

VII. VIRUS INFLUENZA.

Dra. Suset Oropesa Fernández

INTRODUCCIÓN.

Clasificación. Nomenclatura. Descripción de la enfermedad. Estructura. Morfología.

Los virus de la Influenza, pertenecen a la Familia Orthomyxoviridae, que se divide en cuatro Géneros Virus de Influenza A, Influenza B Influenza C y el género Thogota. (trasmitidos por garrapatas). La nomenclatura es descriptiva e incluye lo siguiente: Tipo (basado en la especificidad antigénica de la nucleoproteína y la proteína matriz), huésped de origen, (no se indica en los aislamientos humanos, si en los aislamientos de animales y objetos inanimados), origen geográfico, número de registro de la cepa y año del aislamiento. Para el tipo A, se señala al final y entre paréntesis, las características antigénicas de la hemaglutinina y la neuraminidasa. Para los virus tipo B y C, no se señala. Ejemplos: A / Habana/ 817/ 85 (H3N2), B/Beijing/184/93 y C/París/1/67.

El cuadro gripal clásico se presenta abrupta o súbitamente con síntomas sistémicos y comunes que incluyen fiebre alta, malestar general, escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, postración y síntomas respiratorios como: tos seca, estornudos, secreción nasal abundante, enrojecimiento de la conjuntiva, dolor de garganta y adenopatías cervicales. Pueden incluirse otros síntomas como la anorexia, síntomas gastrointestinales como las náuseas, vómitos, diarrea particularmente en niños pequeños. La recuperación es total en un periodo de 2 a 4 semanas. (1)

Pueden observarse también síntomas de faringitis, laringitis, traqueobronquitis, laringotraqueobronquitis (croup), o bronquitis, otitis, y sinusitis.

Las complicaciones más importantes de esta enfermedad son: la neumonía viral primaria, bacteriana secundaria y una combinación de ambas. Se reporta también el Síndrome de Reyé, encefalopatía aguda con una tasa de mortalidad alta (10-14%), (2, 3)

Los virus influenza poseen genoma de tipo ARN, de simple cadena y polaridad negativa. Son pleomórficos, miden de 80 a 120 nm de diámetro, simetría helicoidal, se cubren de una membrana lípida y en ella se insertan las glicoproteínas HA y NA, que determinan el alto grado de variabilidad del virus.

El virión de Influenza, está constituido por diez proteínas estructurales diferentes: la Hemaglutinina (HA), la Neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP) ,la

ribonucleoproteína, nucleocápsida o RNP (reunión de la NP con el ARN viral), las tres grandes proteínas PB2, PB1 y PA, que forman el complejo polimerasa, la proteína matriz (M1) y la proteína M2.

Existen además dos proteínas virales no estructurales (NS). De ellas la NS1 sólo se detecta en células infectadas, mientras NS2 se ha identificado recientemente asociada a la M1.

Se han identificado 15 subtipos de proteínas HA y 9 NA (humanas y animales).

La proteína HA, es el principal antígeno del virus, contra el cual va dirigida la respuesta inmune neutralizante (anticuerpos protectores). Además, su variabilidad antigénica que se traduce en la aparición de nuevas cepas, la convierte en el principal factor desencadenante de las epidemias y pandemias de gripe.

La Neuraminidasa, es importante como antígeno, aunque los anticuerpos anti-NA, no son neutralizantes, salvo a altas concentraciones. Sin embargo reducen tanto el título del virus, como las lesiones en pulmón. Su variabilidad antigénica es alta (4).

Una característica de los virus con genoma ARN es su alta variabilidad genética y antigénica, lo que acarrea que la infección se desarrolle generalmente en forma de brotes epidémicos y ocasionalmente pandemias, con altos índices de morbilidad y grandes costos económicos.

La más devastadora pandemia del siglo XX (1918-1920) fue la “gripe española” (virus AH1N1), se desarrolló el más grave conflicto epidémico del que se tenga constancia histórica, afectó al 50% de la población mundial y causó más de 20 millones de muertes.

En épocas recientes se han documentado otras importantes pandemias (1957-1958, la “gripe asiática”(virus AH2N2), y en 1968, la “gripe de Hong Kong” (virus AH3N2). En 1977-1978 el virus (AH1N1) comienza de nuevo a circular y a partir de esta fecha continúan circulando en el mundo, los virus A(H1N1), A(H3N2) y el tipo B. (6) (7).

