

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Detección y caracterización rápida de los virus de influenza A y B en secreciones nasofaríngeas mediante el método de la inmunoperoxidasa

Dra. Suset Oropesa Fernández,¹ Dra. Dalia Rodríguez Peralta,² Dr. Angel Goyenechea Hernández,³ Lic. Luis Morier Díaz,⁴ Téc. Bárbara Hernández Espinosa,⁵ Dr. Ángel Valdivia Romero,⁶ Lic. Danay Chacón⁷ y Lic. Zoila González Medina⁸

RESUMEN

Con el objetivo de identificar en forma rápida los virus de influenza, se estudiaron 148 muestras de pacientes con sintomatología compatible con esta entidad. Para ello fue desarrollado un cultivo rápido de células MDCK-1, en placas de 96 pozuelos, donde fueron inoculados los exudados nasofaríngeos o gargarismos, e incubados durante una noche a 37°C, el medio fue eliminado y las células fueron lavadas con *buffer* fosfato salina; posteriormente fueron fijadas con metanol y los antígenos virales detectados por la técnica de inmunoperoxidasa mediante un *pool* de anticuerpos monoclonales contra la influenza A y otro contra la influenza B. Para el subtipaje en A (H_3N_2) se utilizó el anticuerpo monoclonal HA1-71, mientras que el anticuerpo monoclonal HA2-76 reacciona con ambos subtipos A (H_3N_2) y A (H_1N_1). Del total de muestras positivas (136) correspondió 72,1 % para el tipo A y a los subtipos H_1 y H_3 , 34,6 y 37,5 %, respectivamente. La influenza B se detectó en 27,9 % de las 148 muestras investigadas, sólo 12 resultaron negativas (8,1 %). Se recomienda la utilización de esta técnica como un método de diagnóstico rápido, sensible, conveniente y fácil de realizar e interpretar para la detección y caracterización en tipo y subtipo de los virus de influenza a partir de exudados nasofaríngeos o gargarismos.

Descriptores DeCS: ORTHOMYXOVIRUS TIPO A/aislamiento & purificación; ORTHOMYXOVIRUS TIPO B/aislamiento & purificación; NASOFARINGE/inmunología; TECNICAS PARA INMUNOENZIMAS; EXUDADOS & TRANSUDADOS; CULTIVO DE CELULA.

Un gran número de laboratorios participa en la vigilancia de la actividad de los virus de influenza y sus cambios, debido a la necesidad de informar tempranamente la presencia de nuevas cepas epidémicas y la diferenciación entre los tipos A y B.

Por tradición, esta diferenciación se realiza por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) con antiseros específicos,^{1,2}

que es, además, muy laboriosa, en ocasiones se necesita dar repetidos pases por embrío de pollo o en cultivos celulares³ para obtener títulos altos de hemaglutinación que permitan identificar el agente por este método, lo que causa una dilatación considerable del diagnóstico.

A través del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas para el diagnóstico rápido de los virus de

1. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).
2. Doctora en Medicina Veterinaria. Centro Nacional de Diagnóstico Veterinario.
3. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. IPK.
4. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.
5. Técnico. IPK.
6. Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. IPK.
7. Licenciada en Microbiología. IPK.
8. Licenciada en Educación. Especialista en Microbiología. IPK.

la influenza. Entre ellas, la detección de los antígenos virales, después de una corta incubación en cultivos celulares infectados, por la técnica de inmunoperoxidasa, la que ha encontrado una extensa aplicación en el diagnóstico virológico. Estas técnicas combinan la sensibilidad del aislamiento viral en el cultivo celular y la detección directa de antígenos en muestras clínicas por inmunofluorescencia, ELISA y la detección de ácidos nucleicos virales por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁴⁻⁶

Usando anticuerpos monoclonales (Acs M) contra los virus de influenza A y B, y Acs M contra la hemaglutinina desnaturalizada y fragmentada de estos virus, se ha desarrollado un método de cultivo rápido para la caracterización en tipo y subtipo de cepas de influenza humana A (H_3N_2) y tipo B, mediante la técnica de inmunoperoxidasa.^{7,8} Esta técnica fue validada en nuestro laboratorio aplicándola a un grupo de cepas de referencias, y en aislamientos realizados entre 1992 y 1994 que habían sido caracterizados mediante IH. A partir de los resultados obtenidos, se decidió aplicarla a gargarismos y exudados nasofaríngeos para comprobar la efectividad del método cuando se aplica de forma directa.

