas de las células epiteliales para iniciar el proceso de infección del mismo modo que los virus de la gripe. La proteína implicada en este reconocimiento se denomina hemaglutinina-neuraminidasa (NH) y se asocia con la proteína de fusión F para mediar la entrada del virus en la célula infectada. En cuanto al resto de proteínas, también se reconocen en los virus parainfluenza las tres proteínas que forman el complejo del nucleocápside (N, P y L), y la proteína matriz M. El número de proteínas no estructurales es variable dependiendo del tipo de virus parainfluenza, pero codifican al menos una proteína de este tipo.

5.2. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

El espectro de cuadros respiratorios en los que están implicados los virus parainfluenza es muy similar a aquellos descritos para VRS, sin embargo, el número de pacientes que requieren hospitalización es significativamente menor. VPI-3 infecta más frecuentemente a niños menores de 2 años de edad, en la mayoría de los casos ocasionando cuadros respiratorios de vías altas, no obstante, otras manifestaciones que pueden observarse en pacientes de hasta seis meses de vida son bronquiolitis y neumonía, aunque con menor frecuencia que aquellas debidas a infección por VRS. Las técnicas de diagnóstico molecular, cada vez más utilizadas en los laboratorios de microbiología clínica, también están concediendo a VPI-4, un virus difícilmente cultivable, un papel más destacado en las infecciones de vías respiratorias

bajas de niños menores de dos años de edad, tanto por la frecuencia como por la gravedad de las mismas. En niños mayores, con una edad comprendida entre 2 y 6 años, la laringotraqueobronquitis aguda es la manifestación más característica de la infección por virus parainfluenza, particularmente VPI-1. Las manifestaciones clínicas observadas en niños mayores de seis años y adultos se limitan exclusivamente a las vías altas. En ancianos las infecciones respiratorias por virus parainfluenza son bastante menos graves que las causadas por VRS o los virus de la gripe.

6. CORONAVIRUS

6.1. ASPECTOS VIROLOGICOS

Los coronavirus (familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus*) son un grupo de virus envueltos, redondeados o pleomórficos. La envuelta presenta unas espículas características que constituye uno de los elementos distintivos de la morfología del virión cuando se observan al microscopio electrónico, con aspecto de corona, de donde reciben su nombre. Además de la proteína de la espícula (S) responsable de la unión con el receptor celular y de la fusión de las membranas vírica y celular, en la envuelta de todos los coronavirus pueden distinguirse al menos dos proteínas más, denominadas M y E. En el interior del virión, el nucleocápside, con simetría helicoidal, está constituido por la proteína N formando un complejo con una única molécula de ARN de polaridad positiva. El genoma completo posee un tamaño próximo a 30.000 nucleótidos, lo que supone el genoma más grande de los virus ARN conocidos. La estructura genómica es idéntica en todos los coronavirus, reservando los dos tercios más próximos al extremo 5' para la síntesis de las proteínas necesarias para la replicación del ARN, y el tercio restante para la síntesis de las proteínas estructurales en el orden S-E-M-N, y otras proteínas que, como en el caso de la hemaglutinina-esterasa, son específicas de grupo y sólo están presentes en algunos coronavirus.

6.2. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

Los coronavirus son un grupo muy heterogéneo de virus que pueden infectar un número muy diverso de animales mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano, y aves. Se pueden diferenciar tres grupos de coronavirus atendiendo a las propiedades antigénicas, a la posición y variedad de los genes que codifican para las proteínas no estructurales en el tercio de genoma próximo al extremo 3', y al tipo de hospedador que infectan. Así, los grupos 1 y 2 están constituidos por coronavirus que infectan mamíferos, en tanto que el grupo 3 sólo está integrado por coronavirus de aves.

Desde mediados de los años sesenta del pasado siglo los coronavirus humanos, HCoV-229E o HCoV-OC43, se han asociado exclusivamente con el resfriado común y por tanto se consideraban patógenos respiratorios relativamente benignos. Sin embargo esta concepción cambió drásticamente en

abril de 2003, fecha en la que se identificó un nuevo coronavirus como responsable del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV).

A finales de 2002 se observó una incidencia más elevada de lo habitual de neumonía atípica en el sur de China, iniciándose de esta manera uno de los brotes infecciosos que más repercusión ha tenido a nivel mundial en los últimos años. En sólo ocho meses se identificaron 8.096 casos confirmados de infección por SARS-CoV en 26 países diferentes, observándose un total de 774 muertes (http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html). Aunque el SARS-CoV no circula actualmente entre seres humanos, la elevada morbilidad y mortalidad asociada con el brote de SARS ha reavivado el interés por esta familia de virus y ha permitido la identificación reciente de otros dos nuevos coronavirus asociados con patología respiratoria en seres humanos.

El coronavirus NL63 (HCoV-NL63), incluido en el grupo 1 de los coronavirus, junto con HCoV-229E, fue aislado por primera vez a partir del aspirado nasofaríngeo de un niño de siete meses con bronquiolitis en Holanda. El coronavirus HKU1, perteneciente al grupo 2 junto con HCoV-OC43, fue identificado en muestras de aspirado nasofaríngeo obtenidas de un adulto con una enfermedad pulmonar crónica en Hong Kong. Desde su descubrimiento, ambos virus se han asociado con casos de infección respiratoria en diferentes países, evidenciando una distribución universal de los mismos. Dependiendo de las series publicadas, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 se detectan en el 1-10% de los pacientes con infección respiratoria aguda, siendo relativamente común la co-detección junto con otros virus respiratorios. Los síntomas respiratorios asociados con la infección por cualquiera de estos dos nuevos coronavirus son similares a los que ocasionan la infección por HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, es decir, benignos en líneas generales, pero pueden presentarse complicaciones en pacientes ancianos o con patología respiratoria subyacente así como en niños de corta edad.

7. BOCAVIRUS HUMANO

7.1. ASPECTOS VIROLÓGICOS

Descrito en 2005, el bocavirus humano (HBoV) ha sido el último en incorporarse a la larga lista de virus asociados con la infección respiratoria en el ser humano. El análisis filogenético de la secuencia genómica y la morfología del virión han demostrado que se trata de un virus perteneciente al género *Bocavirus*, encuadrado en la familia *Parvoviridae*. Como todos los parvovirus, son virus esféricos de pequeño tamaño con simetría icosaédrica, carentes de envoltura, y con un genoma constituido por una única molécula de ADN monocatenario.

7.2. ASPECTOS CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICOS

HBoV fue identificado por primera vez en muestras de aspirado nasofaríngeo procedentes de niños con infección respiratoria. Estudios posteriores han confirmado que HBoV es el responsable de un porcentaje nada desdeñable de bronquiolitis y

sibilancias recurrentes en niños de corta edad. En nuestro país, HBoV circula a lo largo de toda la temporada, como ocurre con rinovirus o adenovirus, con picos de detección en los meses de noviembre y diciembre.

Además de infecciones respiratorias, se ha demostrado mediante detección en muestras de suero de pacientes con sibilancias que HBoV es capaz de inducir infección sistémica, como ocurre con otros parvovirus. Por otro lado, HBoV también podría ser el responsable de un pequeño porcentaje de gastroenteritis.

8. METAPNEUMOVIRUS HUMANO

8.1. ASPECTOS VIROLÓGICOS

En 2001, se descubre un nuevo virus respiratorio en muestras nasofaríngeas tras un estudio de niños que presentaban infección respiratoria aguda. Este nuevo virus se incluyó en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Metapneumovirus*, en base a estudios morfológicos de la partícula vírica por microscopía electrónica y por estudios genéticos y filogenéticos. Se denominó metapneumovirus humano (hMPV) siendo el primer miembro de este género capaz de producir infección en el ser humano. La especie tipo del género es el metapneumovirus aviar, conocido como el virus de la rinitis del pavo o pneumovirus aviar C, agente etiológico de infección respiratoria del tracto superior en pavos y otras aves.

Las características morfológicas del virión coinciden con aquellas definidas, en los paramyxovirus: partículas pleomórficas de tamaño entre 150 a 600 nm y con una envuelta que presenta proyecciones cortas o espículas de 13-17 nm. Además, como en el resto de los miembros de la familia *Paramyxoviridae*, el sobrenadante recogido a partir de hMPV aislado en células terciarias de riñón de mono no presenta actividad hemaglutinante con eritrocitos de pavo, pollo y cobayas y en diferentes líneas celulares la replicación vírica depende de la presencia de tripsina.

Desde el punto de vista genético, el hMPV presenta un genoma vírico constituido por una molécula de ARN de polaridad negativa de 13.378 nucleótidos. Los dos géneros de la subfamilia *Pneumovirinae* (metapneumovirus y pneumovirus) se diferencian en que el género metapneumovirus carece de proteínas no estructurales NS1 y NS2 y en el orden de los genes. La especie tipo del género pneumovirus es el virus respiratorio sincitial (VRS) que presenta un orden genómico 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', sin embargo el hMPV presenta el orden 3' N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' (N: nucleoproteína, P: fosfoproteína, M: proteína de la matriz, F: proteína de fusión, M2: proteína de matriz 22K, SH: proteína hidrofóbica pequeña, G: glicoproteína de anclaje con el receptor celular, L: polimerasa). Se han definido 2 serotipos A y B que a su vez se subdividen en cuatro genotipos (A1, A2 y B1, B2), en función de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas F y G.

8.2. ASPECTOS CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICOS

Originariamente el virus se aisló en Holanda a partir de muestras respiratorias de 28 niños de menos de 5 años de edad, no relacionados epidemiológicamente. En general el hMPV se asocia etiológicamente a cuadros de infección respiratoria aguda no sólo en niños sino también en ancianos y en pacientes inmunodeprimidos, es un virus ubicuo y se ha descrito en todos los continentes. La aparición de casos asociados a hMPV es estacional en los países con clima templado y se ha concretado desde el invierno a la primavera (noviembre-mayo). En nuestro país el pico de detección llega a ser máximo en los meses de febrero a abril aunque existen de manera esporádica casos positivos en enero, mayo, junio, octubre y diciembre. La mayoría de los estudios publicados presentan series de pacientes pediátricos hospitalizados siendo más prevalente en los niños con bronquiolitis o con asma. En general, los niños infectados por hMPV presentan un cuadro clínico semejante a la infección respiratoria del tracto inferior asociada al VRS. Desde una infección de severidad media hasta tos severa, bronquiolitis y neumonía, frecuentemente acompañado de fiebre muy alta, mialgia y vómitos. Muchos de los pacientes son hospitalizados y requieren ventilación asistida. Si se comparan los cuadros clínicos asociados a hMPV y a VRS se pueden encontrar ligeras diferencias ya que la infección por hMPV es ligeramente menos grave y se presenta con un cuadro asmático (16%), menor disnea, menor dificultad para comer, menor hipoxemia, menor administración de oxígeno y mayor administración de antibióticos (60%). De manera exhaustiva se han recogido los datos clínicos obtenidos en pacientes con bronquiolitis asociada a VRS y a hMPV y el alto riesgo que existe en desarrollar asma y otras complicaciones respiratorias en este grupo de pacientes. Además, se ha demostrado que la coinfección entre el VRS y el hMPV supone un aumento de la gravedad del cuadro respiratorio de los niños infectados. Se cree que el hMPV lleva circulando en la especie humana más de 50 años. No se conoce el receptor celular por el momento.

Como tratamiento de la infección y tal y como se está llevando a cabo con el VRS, se han iniciado estudios para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que puedan neutralizar al hMPV al ser administrados en pacientes con infección activa. Además, de manera experimental se está intentando producir vacunas vivas atenuadas de hMPV en diferentes laboratorios de Estados Unidos, Canadá, Europa y Australia. Hasta la fecha no se han emitido las licencias y se puede considerar que nos encontramos en las primeras fases de investigación de dichas vacunas. Otra alternativa es la producción mediante genética reversa de quimeras que expresen en su superficie diferentes proteínas víricas. Estas quimeras podrían expresar de manera bivalente proteínas de diferentes virus (VRS y hMPV) por los que la inmunización sería doble.