En 1997- 98, se detectó en humanos, la gripe aviar A (H5N1),causando una alta mortalidad. Los virus del tipo A, pueden infectar además del ser humano, a caballos, cerdos, y una larga variedad de aves; mientras que el tipo B infecta humanos solamente.(5)

La infección por influenza es causa substancial de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y resulta extremadamente difícil encontrar una solución actual, que no sea limitada a su prevención con vacunas y a la medicación frente a los síntomas.

Para la profilaxis se emplean antivirales y vacunaciones anuales que se ajustan todos los años a las cepas circulantes. En casos especiales pueden aconsejarse antivirales para complementar la acción de la vacuna.

La OMS recomienda hoy vacunas trivalentes e inactivadas constituídas por los antígenos superficiales purificados, el principal método de prevención de la influenza siendo particularmente importante para aquellos que tienen el riesgo de sufrir complicaciones. (1).

REFERENCIAS

1. Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.
2. Couch R B, Kasel J A. Influenza. En: Lennette E H, Lennette D A, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. Ed. USA: American Public Health associations, 1995.
3. Ward MR. Reye's syndrome: an update. Nurse pract. 1997; 22:45-6, 49-50, 52-3.
4. Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. En: Fields BN, Knipe DM, Howley P. Fields Virology. Volumen 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
5. Shortridge KF. Pandemic Influenza: A zoonosis? Semin Respir Infect 1992;7(1): 11-25.
6. Wu X, Cox N, Bender C, Regnery H, Shaw M. Genetic variation in Neuraminidase genes of influenza A H3N2 viruses. Virology. 1996; 224: 175-83.

I.-AISLAMIENTO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

El aislamiento de un virus es una técnica de alta sensibilidad y muy útil para el diagnóstico de las infecciones virales cuando se obtienen muestras con la calidad requerida, dentro de los parámetros ya señalados. El cultivo celular presenta la ventaja de amplificar en gran escala el virus para poder utilizarlo en pruebas de caracterización antigénica, genética o pruebas de susceptibilidad a medicamentos.

Las células MDCK (Madin-Darby canine Kidney), son las más apropiadas para el aislamiento del virus de influenza. También pueden ser utilizados los cultivos primarios de riñón de monos rhesus (RMK) y la línea continua LLC-MK2. El uso de los sistemas celulares requiere la presencia de tripsina para activar las moléculas de HA y garantizar la penetración viral (1, 2).

El efecto citopático (ECP) que producen estos virus no es patognomónico y puede no aparecer hasta después de múltiples pases, siendo sugestivo de la presencia de los virus de

influenza. Debe ser demostrados por la hemadsorción en la monocapa celular con eritrocitos de curiel, o la hemaglutinación del medio de cultivo celular utilizando una solución de eritrocitos de curiel, pollo, o humanos del grupo “O”, o por IF (3, 4).

El virus de influenza también se aísla en huevos embrionados (9-10 días), inoculando la muestra en la cavidad amniótica del embrión. Aunque este resulta un sistema hospedero animal simple, económico y utilizado en muchos laboratorios, pero actualmente se prefiere el cultivo celular (5).

I.1.-AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES. (6) (7)

EQUIPOS.

Gabinete de seguridad Clase II.

Incubadora 37 °C.

Refrigerador (4 °C).

Congelador (- 70 °C).

Centrífuga refrigerada.

Microscopio óptico invertido.

Microscopio para Inmunofluorescencia.

Materiales y Reactivos:

Tripsina, TPCK (tipo XIII de páncreas bovino).

Dulbecco's Modificado Medio Eagle. (D-MEM).

Albúmina bovina fracción V, solución 7,5%.

Solución stock de estreptomicina- penicilina. (10,000U/mL penicilina G; 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomicina).

Solución stock de buffer Hepes 1M.

Frascos plásticos. (25 y 75 cm²)

Tubos de cultivo, plásticos con tapa de rosca o de cristal con tapones de goma.(12 x 75).

Gradillas de tubos de cultivo.

Tubos de centrífuga (de al menos 15 mL)

Monocapa confluyente de células MDCK-L (ATCC), en frascos o tubos.