MÉTODOS

Células. En todos los experimentos se utilizaron células MDCK-L³ multiplicadas en Medio Eagle (Dulbecco's modificado), suplementado con 5 % de suero bovino fetal (SBF), 0,2 % de albumina y 25 mM de Hepes y antibiótico (penicilina y estreptomycin).

Virus. Se utilizaron como controles las siguientes cepas de referencias: A/Texas/36/91 (H_1N_1), A/Beijing/352/89 (H_3N_2) y B/Panamá/45/90.

Muestras clínicas. Se procesaron 148 exudados nasofaríngeos o gargarismos, pertenecientes a diferentes temporadas de influenza en Cuba, desde 1992 hasta 1995, los que se mantuvieron almacenados a -70 °C hasta ser utilizados en nuestro estudio para detectar o no la presencia del virus de influenza. En 23 de estas muestras ya se había efectuado antes el aislamiento y la caracterización del virus de influenza.

Anticuerpos monoclonales (Acs M). Para la tipificación de los virus de influenza, fueron utilizados un pool de influenza A, que contenía Acs M

contra la nucleoproteína de estos virus, y el pool B, que contenía un anticuerpo contra la nucleoproteína y otro contra la hemaglutinina de los virus de influenza B. Los Acs M HA1-71 y HA2-76, se usaron para subtipar los virus de tipo A en los subtipos H_3 y H_1 .^{9,10} Estos Acs M proceden del CDC de Atlanta, Georgia, EE.UU.

Los pools A y B se usaron en diluciones de 1:1 000 y 1:500, respectivamente, y la dilución de trabajo de los Acs M HA1-71 y HA2-76 fue de 1:400.

Tipo y subtipo de *influenzavirus*.¹¹ Se sembraron placas de cultivo celular de 96 pozuelos (Costar, Cambridge, Mass.) con 10 000 células por pozuelo en 100 μ L de medio para crecimiento que contenía 1 % de suero de bovino fetal, al que se le añadieron 4 μ g de tolylsulfonyl Ketone (TPCK), tripsina al 0,25 % (Sigma Chemical, Co., St. Louis, Mo.). Cada muestra clínica homogeneizada se inoculó en 4 pozuelos a razón de 20 μ L por pozuelo.

Como control negativo se reservaron en cada placa 4 pozuelos sin inocular, y los 3 controles de virus (H_1H_3 y B) fueron inoculados de igual forma que las muestras en estudio.

Las placas se incubaron a 37 °C en CO₂, al 5 % durante 20 min, para equilibrar el pH de la placa, y después fueron centrifugadas a 2 500 rpm a temperatura ambiente por 45 min. Después de una noche de incubación (16 a 20 h), el medio fue eliminado y las células lavadas 2 veces con *buffer* fosfato salina (PBS), fueron fijadas con metanol absoluto, se le añadieron al pocillo en forma gradual 50 y 100 μ L más de metanol absoluto, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min, se eliminó el metanol de todos los pozuelos y se lavaron nuevamente 2 veces con PBS.

Los 4 Acs M se diluyeron en PBS (como ya se señaló) que contenía 5 % de leche en polvo descremada y cada uno fue añadido a un pozuelo de cada muestra (75 μ L).

Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h se lavaron posteriormente 4 veces con PBS y más tarde se incubaron con un anticuerpo antirratón conjugado con peroxidasa (Amersham) por 60 min y en una dilución de 1:1 000 (75 μ L en cada pozuelo).

Antes de agregar el sustrato se añadió 1 μ L de peróxido (H_2O_2 al 30 % p/v BDH) y se dispensaron 60 μ L en cada pozuelo. El color de la reacción se desarrolló entre los 30 y 60 min. La solución de

sustrato fue eliminada y reemplazada por 100 μ L de PBS por pozuelo, la lectura se realizó en un microscopio de luz invertida.

La coloración roja intracelular en las muestras clínicas se interpreta como un resultado positivo de infección y su ausencia como negativo.

En las células de control constituyen resultados positivos para la prueba: la coloración roja intracelular en los inoculados con las cepas de referencia (control positivo) y la ausencia de coloración en los no inoculados (control negativo).

RESULTADOS

Las células infectadas con los virus influenza tipos A y B reaccionaron con una intensa coloración roja citoplasmática contra los *pools* A y B, respectivamente.

Los virus de influenza A que reaccionaron con coloración frente a los Acs M HA 1-71 y HA2-76, clasifican en el subtipo H_3 y los que reaccionan sólo frente al HA2-76 en el subtipo H_1 .¹²

Las cepas de referencia (controles positivos) reaccionaron frente a sus correspondientes anticuerpos monoclonales, lo que confirma el resultado positivo del ensayo desde el punto de vista de su especificidad. No se observó ninguna reacción de coloración en los cultivos no infectados (control negativo).