9. PICORNAVIRUS

9.1. ASPECTOS VIROLÓGICOS

La familia *Picornaviridae* está compuesta por un grupo variado de virus ampliamente estudiados y conocidos. Presentan un enorme interés desde el punto de vista clínico tanto en sanidad humana como veterinaria. Taxonómicamente se diferencian un total de 9 géneros de los cuales se han identificado 5 como productores de infección en humanos: *Rinovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus* y *Parechovirus*. En concreto, los rinovirus y en menor medida los enterovirus, han sido ampliamente vinculados a la producción de infección respiratoria.

Morfológicamente son virus simples, esféricos, pequeños (20-30 nm) cuyo genoma está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva empaquetado en una cápsida de simetría icosaédrica y sin envuelta lipídica. Existen 60 copias de cada una de las 4 proteínas del cápside: VP1, VP2, VP3 y VP4 (capsómero) organizadas en 12 pentámeros. Además, existe una única copia de la proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' del genoma (de ahí la "g"). VP1-3 son proteínas externas, mientras que VP4 es totalmente interna. En la superficie vírica existen zonas más prominentes (activadoras de la respuesta inmune) y zonas deprimidas o cañones (zonas de interacción con el receptor)

El 90% del genoma es codificante, mientras que en ambos extremos existen secuencias no codificantes que participan en la replicación y traducción del ARN. En el extremo 5', los primeros 200 nucleótidos suelen estar implicados en la replicación del ARN vírico. El resto, hasta el AUG iniciador, podrían intervenir en la traducción. A esta última zona se le denomina IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), que reemplaza la necesidad de cap en el ciclo celular. En el extremo 3', desde el codon de terminación hasta la cola de poliA (100-200 A), que está codificada por el genoma existe una pequeña región de 70 nucleótidos que intervienen en la síntesis de ARN vírico. La región codificante comienza desde el AUG iniciador y continúa a lo largo de unos 2200 codones que darán lugar a 3 regiones codificantes bien definidas: P1 que constituirá las 4 proteínas estructurales (VP4, VP2, VP3 y VP1), P2 que constituirá las 3 proteínas 2A, 2B y 2C y P3 que constituirán las 4 proteínas 3A, 3B, 3C y 3D. Finalmente, la proteína 3D es la de mayor tamaño y se define funcionalmente como la ARN polimerasa dependiente de ARN, aunque también tiene actividad helicasa y une la proteína VPg al primer nucleótido.

9.2. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

De manera convencional excluiríamos a los rinovirus que serán objeto de comentarios en el apartado siguiente debido a su entidad como protagonistas en la infección respiratoria aguda.

Los enterovirus suponen una proporción importante de los agentes etiológicos implicados en la etiología de las infecciones de vías respiratorias altas en época estival. Entre ellos los virus coxsackie A21 y A24 causan brotes epidémicos en pacientes

adultos. Los virus coxsackie B se implican en la etiología de una amplia gama de cuadros que afectan a todo el tracto respiratorio, con especial prevalencia en edades tempranas de la vida. Entre los virus ECHO existen diferentes serotipos que se implican en cuadros similares en todas las edades de la vida. Recientemente se han descrito otros enterovirus cuyo papel en la infección respiratoria no está definitivamente establecido.

Las manifestaciones clínicas suelen comenzar con fiebre súbita, cefalea, mialgias y afectación del estado general. En lo que hace referencia a la sintomatología respiratoria la semiología oscila desde el dolor de garganta y la rinorrea hasta la derivada de la traqueobronquitis o la neumonía. Cabe destacar que el enantema suele constituir una manifestación precoz en la inspección del paladar y el borde de la úvula y las amígdalas.

10. RINOVIRUS

10.1. ASPECTOS VIROLÓGICOS

La alta incidencia de la infección por rinovirus está relacionada con la existencia de un gran número de serotipos, ya que se considera que este género está compuesto por más de 100 serotipos diferentes que se agrupan en 2 especies definidas antigénicamente: HRV-A y HRV-B constituidas por 74 y 25 serotipos diferentes respectivamente. El serotipo HRV87 ha sido genéticamente relacionado y clasificado como enterovirus.

10.1. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

Los rinovirus humanos son, aproximadamente, la causa de un tercio a la mitad de todas las infecciones agudas del tracto respiratorio. Son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. La infección se disemina de persona a persona por contacto directo, a través de secreciones respiratorias contaminadas con el virus y a través del contacto con objetos ambientales o superficies contaminadas. El periodo de incubación comienza con la eliminación de virus en las secreciones nasales y puede ser de 1 a 4 días. La enfermedad típica que produce la infección por rinovirus es el resfriado común y se caracteriza clínicamente por la presencia de estornudo, obstrucción y secreción nasal, dolor faríngeo y otros síntomas como cefalea, tos y malestar general. En algunos casos pueden estar involucrados en otitis media aguda, sinusitis e infección del tracto respiratorio inferior.

11. ADENOVIRUS

11.1. ASPECTOS VIROLÓGICOS

Los adenovirus fueron aislados por primera vez en 1953 por Rowe y colaboradores, quienes observaron una degeneración de tejidos adenoides extirpados quirúrgicamente y mantenidos en medio de cultivo varias semanas. En una serie de años se consiguieron aislar diferentes adenovirus procedentes de este tipo de tejidos y además de secreciones pulmonares de adultos jóvenes con cuadros respiratorios y secreciones oculares en casos de conjuntivitis. Taxonómicamente se

clasificaron en la familia *Adenoviridae*, que incluye dos géneros: *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*, agrupando el primero a los virus causantes de infecciones en mamíferos, y el segundo, a aquellos que causan infección en aves.

Los ADV humanos (hADV) constituyen partículas víricas con un diámetro de 70 a 110 nm, poseen un cápside de simetría icosaédrica, sin envuelta y con un genoma lineal de ADN de cadena doble. El cápside está compuesto por 252 capsómeros que se disponen en 20 caras y 12 vértices. De los 252 capsómeros 240 se denominan exones, los 12 vértices están ocupados por los pentones que son estructuras proyectadas y que corresponden a las fibras. Antigénica y morfológicamente los ADV se diferencian por las propiedades antigénicas que presentan los exones, pentones y fibras. Los anticuerpos neutralizantes se dirigen frente a lugares antigénicos específicos de tipo situados en el exón.

Se clasifican en 6 especies diferentes A-F en función de sus propiedades físicas, químicas, y biológicas tales como la hemaglutinación de hematíes de ratas y monos *Rhesus*, oncogenicidad en animales de experimentación, composición de bases G+C y homología de ADN, relación de antígenos tumorales, longitud de la fibra y perfiles de restricción y patrones de polipéptidos víricos. Hasta la fecha se han descrito 51 serotipos diferentes. La identificación de cada uno de los serotipos directamente en las muestras clínicas es de enorme interés para realizar una vigilancia epidemiológica, la detección de nuevos serotipos y dentro de ellos las características de los diferentes linajes. Los métodos tradicionales para el tipado de los hADV se han apoyado en estudios de neutralización y recientemente se han descrito unos sistemas basados en la secuenciación de productos de amplificación y diseñados en el gen del exón que es una de la proteínas de la envuelta del virus en donde se localizan algunos de los lugares antigénicos víricos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes.

11.2. ASPECTOS CLINICOEPIDEMIOLOGICOS

Los adenovirus humanos (hADV) están asociados a un amplio rango de cuadros clínicos (Tabla 10) y crece su protagonismo como agentes causales en casos de neumonía grave y fatal, cistitis hemorrágicas, hepatitis o infección diseminada grave en pacientes inmunodeprimidos. Las infecciones respiratorias agudas causadas por hADV se producen en cualquier país del mundo, pudiendo ser un sólo serotipo el causante de cuadros clínicos diferentes y viceversa, varios serotipos pueden estar asociados a la misma enfermedad. Se presentan en brotes epidémicos y en casos esporádicos. En la tabla siguiente se presentan las patologías respiratorias más frecuentes relacionadas con los serotipos habitualmente relacionados con dichas patologías y el grupo de edad más afectado.

Tabla 10. Cuadros respiratorios asociados con los adenovirus categorizados en función de los serotipos implicados y del grupo afectado

| Enfermedad | Serotipo | Grupo afectado |
|---|-----------------------|--------------------------------|
| Infección diseminada fatal | 3, 7, 21, 30 | Neonatos |
| Coriza, faringitis | 1, 2, 5 | Lactantes y Escolares |
| Infección respiratoria superior | 1, 2, 4-6 | Niños |
| Fiebre faringoconjuntivitis | y 3, 7 | Niños |
| Infección respiratoria aguda y neumonía | 3, 4, 7 | Adolescentes y adultos jóvenes |
| Queratoconjuntivitis | 8, 19, 37 | Adultos |
| Neumonía diseminación | con 5, 31, 34, 35, 39 | Pacientes inmunodeprimidos |

12. DIAGNÓSTICO DE OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Habida cuenta de que todos los virus respiratorios pueden estar implicados en la mayor parte de los cuadros de infección respiratoria, y que éstos suelen ocasionar síntomas bastante inespecíficos, al menos en sus comienzos, la realización de un diagnóstico etiológico es de suma importancia, pudiendo estar éste encaminado: (i) al tratamiento específico del paciente con el antivírico adecuado, si procede; (ii) a la toma de las medidas oportunas de aislamiento; o (iii) a la obtención de información epidemiológica que permita establecer la incidencia de un determinado virus en los diferentes procesos de infección respiratoria, en función de la edad de los pacientes o de las variaciones observadas en su distribución geográfica y estacional.

El diagnóstico virológico de la infección respiratoria dependerá en gran medida de la calidad de la muestra obtenida, del transporte de la misma desde el punto en que se obtiene hasta el laboratorio, y de las condiciones de conservación o almacenamiento hasta que finalmente se procesa. La muestra de elección para detectar virus respiratorios es el aspirado nasofaríngeo, preferiblemente obtenido en los tres primeros días después del inicio de los síntomas, dado que contiene abundantes células epiteliales y secreciones infectadas. Otras muestras respiratorias del tracto respiratorio superior que también son adecuadas, pero en las que cabe esperar un menor rendimiento, son los exudados nasales o faríngeos, lavados nasales y gargarismos. Para obtener los exudados es recomendable que los hisopos utilizados sean de poliéster o cualquier otro material sintético, nunca de algodón o alginato de calcio, que pueden contener sustancias que inhiban la PCR. También deben evitarse los hisopos con vástagos de madera.

En el caso de que el punto de recogida de las muestras respiratorias y el laboratorio encargado del procesamiento de las mismas no estén próximos, éstas se enviarán refrigeradas y en medio de transporte de virus. Hay que tener en cuenta que los

mejores rendimientos se obtienen si las muestras se procesan 2-3 horas después de su obtención para la detección de antígenos víricos mediante ensayos de inmunofluorescencia y antes de 48 horas para aislamiento de virus en cultivo celular. Cuando las muestras no puedan ser procesadas en el periodo de tiempo señalado deberán conservarse congeladas a -80°C .

El elevado número de virus que pueden estar involucrados en la patología respiratoria, y su enorme heterogeneidad, hace del diagnóstico etiológico una labor ardua y condiciona a la utilización de técnicas de amplio espectro, que abarquen la detección de un número considerable de virus. Los métodos de detección directos, que permiten el aislamiento del virus en cultivos celulares o determinan la presencia de alguno de sus componentes directamente en las muestras respiratorias, ya sean antígenos o genes, son los más extendidos en los laboratorios de microbiología clínica. Los métodos indirectos, basados en la detección de anticuerpos específicos presentan menor utilidad en el diagnóstico convencional y están siendo relegados como herramientas de estudio epidemiológico.

12.1. AISLAMIENTO MEDIANTE CULTIVO

Desde hace más de 50 años se ha utilizado el aislamiento de virus en cultivos celulares para establecer un diagnóstico virológico, siendo ésta una práctica general en cualquier laboratorio de virología. Tras la inoculación de las muestras en diferentes líneas celulares se puede observar un efecto citopático que demuestre el crecimiento del virus en dichas células. Una vez que éste ha crecido, su identificación se realiza por diferentes métodos. En general, el aislamiento del virus depende de diferentes factores entre los que destacan la calidad de muestra clínica y que ésta sea adecuada, la calidad de las líneas celulares elegidas y los reactivos requeridos en el proceso, y sobre todo la capacitación técnica por parte del personal que realiza los diferentes procedimientos. Una vez aislados en células susceptibles, facilitan estudios posteriores, generalmente centrados en la caracterización de cepas circulantes, el descubrimiento de nuevos virus o serotipos no esperados, los estudios fenotípicos de resistencias a agentes antivíricos, etc.