Pipetas 10 mL, 1 mL

Placas de microtitulación (fondo en U).

Anticuerpos monoclonales anti influenza A H3N2, A H1N1 y tipo B o al menos frente a los tipos Influenza A y B.

Muestras clínicas.

I.1.1.-PROCEDIMIENTO.

Este procedimiento debe ser realizado en un Gabinete de Seguridad Clase II.

I.- Preparación de los tubos de cultivo de tejidos.

- 1.- Utilizar monocapas recientes, y confluentes en los tubos que se utilizaran para la inoculación. Chequear al microscopio con una magnificación de 40x.
- 2.- Eliminar el medio de cultivo de los tubos y lavar la monocapa 1 mL del medio D- MEM sin suero.

I.1.2.-Inoculación en los tubos de cultivo.

- 1 Inocular 200 μ L de la muestra por cada 2cm de monocapa celular, usando pipetas estériles. Generalmente 2-4 tubos por cada muestra clínica.
- 2- Añadir 200 μ L del medio completo a dos tubos, que serán los controles celulares.
- 3.- Centrifugar a 2000 r.p.m. por 45 minutos a temperatura ambiente. De no poderse realizar la adsorción por centrifugación, dejar a temperatura ambiente 1 hora.
- 4.- Eliminar el inóculo y añadir 1 mL de medio de mantenimiento D-MEM, sin suero y con tripsina.
- 5.- Incubar a 37 °C
- 6.- Observe al microscopio diariamente para verificar alguna manifestación de efecto citopatogénico (E.C.P.).

Preparación de Solución de Tripsina para incorporar al medio de cultivo

2.5 gr de tripsina (Tripsina Sigma T-8253)

1 gr glucosa

Solución stock rojo fenol al 1 %

100 mL PBS 10X

Diluir en agua destilada hasta algo menos de 1 L

Ajustar el pH hasta 7.4 con NaOH 0.1 N. Enrasar a 1 L

Esterilizar por filtración

Guardar a -20°C

Utilizar a concentración final 1/1000 – 2000 en el medio de mantenimiento Tagle MEM.

I.1.3.-Cosecha.

1.- En caso de observar algún cambio morfológico en cultivo coleccionar el líquido sobrenadante. Realizar la prueba de hemadsorción (Had) a uno de los tubos inoculados, el que se lavará dos veces con medio de cultivo o PBS estéril. Añadir 1mL de una solución de hemáties de curiel e incubar a temperatura ambiente (TA), lavar dos veces con PBS y observar al microscopio del virus. Ó realizar inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para confirmar crecimiento del virus.

2.- Un segundo tubo debe ser guardado a -70°C para un nuevo pase que permita obtener mayor cantidad de virus para identificar por Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

3.- Si no se observa ECP, se debe esperar al menos 5 –9 días para realizar la Had y la IFI.

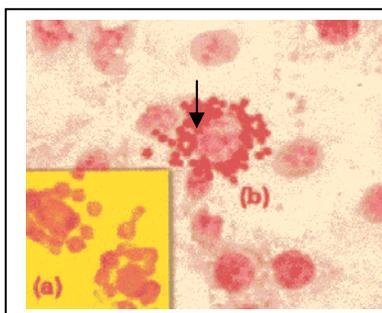
- Si estas pruebas son negativas, realizar dos pases ciegos, como se refiere desde el paso 1 hasta el 6. Antes de dar por negativa la muestra debe repetirse la Had y la IFI.

4.- Si se observa ECP, realizar IFI, Had.

- Si estas pruebas dan positivas, en alguno de los días señalados, tomar una alícuota del medio de cultivo y titular por HA.
- Si la HA es ≥ 8 , identificar por IHA.
- Si la HA es ≤ 4 , congelar y volver a pasar.

Si es necesario, centrifugar los tubos a 3000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar las células.

HEMADSORCION EN CULTIVO CELULAR.



Consideraciones especiales

Los virus de influenza aislados deben ser enviados a un Centro Nacional de Referencia de cada país, que a su vez seleccionará los aislados que deban ser analizados en el Centro Colaborador de Referencia e Investigación de la OMS, correspondiente a cada región del mundo.

No se deben procesar nunca al mismo tiempo, muestras clínicas y cepas de referencia o adaptadas al laboratorio a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

I.1.4.-Solución de eritrocitos al 0,2 %.