Las diluciones de los Acs M, conjugado y sustrato utilizadas, resultaron adecuadas en nuestro estudio. No se detectaron reacciones cruzadas, ni inespecíficas, frente a los 4 Acs M probados.

Los resultados obtenidos al aplicar de forma directa este método a las 23 muestras donde se había aislado y caracterizado antes el virus de influenza por las técnicas de IH e inmunoperoxidasa fueron totalmente coincidentes.

En la tabla 1 se distribuyen los resultados obtenidos durante el período estudiado y en la tabla 2 se señalan los porcentajes de positividad para cada tipo de virus de influenza.

En las 148 muestras clínicas analizadas y colectadas durante 4 estaciones de influenza (desde 1992 hasta 1995) en Ciudad de La Habana, se obtuvieron resultados positivos en 136 muestras (91,9 %) y solo 12 gargarismos (8,1 %) resultaron negativos, mediante el método de la inmunoperoxidasa.

TABLA 1. Resultados obtenidos en 148 muestras clínicas por la técnica de inmunoperoxidasa

Estación de Influenza	Casos positivos por tipo y subtipo				Casos negativos	Total de muestras
	Tipo A	Subtipo H_1N_1	Subtipo H_3N_2	Tipo B		
1992	24	18	6	0	0	24
1993	10	4	6	6	4	20
1994	9	5	4	17	2	28
1995	55	20	35	15	6	76
Total	98	47	51	38	12	148

TABLA 2. Resultados porcentuales de los casos positivos y de los negativos obtenidos en 148 muestras clínicas por la técnica de inmunoperoxidasa

Estación de influenza	Total de muestras	Total de positivos	Porcentajes de positivos ¹				Porcentajes de negativos ²
			Tipo A	Subtipo H_1N_1	Subtipo H_3N_2	Tipo B	
1992	24	24	100,0	75,0	25,0	0,0	0,0
1993	20	16	62,5	25,0	37,5	37,5	20,0
1994	28	26	34,6	19,2	15,4	65,4	7,1
1995	76	70	78,6	28,6	50,0	21,4	7,9
Total	148	136	72,1	34,6	37,5	27,9	8,1

¹ Porcentaje con respecto al total de casos positivos.

² Porcentaje con respecto al total de muestras.

En 1992, el total de las muestras estudiadas se tipificó dentro del grupo A (100 %), se destacó la circulación del subtipo H_1N_1 , con 18 muestras positivas (75 %).

Durante 1993, el comportamiento de las muestras analizadas fue el siguiente: para el tipo A, se caracterizaron dentro del subtipo A H_1N_1 , 4 muestras positivas (25 %); 6 para el A H_3N_2 (37,5 %) y otras 6 muestras resultaron positivas para el tipo B (37,5 %).

En 1994, durante la temporada de influenza, se destaca el aumento de positividad con respecto al tipo B, 17 muestras positivas (65,4 %), comportamiento que se mantuvo similar en 1995 (15, para 21,4 %), respecto al total de casos positivos.

Sin embargo, durante la temporada analizada de 1995, de un total de 76 muestras clínicas, 55 (78,6 %) fueron positivas para el tipo A, 20 del subtipo H_1N_1 y 35 del subtipo H_3N_2 , para 28,6 y 50 % respectivamente.

Del total de muestras positivas analizadas en los 4 años estudiados se obtuvieron los siguientes resultados: 98 del tipo A (72,1 %), con 47 (34,6 %) del

subtipo H_1N_1 y **51 (37,5 %)** del subtipo H_3N_2 , y **38** del tipo **B (27,9 %)**.

DISCUSIÓN

En el diagnóstico de los virus de influenza a partir de exudados nasofaríngeos se han empleado métodos clásicos como la IH, inoculación en embriones de pollo, cultivos celulares y, últimamente, la técnica del PCR con el uso de cebadores con secuencias conservadas durante años y la amplificación de fragmentos por cDNA, lo cual permite discriminar entre virus de diferentes tipos.^{5,6}

Para nuestro trabajo se utilizó una técnica inmunoquímica con el fin de tipar y subtipar los ortomixovirus. La base diagnóstica del método (inmunoperoxidasa) fue el empleo de **4** anticuerpos monoclonales (*pool A*, *pool B*, HA1-71 y HA2-76), que identificaron a los virus de influenza en tipos y subtipos A, B, H_1 y H_3 , lo cual indica que estos AcM son capaces de reconocer los epitopes bien conservados de la hemaglutinina de estos virus, eliminan en forma apreciable reacciones inespecíficas que puedan falsear los resultados, y nos permiten una rápida identificación del surgimiento de nuevas cepas y de los virus H_2N_2 si ellos reemergen en la población humana.^{9,12}