El aislamiento vírico se ha considerado el “*gold standard*” para la detección de virus y es el método de referencia. Sin embargo, desde hace más de una década los avances tecnológicos en el diagnóstico han permitido utilizar otras técnicas que incluyen los anticuerpos monoclonales o métodos moleculares que han resultado ser herramientas poderosas a la hora de establecer un diagnóstico de la infección vírica. La detección molecular de ADN y ARN y la amplificación genómica han sido introducidas con éxito en los laboratorios de diagnóstico debido a su elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Ante esta situación cabe preguntarse, si es útil el aislamiento en el diagnóstico

virológico y cuál debe ser el lugar de este tipo de técnicas en el laboratorio de virología.

La ventaja fundamental del cultivo celular es la confirmación de la viabilidad e infectividad del virus y la diferenciación entre virus capaces de infectar e incapaces de hacerlo. Esta información no es posible obtenerla utilizando los métodos de amplificación molecular y los métodos antigénicos de detección vírica. Además los virus aislados pueden estudiarse para conocer la sensibilidad a determinados antiviricos y la realización de estudios fenotípicos.

La selección, recogida, transporte y preparación de las muestras clínicas son factores muy importantes a considerar en el aislamiento de los virus en cultivos celulares y especialmente en los respiratorios ya que son particularmente frágiles. El principal objetivo de estos procedimientos es conservar el título viral y la infectividad en unos niveles óptimos hasta el momento de la inoculación.

12.2. TIPOS DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN PARA EL AISLAMIENTO DE VIRUS RESPIRATORIOS

De entre las muestras respiratorias que pueden recibirse en el laboratorio de virología, el aspirado nasofaríngeo es la muestra de elección ya que, en general, puede contener un número apropiado de células infectadas. Los hisopos nasofaríngeos contienen pocas células infectadas por lo que resultan menos útiles. Los lavados faríngeos o gargarismos se utilizan fundamentalmente para el aislamiento del virus de la gripe en pacientes adultos. Se pueden recibir aspirados bronquiales en pacientes intubados e incluso necropsias. Todas las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2-8°C y su traslado al laboratorio debe realizarse entre 24 a 48 horas como máximo. La muestra podrá ser congelada a -70°C si no es posible su uso inmediato.

12.3. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL AISLAMIENTO VIRICO

Además de la carga viral de la muestra, otros factores son el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta su procesamiento, la temperatura de conservación y el medio de transporte. El período de excreción viral de los virus respiratorios es en general muy corto por lo que la toma de la muestra debe ser entre las 48 a 72 horas del comienzo de los primeros síntomas. Una muestra obtenida después de 72 horas puede ofertar resultados falsos negativos. Si se sospecha infección nosocomial, la muestra del paciente hospitalizado se debe tomar durante las primeras 24 horas del ingreso hospitalario. La temperatura de conservación incide sobre la calidad de la muestra para el aislamiento vírico. Si la muestra se conserva y se transporta a una temperatura superior a 4°C, es posible obtener resultados falsos negativos. Cuando la temperatura disminuye a 0°C o incluso a -20°C la infectividad viral se pierde. Finalmente, existen diferentes medios de transporte de virus que pueden afectar la integridad de la partícula vírica por lo que se pueden recomendar o no para realizar al aislamiento del

virus. El Medio Esencial Mínimo (MEM) se considera la mejor alternativa y la solución salina tamponada (PBS) sólo es útil para el virus de la gripe. También se añaden al medio de transporte estabilizadores proteicos al 0,5% cuya función es la protección de la partícula vírica siendo el suero bovino fetal, la albúmina bovina y la lactoalbúmina los más comunes. Además la adición de antibióticos es obligatoria, para prevenir contaminaciones bacterianas (penicilina y estreptomocina) y fungicidas para prevenir la contaminación por hongos, el más comúnmente usado es la anfotericina B. El uso de concentraciones altas de estas sustancias puede provocar un efecto tóxico en el cultivo celular.

12.4. PRINCIPALES LÍNEAS CELULARES PARA AISLAMIENTO DE VIRUS RESPIRATORIOS

Las líneas celulares comúnmente empleadas para el aislamiento de virus respiratorios se detallan a continuación:

- NCI-H292: obtenida en 1980 a partir de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón. Puede sustituir a los cultivos primarios de riñón de mono para el aislamiento de los paramyxovirus humanos. Además es sensible a adenovirus y enterovirus. Crece en medio RPMI-1640 suplementado con 20 µM de glutamina, Hepes 25 mM y 10% de suero bovino fetal. El medio de inoculación es RPMI-1640 con 20 µM de glutamina y 1,5 µg/mL de tripsina y antibiótico (penicilina 100 U/mL-estreptomocina 100 mg/mL).
- HeLa: línea celular continua, obtenida en 1951 a partir de un carcinoma de cérvix humano. Es sensible a poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 3. Crece en medio mínimo esencial (MEM) con aminoácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de suero bovino fetal. El medio post-inoculación es MEM con 2% de suero bovino fetal y antibiótico al 0,1% (penicilina 100 U/mL-estreptomocina 100 mg/mL).
- HEp-2: línea continua, obtenida en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano. Es sensible a poliovirus tipo 1, adenovirus tipo 3. Crece en medio Eagle MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. El medio post-inoculación es Eagle MEM con 2% de suero bovino fetal y antibiótico al 0,1% (penicilina 100 U/mL-estreptomocina 100 mg/mL).
- Vero: obtenida en 1952 a partir de un riñón de un mono verde africano adulto normal. Es sensible a numerosos virus respiratorios. El medio de cultivo empleado es MEM con 5% de suero bovino fetal y el medio de post-inoculación es MEM con 2% de suero bovino fetal y antibiótico al 0,1% (penicilina 100 U/mL-estreptomocina 100 mg/mL).
- MDCK: línea continua obtenida 1958 a partir de riñón de *cocker spaniel* adulto aparentemente normal. Es sensible a los virus de la gripe tipos A y B, adenovirus tipo 4 y 5, coxsakievirus B5. El medio de cultivo empleado es Eagle MEM suplementado con glutamina 2,5 g/L, Hepes 25 mM y suero bovino fetal al 5%.

- MRC-5: obtenida de pulmón normal de un feto masculino de 14 semanas en 1966. Se ha descrito que es sensible a numerosos virus respiratorios. Se emplea como medio de cultivo, medio Eagle MEM con aminoácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de suero bovino fetal. El medio post-inoculación es Eagle MEM con 2% de suero bovino fetal y antibiótico al 0,1% (penicilina 100 U/mL-

estreptomina 100mg/mL).

12.5. CRECIMIENTO DE LOS PRINCIPALES VIRUS RESPIRATORIOS

En la Tabla 11 se exponen para diferentes virus respiratorios las líneas celulares y el tiempo necesario para la observación del efecto citopático en los cultivos convencionales.

Tabla 11. Virus respiratorios, líneas celulares y tiempo de observación de efectos citopáticos

| Virus respiratorio | Tipo de línea celular | Observación de efecto citopático |
|---------------------------|--|---|
| VRS | Hep-2 glutamina en mantenimiento, 50-75% confluencia, pH 7,2-7,4 Células primarias de riñón de mono Fibroblastos humanos | 3-7 días |
| hMPV | Células terciarias de riñón de mono LLC-MK2 VERO Hep-2 | 3-7 días |
| Parainfluenza humano | LLC-MK2 VERO NCI-H292 medio con tripsina PIV1 y 2 no para PIV3 | más de 10 días |
| Adenovirus | Hep-2 HeLa | |
| Rinovirus | Fibroblastos He-La | |

12.6. AMPLIFICACIÓN GENÓMICA POR TÉCNICAS MOLECULARES

La utilización generalizada de métodos de amplificación molecular en la detección de virus respiratorios ha permitido incrementar de manera considerable el número de muestras respiratorias en las que se detecta la presencia de alguno de los virus respiratorios, contribuyendo a mejorar el conocimiento de las patologías en las que están implicados estos virus. Este hecho es particularmente evidente en virus de difícil aislamiento, como por ejemplo el VPI-4, que ha pasado de ser considerado un patógeno poco frecuente y causante de infecciones respiratorias leves de vías superiores a tener una repercusión clínica al menos tan importante como la que tienen otros virus incluidos en el diagnóstico sistemático de la infección respiratoria de vías bajas.

Además de mejorar el rendimiento en el diagnóstico, la aplicación de técnicas moleculares ha aportado otras ventajas, entre las que destaca la identificación de nuevos virus asociados con la patología respiratoria en seres humanos. En los últimos años se han identificado el metapneumovirus humano, el bocavirus humano y tres nuevos coronavirus: CoV-SARS, CoV-NL63 y CoV-HKU1.

Por otro lado, la secuenciación de los productos obtenidos en la amplificación permite la realización de estudios adicionales de genotipado, epidemiología molecular y sensibilidad a

determinados antivíricos, por citar algunos ejemplos. Sin embargo, la elevada sensibilidad de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos también ha aportado algunos inconvenientes, como es la frecuente detección de virus en personas asintomáticas así como la detección prolongada de virus en pacientes que ya están recuperados de una infección respiratoria pasada. En líneas generales, la interpretación de la presencia del genoma de determinados virus en muestras respiratorias es difícil en tanto que es complicado diferenciar entre la colonización de las mucosas y la infección propiamente dicha, incluso en muestras procedentes del tracto respiratorio inferior que podrían haberse contaminado con la microbiota presente en la orofaringe. Sin duda alguna, el gran reto que plantean las infecciones víricas respiratorias no es otro que poder determinar si un virus detectado en el tracto respiratorio es el causante de la patología respiratoria.

Un hallazgo particularmente común en las infecciones víricas respiratorias es la relativa frecuencia con la que se observan las denominadas infecciones dobles, co-infecciones o infecciones por múltiples virus. En efecto, la detección de dos (o más) agentes víricos en un mismo proceso respiratorio puede ser interpretada como infección doble (múltiple) de las células del tracto respiratorio, sin embargo, también debería contemplarse la posibilidad de que sólo uno de los virus sea el

verdadero causante del síndrome y el segundo (o el resto) refleje una colonización asintomática del tracto respiratorio. Por tanto, sería más preciso hablar de co-detección o detección múltiple de virus en una misma muestra respiratoria. Las infecciones respiratorias atribuidas a más de un agente vírico no es un fenómeno que haya surgido con la generalización de las técnicas moleculares en los laboratorios de microbiología diagnóstica. Se admite que, con independencia de la utilización de la PCR, el porcentaje de estas infecciones aumenta proporcionalmente con el número de métodos empleados para realizar el diagnóstico. Una opción más que plausible para tratar determinar la verdadera implicación de un virus en la patología respiratoria podría ser la cuantificación del mismo en las muestras respiratorias mediante técnicas de PCR en tiempo real. No obstante, debemos ser conscientes de los problemas que plantea este tipo de muestras, muy variables en lo que respecta a localización, cantidad de muestra obtenida y homogeneidad de las mismas.

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el propio tubo de reacción. La detección de los productos amplificados se produce mediante detección de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN que se vaya sintetizando. La fluorescencia en una reacción puede ser debida al empleo de agentes intercalantes, que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN bicatenario, o bien sondas marcadas con fluorocromos. Además de la rapidez y la disminución del riesgo de contaminación por productos de amplificación, los sistemas de PCR en tiempo real permiten cuantificar de manera sencilla la concentración inicial de ADN o ARN presente en una muestra clínica. Para ello sólo se necesita incluir unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes del ADN diana para generar una curva patrón.

Aunque la comercialización de sistemas de PCR en tiempo real para el diagnóstico de virus respiratorios se limita, en el mejor de los casos, al virus de la gripe A, particularmente el subtipo H5N1, y CoV-SARS, comienzan a aparecer en el mercado *kits* para el resto de virus respiratorios que, con respecto a los métodos "caseros", y de manera generalizada, representan una garantía en lo que concierne a una correcta evaluación, estandarización y actualización de los oligonucleótidos y sondas utilizados. Estos *kits* suelen incorporar, además, un control interno de reacción para evitar los falsos negativos debidos a la presencia de sustancias inhibidoras de la ADN polimerasa en las muestras respiratorias.