Se prepara la solución lavando 3 veces el paquete de eritrocitos de curiel con PBS pH 7.2, centrifugando a 1500 r.p.m., durante 5 minutos entre cada lavado.

-Tomar 200 μ L del paquete compactado de eritrocitos.

-Mezclar con PBS. (pH 7,2) c.s.p.....100 mL.

-Guardar a 4° C., hasta su uso.

I.2.-AISLAMIENTO EN HUEVOS EMBRIONADOS. (6)(7)

Equipos.

Incubadora 34° C.

Refrigerador (4° C).

Congelador (- 70° C).

Centrífuga.

Cámara para observación de los huevos embrionados.

Materiales y Reactivos:

Huevos de embrionados de 9-11 días, de cáscara blanca (raza White Leghorn).

Etanol al 70%.

Jeringuillas de 1mL.

Agujas, No. 22, por 1 ½ pulgadas.

Punzón.

Parafina.

Frascos o tubos con capacidad para 15 mL.

Pipetas de 10 mL.

Pinzas.

Rotulador.

Crioviales.

Placas de microtitulación de 96 pozuelo, fondo en U.

Antibióticos.

Suspensión de eritrocitos de pollo y curiel.

Reactivos necesarios para la prueba de HA (Soluciones salinas y antisueros).

Reactivos necesarios para la prueba de IHA (Soluciones salinas y antisueros).

I.2.1.-Preparación de reactivos.

1.- etanol al 70%.

Alcohol etílico.....70 mL.

Agua destilada (c.s.p.).....100 mL.

Mezclar las 70 partes de alcohol con 30 partes de agua destilada.

Guardar a temperatura ambiente, el frasco debe estar bien tapado.

2.- Suspensión de eritrocitos (gallo al 0.5 % y curiel 0.2 %)

La extracción de sangre se describe en el apartado II. 1.2. Soluciones de la sección II.1.

CARACTERIZACION ANTIGENICA DE VIRUS INFLUENZA.

A partir de la sangre extraída con anticoagulante, se prepara la suspensión lavando 3 veces el paquete de eritrocitos con PBS pH 7.2, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos entre cada lavado

Tomar 500 μ L (sangre de gallo) o 200 μ L (sangre de curiel).

Mezclar con PBS. (pH 7,2) c.s.p.....100 mL

Guardar a 4°C., hasta su uso.

I.2.2.-Procedimiento.

Este procedimiento debe ser realizado en un gabinete de seguridad Clase II. Los huevos fértiles, deben estar certificados como libres de patógenos, incubados en cámara húmeda a 37.5° C.

1.- Revisión de los embriones. (Ver Figura No.1).

- 2.- Marcar la cámara de aire y el ojo del embrión (será la zona más oscura).
- 3- Descarte los huevos no fértiles, sin el tamaño requerido, muertos o cuando aparezcan poros en la cáscara.
- 4.-Colocar los huevos con la cámara de aire hacia arriba y marcarlos con el número de muestra correspondiente para su identificación.(4 embriones por muestra).
- 5.- Limpiar la zona de la cámara de aire con algodón o hisopo de gaza y alcohol al 70%.
- 6.-Puncionar la cámara de aire abriendo un pequeño orificio por donde posteriormente se inoculará.
- 7.- Aspirar 1 mL de la muestra clínica, con una jeringuilla de tuberculina, No.22 y aguja de 1 1/2 pulgada.
- 8.- Colocar el embrión en la mano en un ángulo de 45°e insertar la aguja en dirección del ojo del embrión para inocular la muestra en cavidad amniótica.
- 9.- Descargar 100 µL del inóculo dentro de la cavidad amniótica, retirar la aguja descargar los otros 100 µL en cavidad alantoidea. Retirar la aguja.
- 10.- Inocular de igual forma el resto de los embriones.
- 11.- Descartar la jeringuilla en un recipiente de seguridad.
- 12.- Sellar los orificios en la cámara de aire con parafina o algo similar.
- 13.-Incubar los huevos embrionados a una temperatura entre 33 / 35 °C por 48/ 72 horas, en atmósfera húmeda. (De los embriones inoculados, incubar unos por 48 horas para la multiplicación de los virus AH3N2 y dejar el resto por 72 horas, para la multiplicación de los virus AH1N1 y tipo B).