Estos ACsM específicos de tipo y subtipo, están siendo obtenidos por inmunización de ratones con virus concentrado de líquido alantoideo y muy utilizados en el diagnóstico rápido de estos virus.¹⁰

Los resultados concuerdan con los anteriormente obtenidos al aplicarse el método de la inmunoperoxidasa a cepas de referencia y a aislamientos caracterizados previamente por IH, y con los de Ziegler y otros,¹¹ que también validaron este método con cepas de referencias y muestras clínicas, bajo condiciones similares a las referidas en nuestro trabajo. Estos estudiaron **263** muestras clínicas, para evaluar su ensayo, de las que **31** contenían el virus de influenza A H_1N_1 y **113** el de influenza A del subtipo H_3 , **84** muestras contenían influenza tipo B y **25** resultaron negativas, para **9,5 %**. Estos autores atribuyen la negatividad obtenida, a que ellos testaron muestras almacenadas por más de **5** años, lo que se evitaría con el estudio de muestras frescas; si se inoculan **200 μ L** por pozuelo, se homogeneiza bien

la muestra y se prolonga el tiempo de incubación se podría incrementar la sensibilidad del ensayo.

Otros investigadores,¹³⁻¹⁵ usando iguales pools A y B contra estos virus en ensayos de cultivos rápidos, obtuvieron entre **56 y 100 %** de sensibilidad en sus estudios.

En nuestro caso la sensibilidad alcanzó el **91,9 %** (**8,9 %** de casos negativos), lo que se corresponde también con los índices normalmente obtenidos cuando se trabaja las muestras clínicas de forma directa. La dispersión existente en la negatividad en los años estudiados (**0,0 %** en **1992**; **20** en **1993**; **7,1** en **1994** y **7,9** en **1995**) no resulta significativa si se toma en cuenta el número de casos estudiados por año: **24, 20, 28 y 76** muestras en cada uno de los años referidos.

Con las muestras clínicas analizadas, se obtuvieron porcentajes de positividad de **100 (1992)**; **62,5 (1993)**; **34,6 (1994)** y **78,6 (1995)** para el tipo A, lo que coincide con los reportes de circulación al nivel mundial.

Durante **1992 y 1993** predominó mundialmente el subtipo A H_3N_2 , que causó brotes en centros cerrados de jóvenes y en niños menores de **15 años**, y a su vez provocó una gran ausencia escolar, sin que dejaran de reportarse casos esporádicos en países como Finlandia, China, República Checa, Rusia y España.¹⁶⁻¹⁹

En **1994**, se resume la actividad del virus de influenza en el mundo, asociada en gran parte con el subtipo H_3N_2 , que causa severas epidemias en la región norte de Europa.

En **1995**, en países informantes como Francia, Chile, Canadá, Hong Kong, Madagascar, Australia y otros, la principal actividad de gripe se debió también a este subtipo,²⁰⁻²² con la aparición de brotes y casos esporádicos por éste, se concluyó que la actividad principal de los virus influenza en el mundo y en nuestro país durante estos años se debió al subtipo A H_3N_2 .²³

El subtipo A H_1N_1 , cocirculó en nuestro país con el A H_3N_2 en todo el período analizado, se presentó en brotes y casos esporádicos, representó el **34,6 %** del total de la positividad encontrada (tabla 2); sin embargo, la circulación mundial de este subtipo no fue revelante, pero aunque raro, ha seguido en circulación.²⁴

Con respecto al tipo B, hubo un incremento importante en su circulación durante estos años, no reportado anteriormente en Cuba, se comenzó a ais-

lar en 1993, representó en 1994 en 65,4 % de la positividad de las muestras analizadas y causó brotes importantes, situación muy poco común en nuestro país (tabla 2).

Al nivel mundial también se reportó la amplia distribución de la actividad del virus influenza tipo B, la que ha ido en incremento a partir de 1993, como ocurrió aquí.

En Alemania, Hong Kong e Iran, más del 80 % de los aislamientos de brotes epidémicos pertenecían a este tipo, caracterizados como similares a la cepa B/Panamá/45/90, estas investigaciones fueron apoyadas por estudios serológicos, que indicaron como importante la actividad del virus gripal tipo B, que provoca infecciones respiratorias agudas (IRA), sobre todo en niños.²⁵

La coincidencia de los resultados, su especificidad y sensibilidad, valoran la efectividad del método como diagnóstico rápido capaz de detectar el virus de influenza, tipificarlo y subtipificarlo en menos de 48 h, lo que ofrece ventajas tangibles para orientar la acción epidemiológica y clínica.