Una limitación importante de los métodos de PCR en tiempo real es la detección múltiple. En este sentido los biochips de ADN ofrecen unas posibilidades sin precedentes, sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas aún no es comparable a los métodos tradicionales de amplificación múltiple. La aportación más novedosa al diagnóstico de infección respiratoria está llegando de la mano de los

denominados *chips de ADN en fase líquida*. En estos sistemas la accesibilidad de las sondas nucleotídicas se ha mejorado de manera que se ha incrementado la sensibilidad de la técnica, como demuestran varios estudios publicados recientemente.

13. BIBLIOGRAFIA

13.1. VIRUS DE LA GRIPE

1. Anónimo. New laboratory assay for diagnostic testing of avian influenza A/H5 (Asian Lineage). MMWR 2006; 55:127.
2. Belshe RB. Influenza prevention and treatment: current practices and new horizons. Ann Intern Med 1999; 131: 621-624.
3. Cooper LA, Subbarao K. A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. J Clin Microbiol 2000; 38:2579-2583.
4. Hayden FG, Pavia AT. Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. J Infect Dis 2006; 194 Suppl 2:S119-S126.
5. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. J Clin Microbiol 2001; 39:1696-1701.
6. Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, Erdman DD, Wright PF, Tang YW. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2007; 45:2105-2109.
7. Mehlmann M, Bonner AB, Williams JV, Dankbar DM, Moore CL, Kuchta RD, Podsiad AB, Tamerius JD, Dawson ED, Rowlen KL. Comparison of the MChip to viral culture, reverse transcription-PCR, and the QuickVue influenza A+B test for rapid diagnosis of influenza. J Clin Microbiol 2007; 45:1234-1237.
8. Murphy BR, Wester RG. Orthomyxoviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. Virology, 3ª de. Nueva York: Lippincot-Raven; 1996. Vol 1, pp. 1397-1445.
9. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. J Clin Microbiol 2002; 40:84-88.
10. Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, Smith CB, Cox NJ, Kuchta RD, Rowlen KL. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. J Clin Microbiol 2006; 44:2863-2871.
11. Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH, Gao L, Dong J, Zhang Y, Guo Y, Shu Y. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. J Clin Microbiol 2007; 45:1889-1892.

13.2. OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

1. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyytia T, Ruuskanen O. Human bocavirus and acute wheezing in children. Clin Infect Dis 2007; 44:904-910.
2. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:12891-12896.
3. Carman B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. Reviews in Medical Virology 2001; 11: 347-349.
4. Casas I, Avellan A, Mosquera M, Jabado O, Echevarria JE, Campos RH, Rewers M, Perez-Breña P, Lipkin WI, Palacios G. Molecular identification of adenoviruses in

- clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 6176-6182.
5. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1421-1429.
 6. García-García ML, Aguilar JC, Echevarría JE, Calvo C, Pinto I, Ordobás M, Román E, Pérez-Breña P. Infecciones por el virus parainfluenza tipo 4. *An Esp Pediatr* 2002; 57:116-120.
 7. García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Perez-Breña P. Human Metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatric Pulmonol* 2007;42:458-464.
 8. García-Rodríguez JA, Fresnadillo MJ. Microbiología de la infección respiratoria pediátrica. *An Esp Pediatr* 2002; 56 (Supl 1): 2-8.
 9. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007; 196:994-997.
 10. Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, Shult PA, Prudent JR, Gern JE. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2626-2634.
 11. Leland DS, Ginocchio C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20:49-78.
 12. Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, Erdman DD, Wright PF, Tang YW. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2007;45:2105-2109.
 13. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, Garcia ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1-7.
 14. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, Janeczko R. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2965-2970.
 15. Nolte FS, Marshall DJ, Raspberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, Arens MQ, Buller RS, Prudent JR. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2779-2786.
 16. Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Reviews in Medical Virology* 2001; 11: 351-354.
 17. Pirc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 2007; 81:3051-3057.
 18. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191:382-386.
 19. Tang RS, Mahmood K, Macphail M, Guzzetta JM, Haller AA, Liu H, Kaur J, Lawlor HA, Stillman EA, Schickli JH, Fouchier RA, Osterhaus AD, Spaete RR. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* 2005;23:1657-1667.
 20. Van der Hoek L, Pirc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, and Berkhout B. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368-373.
 21. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-724.
 22. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79:884-895.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT- VR-01
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN CULTIVO (*SHELL VIAL*) PARA VIRUS DE LA GRIPE Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

| ELABORADO | | REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio | |
|--------------|-------|---|-------|
| Nombre/Firma | Fecha | Nombre/Firma | Fecha |
| | | | |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01 | | Edición inicial |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

| | | | |
|---|--|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Detección de antígenos en cultivo (<i>shell via</i>) para virus de la gripe y otros virus respiratorios | PNT-VR-01 | |
| | | Edición N° 01 | Página 2 de 2 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

La finalidad que persigue esta técnica es detectar la presencia de antígenos víricos en los cultivos celulares inoculados con muestras en las que se sospecha la presencia de virus gripales o respiratorios. Su aplicación se puede efectuar en muestras clínicas obtenidas del tracto respiratorio y remitidas al laboratorio de microbiología, con la solicitud de detección por cultivo de estos patógenos.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas tradicionales de cultivo de virus respiratorios basados en el desarrollo del efecto citopático tienen el inconveniente de retrasar la obtención de los resultados. La detección de los antígenos tempranos mediante técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales aplicadas a cultivos sobre viales (*shell via*) permite observar la presencia de virus respiratorios en los cultivos tras 24 horas de incubación, lo que permite un diagnóstico precoz.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología" 2003.
- Manual de bioseguridad del laboratorio de virología.
- Manuales de instrucciones de los diferentes sistemas comerciales y aparatos utilizados.
- Gestión de residuos.

4. MUESTRAS

a) Volante de petición. El volante de solicitud que acompaña a cada muestra deberá cumplimentarse en su totalidad en los apartados de identificación de datos del paciente, médico solicitante, variables epidemiológicas y clínicas.

El laboratorio deberá registrar el día y la hora de entrada.

b) Tipos de muestras. Las muestras más utilizadas para el cultivo del virus de la gripe son los frotis faríngeos, que deberán obtenerse mediante frotación con hisopo de algodón en pilares y retrofaringe, para recoger células de descamación, evitando la recogida al mismo tiempo de moco o saliva para minimizar la contaminación de la muestra con bacterias comensales de la boca. También son válidos los lavados nasales obtenidos por aspiración, con o sin instilación de solución salina fisiológica estéril en frasco de Lee. Otras muestras utilizadas pero con menor rendimiento diagnóstico son los lavados broncoalveolares.

c) Transporte y conservación. Las muestras deberán recogerse de manera aséptica por personal cualificado y enviarse rápidamente al laboratorio para su posterior manipulación. Los frotis faríngeos

serán recogidos con torunda estéril en medio de transporte para virus, que contengan antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano (del tipo ViralPack, Biomedics®, Tres Cantos, Madrid). Los lavados nasales y broncoalveolares serán recogidos en recipientes estériles sin medio de transporte. El procesamiento de las muestras se realizará inmediatamente o ésta se conservará a -80°C hasta que se realice su procesamiento.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Mezcla antibiótica y antifúngica: Pen/Strep Fungizone Mix (100x): 10000 U penicilina/mL, 10000 µg estreptomina/mL, 25 µg fungizona/mL
- "*Shell-vial*". Se utilizan viales de plástico desechables que contienen un cubreobjetos de 0,13 mm de diámetro sobre los que se preparan las monocapas de células MDCK (Madin Darbin Cocker Kidney), A549, Hep2 y cultivo mixto (MDCK+A549+Hep2 a partes iguales).
- Medio de crecimiento. Composición: *Minimum Essential Medium Eagle* con *Earle's balanced salt solution* con 25 mM HEPES, sin L-Glutamine; BioWhittaker® (EMEM) + 6% suero bovino fetal + 2% L-glutamina (L-glutamine 200mM en solución 0,85% NaCl, BioWhittaker®) + 1% aminoácidos no esenciales (NEAA 100x, BioWhittaker®) + 1% de mezcla antibiótica.
- Medio de mantenimiento. Composición: EMEM + 1-2% suero bovino fetal + 2% L-glutamina + 1% aminoácidos no esenciales + 1% de mezcla antibiótica.
- Tripsina 2,5% (10x), BioWhittaker®.
- Acetona pura
- Anticuerpos monoclonales frente al virus de la gripe A y virus de la gripe B (u otros virus respiratorios), conjugados con isotiocianato de fluoresceína.

6. APARATOS Y MATERIALES

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de flujo laminar vertical, de nivel de bioseguridad tipo 2.
- Centrífuga con cestillos y adaptadores para los viales, hasta 4.000 x g.
- Estufa de CO₂, o convencional.
- Microscopio de fluorescencia con filtros para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.

6.2. MATERIALES

- Guantes y bata de trabajo.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Aguja enmangada con hilo de *nichrom*.
- Portaobjetos de vidrio.
- Cubreobjetos de vidrio.
- Recipientes para lavado de los portaobjetos.
- Cámara húmeda.

6.3. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

- Deben seguirse las normas básicas de protección frente a patógenos de transmisión respiratoria

| | | | |
|---|---|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Detección de antígenos en cultivo (<i>shell vial</i>) para virus de la gripe y otros virus respiratorios | PNT-VR-01 | |
| | | Edición N° 01 | Página 3 de 3 |

establecidas en el documento "Manual de bioseguridad del laboratorio de virología".

- El desecho de residuos debe realizarse de acuerdo con lo establecido en el documento "Gestión de residuos".

7. PROCESAMIENTO

La técnica de cultivo celular o "*shell vial*" se organiza en los siguientes pasos:

7.1. DESCONTAMINACIÓN.

La muestra se trata con una mezcla antibiótica y antifúngica para eliminar los microorganismos que podían contaminar la muestra. Esta mezcla se añade en una proporción de 10 µL de mezcla antibiótica por cada ml de muestra y se deja actuar a +4°C durante 1 hora.

7.2. INOCULACIÓN Y CONTACTO.

Después de la descontaminación se procede a la inoculación de la muestra en los viales de tipo *shell vial*. Se utilizan viales con monocapa de células MDCK (Madin Darbin Cocker Kidney), A549, Hep2 y cultivo mixto (MDCK+A549+Hep2 a partes iguales). Las monocapas se preparan de 3 a 7 días antes de la inoculación para obtener células confluentes con 2 ml, aproximadamente, de medio de crecimiento. Para la inoculación de la muestra primero se retira el medio de crecimiento y después se añaden 100 µl de muestra en cada uno de los cuatro viales. Posteriormente se centrifuga a 700x g durante 45 minutos. A continuación se mantienen estos viales en estufa a 37°C sin CO₂ durante una hora.

7.3. INCUBACIÓN.

Después se retira el inóculo (decantándolo en un contenedor con lejía) y se añaden 1-1,5 ml aproximadamente, de medio de mantenimiento. Para el cultivo de virus gripales, en cualquiera de las líneas celulares, el medio de mantenimiento de las células contiene tripsina a la concentración final del 2,5‰ (Trypsin 2,5% (10x), BioWhittaker®), en sustitución de las enzimas proteolíticas que estas células no poseen y que son necesarias para la activación de la hemaglutinina. Posteriormente se incuban los viales inoculados durante 48 horas a 37°C.