I.2.3.- Cosecha.

- 1.- Colocar los huevos embrionados a 4° C durante toda la noche, antes de la cosecha.
- 2.- Rotular los tubos para cada huevo embrionado con el número correspondiente.
- 3.- Limpiar la zona de la cámara de aire con algodón o hisopo de gaza y alcohol al 70%.

- 4.- Abrir la cámara de aire con tijeras estériles. Romper la membrana alantoidea, con una pinza estéril y coleccionar con una pipeta de 10 mL el líquido alantoideo, colocándolo en uno de los tubos o frascos rotulados. El líquido amniótico debe ser coleccionado con una jeringuilla y aguja, y debe colocarse en otro frasco o tubo (la cantidad de líquido amniótico obtenido es poca, puede unirse a la cantidad aspirada de todos los embriones de la misma muestra analizada). Debe realizarse prueba de esterilidad a los líquidos coleccionados.
- 5.- Los líquidos amnióticos y alantoideos coleccionados deben guardarse a 4 °C hasta realizar la prueba de hemaglutinación.
- 6.- Si la hemaglutinación es negativa pasar la muestra dos veces más antes de reportarla como negativa.
Si es positiva, el título de la HA es ≥ 8 , identificar por IHA.
Si la HA es ≤ 4 , congelar y volver a pasar.
- 7.- Si es necesario, debe centrifugarse a 3000 r.p.m. para eliminar el exceso de sangre y membranas del embrión.
- 8.- La identificación de los aislamientos se realiza mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación y el aislamiento debe ser guardado a -70° C.

Precauciones

No guardar nunca los aislamientos a -20° C. Los virus de influenza son muy inestables a esta temperatura.

Nunca procesar muestras clínicas y cepas adaptadas al laboratorio al mismo tiempo.

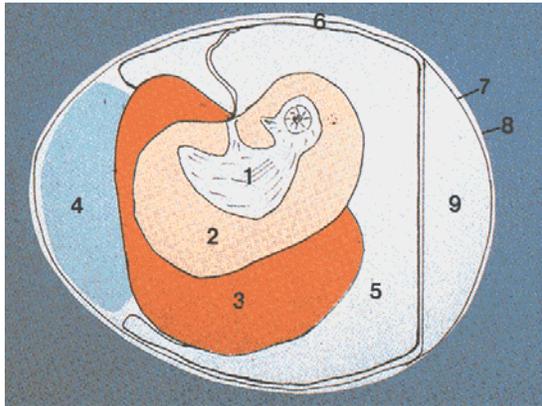
Esto evitará contaminaciones.

Nunca procesar muestras de humanos y animales en el mismo laboratorio.

Deben ser procesados por diferente personal y en diferentes laboratorios.