Podemos concluir nuestro trabajo con la recomendación del uso de la técnica de la inmunoperoxidasa como un método de diagnóstico rápido, conveniente, fácil de realizar e interpretar, su gran especificidad y sensibilidad, todo esto nos permite procesar un gran número de muestras clínicas con resultados disponibles en un período de 48 h, con lo que se pueden adoptar medidas de control epidemiológico frente a brotes de IRA provocados por el virus de influenza.

SUMMARY

One hundred and forty eight samples from patients with a symptomatology compatible with the influenza virus were studied aimed at identifying in a fast way these viruses. A rapid MDCK-L cell culture was developed on 96 well plates, where nasopharyngeal exudates or gargarisms were inoculated and incubated all night long at 37 °C. The medium was removed and cells were washed with PBS and fixed with methanol. Viral antigens were detected through the immunoperoxidase staining by using two monoclonal antibody pools for the identification of influenza A and influenza B viruses. The HA1-71 monoclonal antibody, specific for influenza A (H₃N₂), and the HA2-76, which react with both A (H₃N₂) and A (H₁N₁) were used for subtyping. Of all the positive samples (136), 72 % corresponded to type A while 34.6 % and 37.5 % corresponded to subtypes H₁ and H₃, respectively. Influenza B was detected in 27.9 % of the 148 samples studied. Only 12 were negative (8.1 %). The use of this technique is recommended as a rapid, convenient and sensitive method that is easy to carry out and to interpret for the detection and characterization in

type and subtype of the influenza viruses starting from the nasopharyngeal exudates or gargarisms.

Subject headings: ORTHOMYXOVIRUSES TYPE A/isolation & purification; ORTHOMYXOVIRUSES TYPE B/isolation & purification; NASOPHARYNX/immunology; IMMUNOENZYME TECHNIQUES; EXUDATES AND TRANSUDATES; CELL CULTURE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palmer DF, Dowdle WR, Coleman MT, Schild GC. Advanced Laboratory techniques for influenza diagnosis. Atlanta: Center for Disease Control, 1975:25-62.
2. Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Isenberg HD, ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington DC.: American Society of Microbiology, 1992:8-11.
3. Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF. Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol 1979;9:175-9.
4. Johnston SL, Bloy H. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for detection of influenza A virus. J Clin Microbiol 1993;31:142-3.
5. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S. Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. Immunology 1991;35:259-65.
6. Shany W, Evans DH. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 1991;33:165-89.
7. Walls HH, Hamon MW, Slagle JJ, Stoddsdale C, Kendal AP. Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses. J Clin Microbiol 1986;23:240-5.
8. St. Groth F, Scheideggers D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J Immunol Methods 1980;35:1-21.
9. Mills RD, Cain KJ, Woods GL. Detection of influenza virus by centrifugal inoculation of MDCK cells and staining with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1989;27:2503-8.
10. World Health Organization. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: memorandum from a WHO meeting. Bull World Health Organ 1992;70:699-703.
11. Ziegler T, Hall H, Sánchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox N. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by culture assay. J Clin Microbiol 1995;33(2):318-21.
12. Sánchez-Fauquier A, Guillen M, Martin JM, Kendal AP, Melero JA. Conservation of epitopes recognized by monoclonal antibodies against the separated subunits of influenza hemagglutinin among type A viruses of the same and different subtypes. Arch Virol 1991;116:285-93.
13. Espy MJ, Smith TF, Harmon MW, Kendal AP. Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1986;24:677-9.
14. Warris M, Ziegler T, Kivivirta M, Ruuskanen O. Rapid detection of influenza A virus in cells cultures by immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1990;20:1159-62.
15. Woods GL, Johnson AM. Rapid 24 well plate centrifugation assay for detection of influenza A virus in clinical specimens. J Virol Methods 1989;24:35-42.
16. WHO. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1993;68(4):17-24.
17. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1993;68(8):49-56.
18. —. WHO. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1992;67(12):81-8.

19. WHO. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1992;67(14):97-104.
20. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1993;68(17):117-24.
21. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1995;5(48):264.
22. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1995;5(49):271-4.
23. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1994;69(41):301-8.

24. WHO. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1993;68(1-2):1-8.
25. —. Influenza Wkly Epidemiol Rec 1994;69(43):3 17-24.

Recibido: 13 de agosto de 1996. Aprobado: 11 de octubre de 1996.
Dra. Suset Oropesa Fernández, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.