7.4. REVELADO Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO.

Tras 48 horas de incubación se retira el medio de mantenimiento de dos viales y se fijan con acetona pura a -20°C durante 10 minutos. Para identificar el tipo de virus aislado se tiñen posteriormente con anticuerpos monoclonales frente al virus de la gripe A, de la gripe B u otros virus respiratorios, conjugados con isotiocianato de fluoresceína en el vial que contiene la mezcla de células. Una vez teñidos se extrae el cubreobjetos mediante una aguja enmangada caliente perforando el fondo del tubo de plástico, empujando el cubreobjetos y recogiendo mediante pinzas teniendo cuidado de no dañar la monocapa. Este cubreobjetos se coloca

en un portaobjetos y se observa al microscopio de fluorescencia. Los virus gripales presentan un patrón de inmunofluorescencia nuclear.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- De cara a valorar su significación virológica la preparación debe mantener, al menos, un 20% de la superficie de la monocapa celular. La presencia de un foco de fluorescencia otorga positividad a la lectura.
- En el caso de que a las 48 horas las células no aparezcan como fluorescentes con ninguno de los anticuerpos monoclonales, esta muestra se considera negativa.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo; realización de la técnica; lectura de las preparaciones. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La positividad de la prueba *shell vial* frente a virus gripales y otros virus respiratorios indica la presencia de viriones en la muestra. Demuestra que el paciente sufre una infección activa con replicación del virus.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La mayor limitación de la prueba *shell vial* es que exagera la toxicidad de las muestras sobre la monocapa celular.
- La interpretación de los hallazgos de laboratorio debe de efectuarse de manera acorde con la valoración clínica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev 2007;20:49-78.
2. Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E; ARIVAC consortium. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. J Clin Virol 2004; 30:100-105.
3. World Health Organization. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Online July 2005. http://www.who.int/entity/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf
4. Zitterkopf NL, Leekha S, Espy MJ, Wood CM, Sampathkumar P, Smith TF. Relevance of influenza a virus detection by PCR, shell vial assay, and tube cell culture to rapid reporting procedures. J Clin Microbiol 2006; 44:3366-3367.

PNT-VR-02
DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES POR VIRUS GRIPALES MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA EN MUESTRAS RESPIRATORIAS

| ELABORADO | | REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio | |
|--------------|-------|---|-------|
| Nombre/Firma | Fecha | Nombre/Firma | Fecha |
| | | | |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01 | | Edición inicial |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

| | | | |
|---|---|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Diagnóstico de infecciones por virus gripales mediante inmunofluorescencia directa en muestras respiratorias | PNT-VR-02 | |
| | | Edición N° 01 | Página 2 de 2 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

La finalidad de este procedimiento es describir la aplicación técnica de la inmunofluorescencia directa para efectuar la detección de antígeno de virus gripales en muestras de individuos con infecciones respiratorias. Se documentan los tipos de muestras, su procesamiento y su interpretación en el laboratorio de microbiología.

2. FUNDAMENTO

En el transcurso de un proceso infeccioso de las vías respiratorias es posible detectar antígenos del agente responsable en muestras procedentes del foco de infección (moco nasal, exudado faríngeo, moco nasofaríngeo, esputo, líquido pleural, lavado broncoalveolar, etc.). La utilidad que representa para el clínico la obtención de un resultado rápido no necesita ser enfatizada.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 "Técnicas rápidas de detección de antígeno" (técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias), 2005.

4. MUESTRAS

a) Volante de petición. El volante de solicitud que acompaña a cada muestra deberá cumplimentarse en su totalidad en los apartados de identificación de datos del paciente, médico solicitante, variables epidemiológicas y clínicas.

El laboratorio deberá registrar el día y la hora de entrada.

b) Tipos de muestras. Las muestras utilizadas son los frotis faríngeos, lavados nasales y broncoalveolares, tal como se describe en el PNT-VR-01 de este procedimiento. Los frotis faríngeos deben recogerse raspando con escobillón de forma que se asegure la presencia de células descamativas en la muestra. En los lavados nasales debe evitarse el moco.

c) Transporte y conservación. El procesamiento de las muestras debe ser inmediato, por tanto el transporte también debe serlo. Si no fuera posible, se conservarán a -80°C hasta que se realice su procesamiento.

5. REACTIVOS

- Mezcla antibiótica y antifúngica: Pen/Strep Fungizone Mix (100x): 10000 U penicilina/mL, 10000 µg estreptomina/mL, 25 µg fungizona/mL.
- Tampón PBS

- Acetona pura
- Anticuerpos monoclonales frente al virus de la gripe A y virus de la gripe B.
- Conjugado de isotiocianato de fluoresceína.
- Líquido de montaje para microscopía.

6. APARATOS Y MATERIALES

El equipamiento necesario para la realización de la técnica descrita, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Cabina de flujo laminar vertical, de nivel de bioseguridad tipo 2.
- Agitador orbital
- Centrífuga
- Baño maría
- Vórtex
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Microscopio de fluorescencia con filtros para isotiocianato de fluoresceína, provisto de objetivos de 20X y 40X.
- Estufa de 37°C.
- Cámara húmeda
- Cubetas de tinción
- Recipientes para lavado de los portaobjetos
- Cubreobjetos
- Portaobjetos para inmunofluorescencia

7. PROCESAMIENTO

Se organiza en los siguientes pasos:

7.1. DESCONTAMINACIÓN.

Consiste en el tratamiento de la muestra con una mezcla antibiótica y antifúngica para eliminar los microorganismos que podían contaminar la muestra. Esta mezcla se añade en una proporción de 10 µL de mezcla antibiótica por cada ml de muestra y se deja actuar a 4°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se retiran los restos de moco.

7.2. PREPARACIÓN DE LA CAPA DE CÉLULAS EN EL PORTAOBJETOS.

La muestra se centrifuga durante 10 minutos a 700x g. Si queda un *pellet* visible, se reparte en varios pocillos del portaobjetos y se deja secar al aire. Si no queda *pellet* visible, la capa de células se preparará por centrifugación.

7.3. REVELADO Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO.

La preparación se fija con acetona pura a -20°C durante 10 minutos. Seguidamente se incuba a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales frente al virus de la gripe A y/o B, después se lava con tampón PBS y posteriormente se incuba durante 30 minutos en las mismas condiciones con el conjugado fluorescente. Por último, se lava nuevamente con PBS para eliminar los restos de conjugado que pudieran interferir en la lectura de resultados, se deja secar al aire, se coloca un cubreobjetos con líquido de

| | | | |
|---|---|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Diagnóstico de infecciones por virus gripales mediante inmunofluorescencia directa en muestras respiratorias | PNT-VR-02 | |
| | | Edición N° 01 | Página 3 de 3 |

montaje y se observa en el microscopio de fluorescencia.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considera un resultado positivo cuando se observa fluorescencia específica celular, con patrón nuclear.

9. RESPONSABILIDADES

Los profesionales técnicos deberán revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las muestras son potencialmente contagiosas y se deben manejar con precaución.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

De cara a la obtención de resultados representativos las muestras deben ser de calidad, con importante celularidad. Se debe minimizar al máximo la variabilidad interobservadores.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol.* 2006;78:1498-1504.
2. Minnich LL, Smith TF, Ray CG. Cumitech 24. Rapid detection of viruses by immunofluorescence. Coordinating ed., S. Specter. American Society for Microbiology, 1988. Washington, D.C.
3. Rahman M, Kieke BA, Vandermause MF, Mitchell PD, Greenlee RT, Belongia EA. Performance of Directigen flu A+B enzyme immunoassay and direct fluorescent assay for detection of influenza infection during the 2004-2005 season. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58:413-418.

PNT-VR-03

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS A INHIBIDORES DE NEURAMINIDASA EN VIRUS GRIPALES A EPIDÉMICOS

| ELABORADO | | REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio | |
|--------------|-------|---|-------|
| Nombre/Firma | Fecha | Nombre/Firma | Fecha |
| | | | |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01 | | Edición inicial |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

| | | | |
|---|--|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Secuenciación de ácidos nucleicos para la detección de resistencias a inhibidores de neuraminidasa en virus gripales A epidémicos | PNT-VR-03 | |
| | | Edición N° 01 | Página 2 de 2 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica de las fases preanalíticas y postanalíticas para la determinación de resistencias a inhibidores de neuraminidasa a partir de cultivos de virus gripales en línea celular (tubos, *shell-vial*) o huevos embrionados, mediante secuenciación de ácidos nucleicos. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología y virología clínica que realicen vigilancia de la circulación de virus gripales y detección de resistencias a inhibidores de neuraminidasa mediante técnicas genotípicas, y a aquellos que envíen muestras a laboratorios de referencia.

2.FUNDAMENTO

Las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos permiten conocer la secuencia de bases del gen de la neuraminidasa y localizar los cambios de aminoácidos relacionados con la resistencia a los antiviricos inhibidores de la neuraminidasa. El proceso de secuenciación consta de las siguientes fases:

- fase de extracción de ácidos nucleicos, a partir de sobrenadantes procedentes de cultivo celular vírico;
- fase de retro-transcripción y amplificación. El ARN liberado es transcrito en cADN y amplificado mediante el uso de iniciadores específicos del gen de la neuraminidasa. Los cebadores serán distintos dependiendo del subtipo de virus gripal sobre el que se vaya a realizar la determinación: N1 o N2;
- fase de purificación: consiste en la eliminación de productos de amplificación inespecíficos, dímeros de cebadores, etc, que se pudiesen formar durante la reacción de PCR. Esta fase es optativa y dependerá de la pureza con la que obtengamos nuestro producto de amplificación;
- fase de secuenciación: el producto amplificado se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxynucleótidos (ddNTPs) marcados (secuenciación unidireccional) y con iniciadores específicos (sentido y antisentido);
- fase de revelado: mediante el empleo de un secuenciador automático los amplificados se resuelven mediante electroforesis capilar o vertical, obteniéndose un electroferograma con la secuencia de bases.

Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos se edita y se compara, mediante el empleo de un *software* específico o de programas de alineamiento con una o varias secuencias de referencia procedentes de cepas prototipo y que obtenemos a través de las bases de datos de secuencias (p.ej: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y

procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

- Manuales de instrucciones de los sistemas comerciales y aparatos utilizados.

4. MUESTRAS

a) Volante de petición. El volante de solicitud que acompaña a cada muestra deberá cumplimentarse en su totalidad en los apartados de identificación de datos del paciente, médico solicitante, variables epidemiológicas, clínicas y de particular interés en este procedimiento: las variables terapéuticas. El laboratorio deberá registrar el día y la hora de entrada.

b) Tipos de muestras. Las muestras adecuadas para el estudio genotípico de resistencias mediante la técnica descrita en este procedimiento son sobrenadantes procedentes de cultivo celular o líquido alantoideo obtenido de cultivo en huevo embrionado en los que previamente se hayan cultivado muestras de origen respiratorio (frotis nasal, frotis faríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavado broncoalveolar, aspirado bronquial, aspirado traqueal) o virus procedente de un cultivo previo (subcultivo). Las condiciones de transporte y almacenamiento, cuando sea necesario, son:

- En el momento de la recogida de la muestra por parte del personal médico, de enfermería o técnico, identificarla correctamente con el nombre del paciente, origen de la muestra y fecha de recogida.
- Debido a la labilidad de los virus implicados en la infección respiratoria, el transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse de forma inmediata después de la recogida, o en su defecto refrigerarlas a 4°C en medio de transporte para virus. Si el envío al laboratorio de destino va a realizarse a través de una compañía de transportes, es preciso emplear un recipiente de seguridad biológica e introducirlo en un contenedor de poliestireno para su envío refrigerado con hielo seco. El proceso se completa con el adecuado precintado y envío.
- Una vez recibida la muestra en el laboratorio, y si el procesamiento no va a efectuarse de forma rápida, el almacenaje de la alícuota destinada para realizar técnicas de biología molecular debe realizarse preferiblemente a -70°C, o en su defecto, a -20°C, siempre teniendo en cuenta que a esta temperatura, dependiendo del virus y del tipo de muestra, el material genético puede sufrir mayor degradación.
- Los sobrenadantes procedentes de cultivo celular o líquido alantoideo deben guardarse también a -70°C hasta el momento de la extracción.

5. REACTIVOS

- Sistemas comercializados de extracción de ARN
- Tampón de lisis
- Kit Qiagen one step RT-PCR 5x buffer
- Tampón Tris-borato EDTA 0,5x
- Geles de agarosa
- Columnas de purificación de ácidos nucleicos
- BigDye terminador v3.1 para secuenciación
- Marcadores de peso molecular

6. APARATOS Y MATERIALES

- Batas de laboratorio
- Guantes
- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas de pipeta
- Cubetas de electroforesis-
- Secuenciador
- Centrífuga
- Vórtex
- Tubos Eppendorf

7. PROCESAMIENTO

Por el momento no existen técnicas comerciales para la secuenciación y detección de resistencias a inhibidores de neuraminidasa, sólo se dispone de métodos no comerciales o *in house* para la secuenciación de la neuraminidasa de los virus gripales. Por esta razón es muy importante la suscripción a algún programa de control de calidad

externo que permita la evaluación periódica del método utilizado.

Para la extracción, es recomendable utilizar métodos que además de destruir las proteínas, purifican el ARN de la muestra, como por ejemplo el método de isopropanol-etanol, método de Boom (sílice), extracción y purificación con columnas o extracción automatizada. Tanto el método de Boom, las columnas y la extracción automática están comercializadas con protocolos que dependen de la compañía que los comercializa.

En cualquiera de los métodos, comerciales o no, la muestra objeto de estudio se trata previamente con tampón o solución de lisis, de forma que se diluye en una determinada proporción dependiendo del método de extracción utilizado. A continuación se procede a retro-transcribir y amplificar el ARN extraído según el siguiente protocolo:

Iniciadores utilizados en la reacción de retro-transcripción y amplificación:

| Neuraminidasa | Iniciadores (5'-3') | Tamaño amplicón (pb) |
|---------------|--|----------------------|
| N1 | <i>Sense</i> AGGACAGAAGCCCTTATAGG <i>Antisense</i> TACTTGCAATGGTGAACGG | 963 |
| N2 | <i>Sense</i> ATTACAGGATTTGCACCTTT <i>Antisense</i> CAAAGGCCCCAGCCTTTCCT | 782 |

La mezcla de amplificación se obtiene utilizando el *kit* OneStep RT-PCR de Qiagen® según las siguientes concentraciones de reactivos:

| Qiagen® OneStep RT-PCR | 1x (µl) | Concentración final |
|-----------------------------------|---------|-------------------------|
| H ₂ O | 27 | |
| One Step RT-PCR 5x buffer | 10 | 2,5 mM Mg ²⁺ |
| dNTPs [10mM] | 2 | 0,4 mM |
| Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 2 | 0,4 µM |
| Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 2 | 0,4 µM |
| RT-PCR mix | 2 | |

El volumen final es de 45 µl por tubo de PCR al cual se añaden 5 µl del material extraído. Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen amplificar. Se colocan en el termociclador que se ha programado previamente para hacer una transcripción reversa de 50°C durante 30 minutos y una activación del enzima a 95°C durante 15 minutos. A continuación la reacción de amplificación tiene lugar durante 45 ciclos, cada ciclo consta de 1 minuto a 94°C para la desnaturalización del ADN, 1 minuto a 50°C para la hibridación, 1 minuto a 72°C para la extensión y finalmente 10 minutos a 72°C de

extensión final. A partir de esta amplificación se carga un gel de agarosa al 2% en tampón tris-borato de EDTA (TBE) al 0,5x para observar la banda de amplificado correspondiente. Si se obtiene una banda de amplificado intensa y nítida se puede obviar la fase de purificación, en caso contrario se debe purificar el producto obtenido mediante un *kit* comercial, de los habitualmente basados en la utilización de columnas. La secuenciación puede llevarse a cabo utilizando una mezcla que contenga 4 µl de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), 2 µl de cada cebador y 4 µl

de producto de amplificación purificado. En el caso de no purificar el amplicón se añaden 1 ó 2 µl del producto de PCR dependiendo de la intensidad de la banda y completar con agua hasta un volumen final de 10 µl. La reacción de secuenciación se realiza en un termociclador según el programa de temperaturas siguiente: 94°C durante 3 minutos de desnaturalización y 24 ciclos a 96°C, 10 segundos; 50°C, 10 segundos y 60°C, 4 minutos para finalmente utilizar un método enzimático de terminación de cadena automatizado.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las mutaciones implicadas en la adquisición de resistencias a inhibidores de neuraminidasa en los virus gripales A epidémicos (H3N2 y H1N1) se representan en la siguiente tabla:

| Virus | Posición | Oseltamivir | Zanamivir |
|-------|-------------|-------------|-----------|
| H3N2 | E119V/A/D/G | R | S |
| | R292K | R | R |
| | N294S | R | S |
| H1N1 | H274Y | R | S |

Es recomendable la obtención de una secuencia limpia y bidireccional al menos desde el codón 119 al 294 para los virus del subtipo H3N2 y de la posición 274 para los virus H1N1. Al editar la secuencia, es necesario revisar todos los codones de resistencia y compararlos con la (s) cepa (s) prototipo elegida (s). Se debe realizar un informe de resultados en el que figure la sensibilidad de la cepa. En el caso de encontrar un virus resistente, se procede a indicar la mutación encontrada y el fenotipo de resistencia para el que codifica.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio y en la descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico en técnicas de biología molecular que se hará responsable del procesamiento de las muestras y de la realización de las técnicas. El facultativo responsable del laboratorio será el encargado de la supervisión de la técnica y de la emisión de los resultados, resolución de dudas de tipo técnico, análisis de los posibles errores y adopción de las medidas correctoras pertinentes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio.

Para la realización de la técnica que se describe se deben tener en cuenta diversos aspectos estructurales, aplicables en general a todas las técnicas de amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos. En general se precisan al menos tres

zonas o áreas diferentes dentro del laboratorio para evitar problemas de contaminaciones: 1) la denominada "zona limpia" donde se prepararán los reactivos y las mezclas de amplificación y secuenciación; 2) la zona para realizar la reacción de amplificación; 3) el área para el manejo y análisis del material amplificado y/o secuenciado. En cada zona de trabajo debe existir un material (pipetas, puntas, batas de laboratorio, marcadores, etc.) específico de cada zona.

Nunca se debe trasladar material entre zonas, salvo el estrictamente necesario y siempre en dirección 1-2-3. Si no se dispone de áreas separadas, se pueden utilizar unidades de contención que permitan la separación física de los procesos: cabinas de flujo laminar equipadas con luz ultravioleta. Como recomendación general deberán evitarse, en lo posible, las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones tanto en lo referente al manejo de las muestras como a la dispensación de los reactivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La detección genotípica de resistencias a inhibidores de neuraminidasa en los virus gripales no siempre va a predecir la sensibilidad, debido a que podrían existir otras mutaciones capaces de conferir resistencia o sensibilidad disminuida a este grupo de antivirales y que aún se desconocen. Por ejemplo, se han encontrado cambios de aminoácidos en la hemaglutinina que producen variaciones en la sensibilidad a los inhibidores de la neuraminidasa, pero su descripción es meramente anecdótica en virus mutantes obtenidos *in vitro* con cambios específicos en el gen de la hemaglutinina (mutagénesis dirigida); por el momento se sospecha que dichos cambios podrían tener escasa relevancia a nivel clínico. Los virus cultivados sufren mutaciones producto de la adaptación del virus al cultivo, que pueden distorsionar los cambios detectados con respecto a la cepa original procedente de la muestra clínica, revirtiendo de un genotipo sensible a otro resistente o viceversa. Algunos virus con genotipo resistente a inhibidores de neuraminidasa presentan disminuida su tasa de replicación, por lo que el crecimiento en los medios de cultivo habituales puede resultar difícil.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 2004; 103:199-203.
- Kiso M, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004; 364:759-765.
- McKimm-Breschkin JL. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors--a review. *Antiviral Res* 2000; 47:1-17.
- Regoes RR, Bonhoeffer S. Emergence of drug-resistant influenza virus: population dynamical considerations. *Science* 2006; 312:389-391.
- Wright KE, et al. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1180-1184.

| | | | |
|---|--|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Detección de metapneumovirus humano en muestras respiratorias | PNT-VR-04 | |
| | | Edición N° 01 | Página 2 de 2 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de infección respiratoria asociada a metapneumovirus humano (hMPV) a partir de muestras clínicas respiratorias humanas mediante amplificación genómica del gen que codifica para la proteína matriz vírica. Este procedimiento es aplicable a los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico de infección respiratoria vírica mediante técnicas de amplificación de genoma.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) permiten detectar con una elevada sensibilidad y especificidad determinados fragmentos tanto de ARN como ADN genómico de virus respiratorios presentes en muestras clínicas procedentes de pacientes con infección respiratoria vírica aguda. Para el control de la reacción y de todo el procedimiento se pueden incluir un número conocido de copias de un ADN ajeno a la muestra que se amplifique simultáneamente con el fragmento diana del hMPV.

El proceso de amplificación genómica para la detección de hMPV consta de las siguientes fases:

- fase de extracción de ácidos nucleicos, a partir de muestras clínicas respiratorias;
- fase de retro-transcripción y amplificación. El ARN extraído es transcrito en cADN y amplificado mediante el uso de iniciadores específicos del gen que codifica la proteína matriz vírica;
- fase de reamplificación mediante PCR anidada: consiste en la amplificación de fragmentos internos de los productos de amplificación obtenidos en la fase anterior utilizando iniciadores que hibriden en zonas internas de dichos productos de amplificación. Se obtendrá una mayor sensibilidad que con la RT-PCR inicial;
- fase de visualización de productos de amplificación: los productos obtenidos en la reacción de PCR anidada se someten a electroforesis en gel de agarosa;
- fase de secuenciación: para conocer el serotipo de hMPV, el producto amplificado se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados (secuenciación unidireccional) y con los iniciadores específicos de la PCR anidada (sentido y antisentido);
- fase de revelado: mediante el empleo de un secuenciador automático los amplificados se resuelven mediante electroforesis capilar o vertical, obteniéndose un electroferograma con la secuencia de bases.

Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos se edita y se compara, mediante el empleo de un *software* específico o de programas de alineamiento con una o varias secuencias de referencia procedentes de cepas prototipo y que se obtienen a través de las bases de datos de secuencias

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>)

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

a) Volante de petición. El volante de solicitud que acompaña a cada muestra deberá cumplimentarse en su totalidad en los apartados de identificación de datos del paciente, médico solicitante, variables epidemiológicas y clínicas.

b) Tipos de muestras. Las muestras adecuadas para el diagnóstico de hMPV mediante la técnica descrita en este protocolo son exudados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, lavados bronquio-alveolares, aspirados bronquiales y aspirados traqueales.

Las condiciones de transporte y almacenamiento, cuando sea necesario, son:

- En el momento de la recogida de la muestra por parte del personal médico, de enfermería o técnico, identificarla correctamente con el nombre del paciente, origen de la muestra y fecha de recogida.
- Debido a la labilidad del hMPV, el transporte de las muestras al laboratorio de microbiología debe realizarse de forma inmediata después de la recogida, o en su defecto refrigerarlas a 4°C en medio de transporte para virus. Si el envío al laboratorio de destino va a realizarse a través de una empresa de transportes, se debe emplear un recipiente de seguridad biológica e introducir este en un contenedor de poliestireno para envío refrigerado con hielo seco. Precintar y enviar.
- Una vez recibida la muestra al laboratorio de microbiología, y si el procesamiento no va a efectuarse de forma rápida, el almacenaje de la alícuota destinada para realizar técnicas de biología molecular debe realizarse a -70°C.

5. REACTIVOS

- Sistemas comercializados de extracción de ARN
- Tampón de lisis
- Kit Access RT-PCR system (Promega)
- Kit Qiagen one step RT-PCR
- Tampón Tris-borato EDTA 0,5x
- Geles de agarosa
- Columnas de purificación de ácidos nucleicos
- BigDye terminador v3.1 para secuenciación
- Marcadores de peso molecular
- Buffer 5xB (ver composición en el apartado 7)

6. APARATOS Y MATERIALES

- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas de pipeta
- Cubetas de electroforesis

- Secuenciador
- Centrífuga
- Vórtex
- Tubos Eppendorf

7. PROCESAMIENTO

Para la extracción, es recomendable utilizar métodos que además de destruir las proteínas, purifican el ARN de la muestra, como por ejemplo el método de isopropanol-etanol, método de Boom (sílice), extracción y purificación con columnas o extracción automatizada. Tanto el método de Boom, las columnas y la extracción automática están comercializadas con protocolos que dependen de la empresa que los comercializa. Cuando se utiliza un control interno de amplificación se deberán elegir métodos de extracción de ácidos nucleicos que compatibilicen la extracción tanto del ARN como del ADN ya que se añadirán un número concreto de moléculas de ADN que se amplificarán simultáneamente con el fragmento vírico.

La primera fase de la extracción consta de un proceso mediante el cual la muestra objeto de estudio se trata previamente con tampón o solución de lisis que permite la ruptura de las membranas celulares y complejos proteicos, inactivando el virus infeccioso y liberando sus ácidos nucleicos al medio. En este buffer de lisis se añaden 100 copias de ADN de control interno procedente del *kit Access RT-PCR system* (Promega). A continuación el ARN vírico se retro-transcribe produciendo moléculas de cADN, y tanto el cADN como el ADN del control interno se amplifican específicamente según el siguiente protocolo:

Los iniciadores de hMPV y del control interno utilizados en la reacción de retro-transcripción, en la primera amplificación y en la reamplificación mediante PCR anidada son:

| hMPV | Iniciadores (5'-3') | Tamaño amplicón (pb) |
|-----------------|--|----------------------|
| 1ª reacción | <i>Sense</i> GAGTCCTAYCTAGTAGACAC <i>Antisense</i> TTGTYCCTTGRTGRCTCCA | 739 |
| PCR anidada | <i>Sense</i> GCRGCIATGTCTGTACTIONTCC <i>Antisense</i> TCTTGCAKATYYTRCTKATGCT | 486 |
| Control interno | Iniciadores (5'-3') | Tamaño amplicón (pb) |
| 1ª reacción | <i>Sense</i> GCTTGGGCGTGTCTCAAATCT <i>Antisense</i> GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT | 1128 |
| PCR anidada | <i>Sense</i> GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG <i>Antisense</i> AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG | 837 |

La mezcla de amplificación se obtiene utilizando el *kit OneStep RT-PCR* de Qiagen® según las siguientes concentraciones de reactivos:

| Qiagen® OneStep RT-PCR | 1x (µl) | Concentración final |
|--|---------|-------------------------|
| H ₂ O | 29 | |
| Qiagen One Step RT-PCR 5x buffer | 10 | 2,5 mM Mg ²⁺ |
| dNTPs [10mM] | 1 | 0,4 mM |
| hMPV Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| hMPV Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 0,5 | 0,05 µM |
| CI Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 0,5 | 0,05 µM |
| RT-PCR mix | 2 | |

El volumen final es de 45 µl por tubo de PCR al cual se añaden 5 µl del material extraído. Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen amplificar. Se colocan en el termociclador que se ha programado previamente para hacer una transcripción reversa de 45°C durante 45 minutos y una activación del enzima a 95°C durante 15 minutos. A continuación la reacción de amplificación tiene lugar durante 45 ciclos, cada ciclo consta de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización del ADN, 2 minutos a 53°C para la hibridación y 30 segundos a 68°C para la elongación del ADN. Finalmente se termina la reacción con un ciclo de 68°C durante 10 minutos.

Tras esta primera reacción de amplificación se realiza una segunda amplificación genómica utilizando como diana un fragmento interno de los productos de amplificación obtenidos en la primera reacción. Se preparan tubos para esta segunda amplificación cuya composición y concentraciones son:

| | 1x (µl) | Concentración final |
|--|---------|-------------------------|
| H ₂ O | 29,1 | |
| 5xB buffer ¹ | 10 | 2,5 mM Mg ²⁺ |
| dNTPs [100mM] | 0,4 | 0,4 mM |
| hMPV Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 3 | 0,3 µM |
| hMPV Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 3 | 0,3 µM |
| CI Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| Taq polimerasa | 0,5 | |

¹Buffer 5xB. Para conseguir una mayor eficacia en la amplificación interna se utiliza un buffer cuya composición es la siguiente:

| | stock | uso 5X |
|--|---------------------------|---------------|
| H ₂ O | libre de ARN y ADNasas | csp 50 ml |
| Tris-ClH pH 8.5 | 10 | 300 mM |
| (NH ₄) ₂ (SO ₄) | 1M | 75 mM |
| MgCl ₂ | 25mM | 10 mM |

El volumen final es de 48 µl por tubo de PCR al cual se añaden 2 µl del producto de amplificación de la primera reacción. Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen re-amplificar. Se colocan en el termociclador y a continuación se someten a la reacción de amplificación que tras una incubación a 95°C durante 2 minutos, tiene lugar durante 35 ciclos, en donde cada ciclo consta de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización del ADN, 2 minutos a 55°C para la hibridación y 3 minutos a 72°C para la elongación del ADN. Finalmente se termina la reacción con un ciclo de 72°C durante 10 minutos.

A partir de esta segunda amplificación se visualizan los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% en tampón tris-borato de EDTA (TBE) al 0,5x para observar las bandas de los amplificados correspondientes. Por una parte, si existe virus en cantidad detectable en la muestra clínica se obtendrá la correspondiente banda específica, por otra en todas las muestras se debe obtener una banda correspondiente al control interno.

Para conocer el serotipo de hMPV detectado (A/B) se procederá al estudio mediante secuenciación de la banda específica de hMPV que debe ser intensa y nítida. La secuenciación puede llevarse a cabo utilizando una mezcla que contenga 4 µl de BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), 2 µl de cada iniciador de segunda PCR y 4 µl de producto de amplificación purificado. En el caso de no purificar el producto de amplificación, añadir 1 ó 2 µl del producto de PCR dependiendo de la intensidad de la banda y completar con agua hasta un volumen final de 10 µl. La reacción de secuenciación se realiza en un termociclador según el programa de temperaturas siguiente: 94°C durante 3 minutos de desnaturalización y 24 ciclos a 96°C, 10 segundos; 50°C, 10 segundos y 60°C, 4 minutos para finalmente utilizar un método enzimático de terminación de cadena automatizado.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados que se obtienen en el primer análisis se deben considerar provisionales, exceptuando los resultados negativos. Para poder establecer un diagnóstico positivo se debe repetir el proceso completo en una segunda alícuota de muestra preparada de manera independiente y para este fin

en el momento de la recepción de la muestra al laboratorio:

| Primer ensayo | | |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Banda hMPV | Banda de Control interno | Resultados provisionales |
| SI | SI | Muestra positiva |
| NO | SI | Muestra negativa |
| NO | NO | Muestra conteniendo inhibidores |

| Segundo ensayo de confirmación | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Banda hMPV | Banda de Control interno | Resultados definitivos |
| SI | SI | Muestra positiva |
| NO | SI | Muestra negativa |
| NO | NO | Muestra conteniendo inhibidores |

Realizar un informe de resultados en el que figure el número de muestra de laboratorio y el resultado correspondiente.

En la figura 1 se muestra un ejemplo real de los resultados obtenidos en aspirados nasofaríngeos de pacientes ingresados en un hospital con un cuadro de bronquiolitis aguda tras haber realizado el procedimiento anteriormente expuesto.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio y en la descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico en técnicas de biología molecular que se hará responsable del procesamiento de las muestras y de la realización de las técnicas. El facultativo responsable del laboratorio será el encargado de la supervisión de la técnica y de la emisión de los resultados, resolución de dudas de tipo técnico, análisis de los posibles errores y adopción de las medidas correctoras pertinentes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio.

Para la realización de la técnica que se describe se deben tener en cuenta diversos aspectos estructurales, aplicables en general a todas las técnicas de amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos. En general se precisan al menos tres zonas o áreas diferentes dentro del laboratorio para

evitar problemas de contaminaciones: 1) la denominada "zona limpia" donde se prepararán los reactivos y las mezclas de amplificación y secuenciación; 2) la zona para realizar la reacción de amplificación; 3) el área para el manejo y análisis del material amplificado y/o secuenciado. En cada zona de trabajo debe existir un material (pipetas, puntas, batas de laboratorio, marcadores, etc.) específico de cada zona. Nunca se debe trasladar material entre zonas, salvo el estrictamente necesario y siempre en dirección 1-2-3. Si no se dispone de áreas separadas, se pueden utilizar unidades de contención que permitan la separación física de los procesos: cabinas de flujo laminar equipadas con luz ultravioleta. Como recomendación general deberán evitarse, en lo posible, las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones tanto en lo referente al manejo de las muestras como a la dispensación de los reactivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

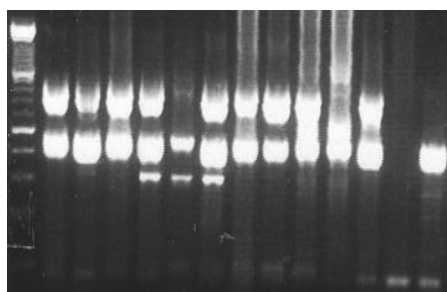
La sensibilidad del procedimiento descrito se ha calculado entre 1-5 copias de genoma de hMPV. Una de las limitaciones mayores de este tipo de procedimientos son las muestras clínicas en las que se ensayan debido a que la carga vírica de los virus respiratorios en las diferentes muestras clínicas puede ser muy diferente.

La elevada sensibilidad de esta técnica hace que se deban extremar las medidas de prevención de contaminaciones, siendo muy importante la inclusión en cada ensayo de controles negativos adecuados que permitan la exclusión de posibles contaminaciones.

La existencia de coinfecciones víricas en las infecciones respiratorias es un hecho muy frecuente y muchas veces la detección de genoma vírico hMPV puede estar o no asociado a un determinado proceso clínico.

Figura 1. Detección de hMPV en aspirados nasofaríngeos

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



→ 837 bp Control Interno
→ 486 bp hMPV

Muestras positivas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13

Muestras inhibidas: 12

Nota: las muestras 4, 5 y 6 presentan bandas inespecíficas

12. BIBLIOGRAFÍA

- Casas I, Pozo F. Síndrome respiratorio agudo grave, gripe aviar e infección por metapneumovirus humano. *Enf Infec Microbiol Clin* 2005; 23:438- 448.
- García ML, Calvo C, de Cea JM, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatric Pulmonology* 2006; 41:863-871.
- García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Arch Dis Child* 2006; 91:290-295.
- López-Huertas MR, Casaa I, Acosta-Herrera B, García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Meth* 2005;129:1-7.

| | | | |
|---|--|------------------|---------------|
| Servicio de Microbiología Hospital | Detección de bocavirus humano en muestras respiratorias | PNT-VR-05 | |
| | | Edición N° 01 | Página 2 de 2 |

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de infección respiratoria asociada a Bocavirus humano (hBoV) a partir de muestras clínicas respiratorias humanas mediante amplificación genómica de un fragmento de los genes que codifican la nucleoproteína 1 (NP-1) y la región amino terminal del complejo estructural VP1/VP2. Este procedimiento es aplicable a los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico de infección respiratoria vírica mediante técnicas de amplificación de genoma.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) permiten detectar con una elevada sensibilidad y especificidad determinados fragmentos tanto de ARN como ADN genómico de virus respiratorios presentes en muestras clínicas procedentes de pacientes con infección respiratoria vírica aguda. Para el control de la reacción y de todo el procedimiento se pueden incluir un número conocido de copias de un ADN ajeno a la muestra que se amplifique simultáneamente con el fragmento diana del hBoV.

El proceso de amplificación genómica para la detección de hMPV consta de las siguientes fases:

- fase de extracción de ácidos nucleicos, a partir de muestras clínicas respiratorias;
- fase de amplificación. El ADN extraído es amplificado mediante el uso de iniciadores específicos de los genes que codifican la nucleoproteína 1 (NP-1) y la región amino terminal del complejo estructural VP1/VP2;
- fase de reamplificación mediante PCR anidada: consiste en la amplificación de fragmentos internos de los productos de amplificación obtenidos en la fase anterior utilizando iniciadores que hibriden en zonas internas de dichos productos de amplificación. Se obtendrá una mayor sensibilidad que con la RT-PCR inicial;
- fase de visualización de productos de amplificación: los productos obtenidos en la reacción de PCR anidada se someten a electroforesis en gel de agarosa.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

4. MUESTRAS

a) Volante de petición. El volante de solicitud que acompaña a cada muestra deberá cumplimentarse en su totalidad en los apartados de identificación de datos del paciente, médico solicitante, variables epidemiológicas y clínicas.

b) Tipos de muestras. Las muestras adecuadas para el diagnóstico de hBoV mediante la técnica descrita en este protocolo son exudados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, lavados bronquio-alveolares, aspirados bronquiales, aspirados traqueales, heces y suero.

Las condiciones de transporte y almacenamiento, cuando sea necesario, son:

- En el momento de la recogida de la muestra por parte del personal médico, de enfermería o técnico, identificarla correctamente con el nombre del paciente, origen de la muestra y fecha de recogida.
- Debido a la labilidad del hBoV, el transporte de las muestras al laboratorio de microbiología debe realizarse de forma inmediata después de la recogida, o en su defecto refrigerarlas a 4°C en medio de transporte para virus. Si el envío al laboratorio de destino va a realizarse a través de una empresa de transportes, se debe emplear un recipiente de seguridad biológica e introducir este en un contenedor de poliestireno para envío refrigerado con hielo seco. Precintar y enviar.
- Una vez recibida la muestra al laboratorio de microbiología, y si el procesamiento no va a efectuarse de forma rápida, el almacenaje de la alícuota destinada para realizar técnicas de biología molecular debe realizarse a -70°C.

5. REACTIVOS

- Sistemas comercializados de extracción de ADN
- Tampón de lisis
- Kit Access RT-PCR system (Promega)
- Tampón Tris-borato EDTA 0,5x
- Geles de agarosa
- Buffer 5xB (ver composición en el apartado 7)

6. APARATOS Y MATERIALES

- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas de pipeta
- Cubetas de electroforesis
- Centrífuga
- Vórtex
- Tubos Eppendorf

7. PROCESAMIENTO

Para la extracción, es recomendable utilizar métodos que además de destruir las proteínas, purifiquen el ADN de la muestra, como por ejemplo el método de isopropanol-etanol, método de Boom (sílice), extracción y purificación con columnas o extracción automatizada. Tanto el método de Boom, las columnas y la extracción automática están comercializadas con protocolos que dependen de la empresa que los comercializa. Cuando se utiliza un control interno de amplificación se deberán añadir un número concreto de moléculas de ADN de dicho control en el momento de la extracción y se amplificarán simultáneamente con el fragmento vírico.

La primera fase de la extracción consta de un proceso mediante el cual la muestra objeto de

estudio se trata previamente con tampón o solución de lisis que permite la ruptura de las membranas celulares y complejos proteicos, inactivando el virus infeccioso y liberando sus ácidos nucleicos al medio. En este buffer de lisis se añaden 100 copias de ADN de control interno procedente del *kit Access RT-PCR system* (Promega). A continuación el ADN vírico y el ADN del control interno se amplifican específicamente según el siguiente protocolo: Los iniciadores de hBoV y del control interno utilizados en la primera amplificación y en la reamplificación mediante PCR anidada son:

| hBoV | Iniciadores (5'-3') | Tamaño amplicón (pb) |
|-------------|--|-----------------------------|
| 1ª reacción | <i>Sense</i> CACAGGAGCMGGAGYCGCAG <i>Antisense</i> CCAAGATATYTRTATCCAGG | 609 |
| PCR anidada | <i>Sense</i> GTGGTGTGGGTTCTACTGGC <i>Antisense</i> CTACGGTACACATCATCCAG | 243 |

| Control interno | Iniciadores (5'-3') | Tamaño amplicón (pb) |
|------------------------|---|-----------------------------|
| 1ª reacción | <i>Sense</i> GCTTGGGCGTGTCTCAAATCT <i>Antisense</i> GTCGCCACGGTTGATGAGAGC T | 1128 |
| PCR anidada | <i>Sense</i> CGTAATGGCTGGCCTGT <i>Antisense</i> GTAATGCTCTGCCAGTGT | 350 |

La mezcla de amplificación se obtiene utilizando un buffer de reacción (Buffer 5xB) cuya composición y concentraciones se detalla a continuación:

| | stock | uso 5X |
|--|------------------------|---------------|
| H ₂ O | libre de ARN y ADNasas | csp 50 ml |
| Tris-CIH pH 8,5 | 10 | 300 mM |
| (NH ₄) ₂ (SO ₄) | 1M | 75 mM |
| MgCl ₂ | 25 mM | 10 mM |

Esta mezcla de amplificación se prepara con los componentes y concentraciones que a continuación se especifican:

| 1ª reacción | 1x (µl) | Concentración final |
|--|----------------|----------------------------|
| H ₂ O | 29.1 | |
| Buffer 5xB | 10 | 2 mM Mg ²⁺ |
| dNTPs [100mM] | 0.4 | 0,4 mM |
| hBoV Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| hBoV Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| Taq polimerasa | 0,5 | |

El volumen final es de 45 µl por tubo de PCR al cual se añaden 5 µl del material extraído. Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen amplificar. Se colocan en el termociclador y a continuación se someten a la reacción de amplificación que tras una incubación a 94°C durante 2 minutos, tiene lugar durante 40 ciclos, cada ciclo consta de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización del ADN, 1 minuto a 55°C para la hibridación y 30 segundos a 72°C para la elongación del ADN. Finalmente se termina la reacción con un ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Tras esta primera reacción de amplificación se realiza una segunda amplificación genómica utilizando como diana un fragmento interno de los productos de amplificación obtenidos en la primera reacción. Se preparan tubos para esta segunda amplificación cuya composición y concentraciones son:

| Segunda reacción | 1x (µl) | Concentración final |
|--|----------------|----------------------------|
| H ₂ O | 34,1 | |
| Buffer 5xB | 10 | 2,5 mM Mg ²⁺ |
| dNTPs [100mM] | 0,4 | 0,4 mM |
| hBoV Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| hBoV Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Sense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| CI Iniciador <i>Antisense</i> [10µM] | 1 | 0,1 µM |
| Taq polimerasa | 0,5 | |

El volumen final es de 49 µl por tubo de PCR al cual se le añaden 2 µl del producto de amplificación de la primera reacción. Se preparan tantos tubos como muestras distintas se deseen re-amplificar. Se colocan en el termociclador y a continuación se someten a la reacción de amplificación que tras una incubación a 94°C durante 2 minutos, tiene lugar durante 35 ciclos, cada ciclo consta de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización del ADN, 1 minuto a

55°C para la hibridación y 30 segundos a 72°C para la elongación del ADN. Finalmente se termina la reacción con un ciclo de 72°C durante 5 minutos.

A partir de esta segunda amplificación se visualizan los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% en tampón tris-borato de EDTA (TBE) al 0,5x para observar las bandas de los amplificados correspondientes. Por una parte, si existe virus en cantidad detectable en la muestra clínica se obtendrá la correspondiente banda específica, por otra en todas las muestras se debe obtener una banda correspondiente al control interno.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados que se obtienen en el primer análisis se deben considerar provisionales, exceptuando los resultados negativos. Para poder establecer un diagnóstico positivo se debe repetir el proceso completo en una segunda alícuota de muestra preparada de manera independiente y para este fin en el momento de la recepción de la muestra al laboratorio:

| Primer ensayo | | |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Banda hBoV | Banda de Control interno | Resultados provisionales |
| SI | SI | Muestra positiva |
| NO | SI | Muestra negativa |
| NO | NO | Muestra conteniendo inhibidores |

| Segundo ensayo de confirmación | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Banda hBoV | Banda de Control interno | Resultados definitivos |
| SI | SI | Muestra positiva |
| NO | SI | Muestra negativa |
| NO | NO | Muestra conteniendo inhibidores |

Realizar un informe de resultados en el que figure el número de muestra de laboratorio y el resultado correspondiente.

En la figura 1 se muestra un ejemplo real de los resultados obtenidos en aspirados nasofaríngeos de pacientes ingresados en un hospital con un cuadro de bronquiolitis aguda tras haber realizado el procedimiento anteriormente expuesto.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio y en la descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico en técnicas de biología molecular que se hará responsable del procesamiento de las muestras y de la realización de las técnicas. El facultativo responsable del laboratorio será el encargado de la supervisión de la técnica y de la emisión de los resultados, resolución de dudas de tipo técnico, análisis de los posibles errores y adopción de las medidas correctoras pertinentes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio.

Para la realización de la técnica que se describe se deben tener en cuenta diversos aspectos estructurales, aplicables en general a todas las técnicas de amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos. En general se precisan al menos tres zonas o áreas diferentes dentro del laboratorio para evitar problemas de contaminaciones: 1) la denominada "zona limpia" donde se prepararán los reactivos y las mezclas de amplificación y secuenciación; 2) la zona para realizar la reacción de amplificación; 3) el área para el manejo y análisis del material amplificado y/o secuenciado. En cada zona de trabajo debe existir un material (pipetas, puntas, batas de laboratorio, marcadores, etc.) específico de cada zona. Nunca se debe trasladar material entre zonas, salvo el estrictamente necesario y siempre en dirección 1-2-3. Si no se dispone de áreas separadas, se pueden utilizar unidades de contención que permitan la separación física de los procesos: cabinas de flujo laminar equipadas con luz ultravioleta. Como recomendación general deberán evitarse, en lo posible, las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones tanto en lo referente al manejo de las muestras como a la dispensación de los reactivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La sensibilidad del procedimiento descrito se ha calculado entre 1-5 copias de genoma de hBoV. Una de las limitaciones mayores de este tipo de procedimientos son las muestras clínicas en las que se ensayan debido a que la carga vírica de los virus respiratorios en las diferentes muestras clínicas puede ser muy diferente.

La elevada sensibilidad de esta técnica hace que se deban extremar las medidas de prevención de contaminaciones, siendo muy importante la inclusión en cada ensayo de controles negativos adecuados que permitan la exclusión de posibles contaminaciones.

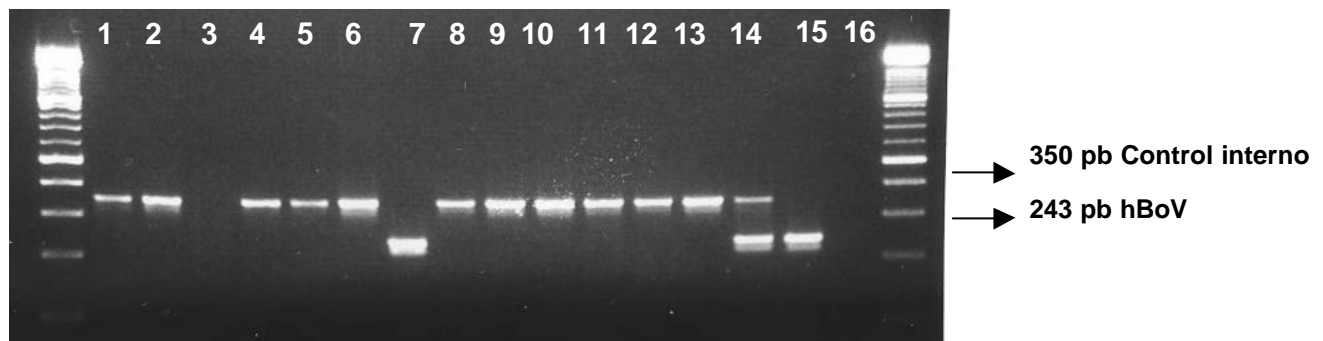
La existencia de coinfecciones víricas en las infecciones respiratorias es un hecho muy frecuente y muchas veces la detección de genoma vírico hBoV puede estar o no asociado a un determinado proceso clínico. Debido a que este virus fue descubierto en el año 2005 existen pocas evidencias acerca de sus

características y manifestaciones clínicas asociadas. Se desconocen los periodos de circulación anual e incluso su participación como agente causal de infección respiratoria. En el último año 2007, se han descrito varias series de pacientes en donde se ha detectado ADN de hBoV y se relacionan con diferentes aspectos clínicos. La posible afectación sistémica hace que pueda detectarse en muestras de suero.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinene P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van der Hoogen BG, Hyypia T, Ruuskanene O. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 904-910.
2. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S, Bracamonte T, Casas I. Human Bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J* (en prensa).
3. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Vázquez MC, González A, Pérez-Breña P, Casas I. Infecciones por bocavirus humano en niños españoles: características clínicas y epidemiológicas de un virus respiratorio emergente. *An Pediatr (Barc)*. 2007; 67:212-219.
4. Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007; 40:224-228.

Figura 1. Detección de hBoV en aspirados nasofaríngeos



Muestras positivas: 7, 14, 15

Muestras inhibidas: 3, 16

Muestras negativas: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13