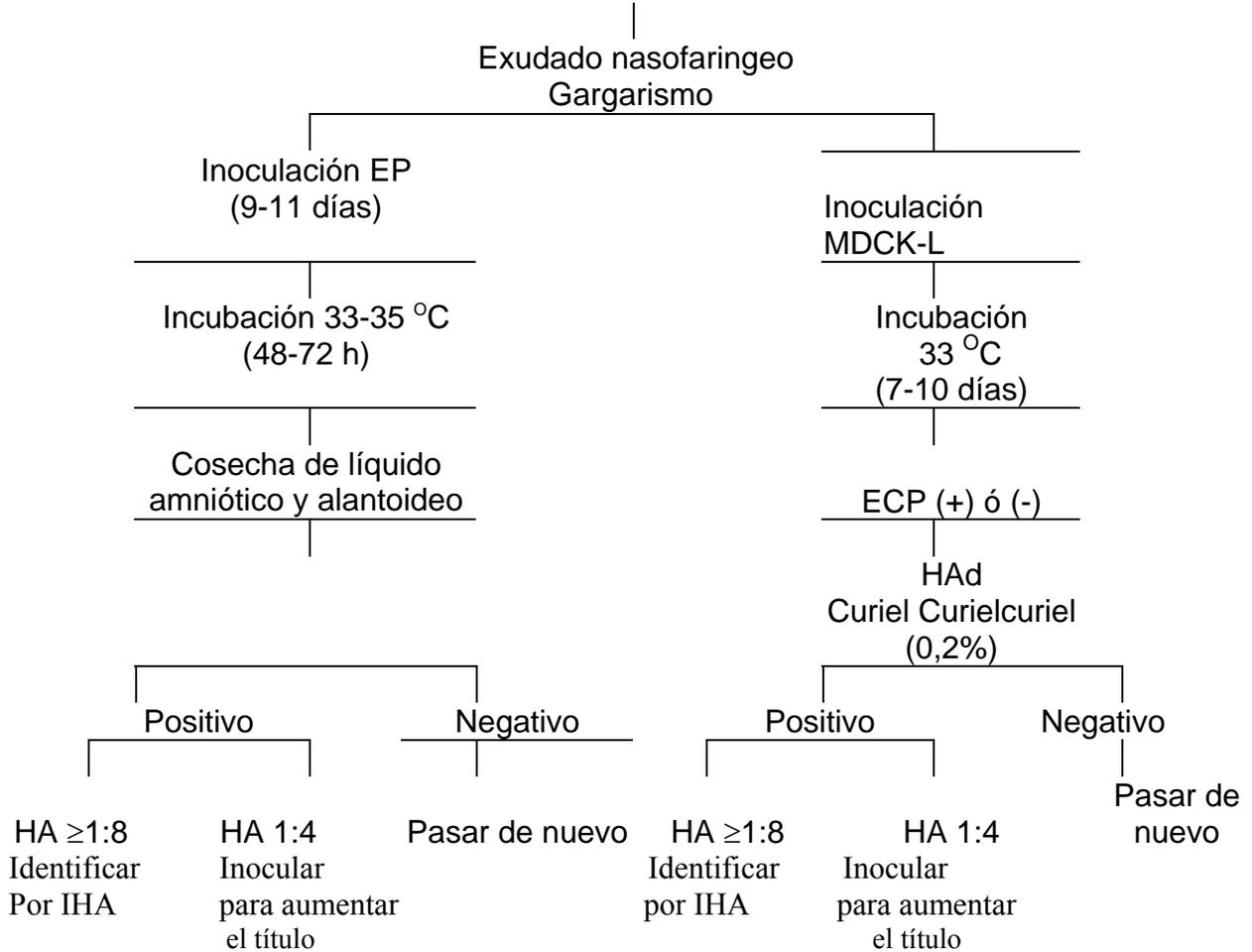
Los virus de Influenza aislados deben ser enviados a un Centro Nacional que a su vez los enviará a los Centros de Referencia Internacional.

FIGURA No. 1 ESQUEMA DE HUEVO EMBRIONADO (9 DÍAS).



1. Embrión.
2. Cavidad amniótica.
3. Saco vitelino (yema).
4. Albúmina (Clara – parte blanca).
5. Cavidad Alantoidea.
6. Membrana corioalantoidea.
7. Membrana externa del huevo.
8. Cáscara.
9. Saco de aire.

ESQUEMA PARA EL AISLAMIENTO DE VIRUS DE INFLUENZA



Fuente: Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part.2: Procedural guide US Department of Health Educat. and Public Health Service. 1975:25-26

Referencias:

- 1- Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. En: Fields BN, Knipe DM, Howley P. Fields Virology. Volumen 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
- 2.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de microbiología médica. 14ª. Ed. México: El manual moderno, 1996: 555-567.
- 3- Couch R B, Kasel J A. Influenza. En: Lennette E H, Lennette D A, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. Ed. USA: American Public Health associations, 1995.
- 4- Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.

II.-HEMAGLUTINACIÓN E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.

Los virus influenza tienen su superficie cubierta de espículas formadas por la proteína hemaglutinina (HA, que tienen la propiedad de aglutinar diferentes eritrocitos o glóbulos rojos (pollo, ganso, curiel, humanos del grupo “O”, carnero, etc.), derivando su nombre de esta característica. (1)

La unión específica del anticuerpo al sitio antigénico en la molécula de la hemaglutinina interfiere con el enlace de la HA viral con los receptores en los eritrocitos, denominándose a este efecto inhibición de la hemaglutinación (IHA) (2)

La prueba de inhibición de la hemaglutinación fue descrita por Hirst en 1942 y luego modificada por Salk en 1944. Se realiza en placas de microtitulación, mezclándose una cantidad estandarizada de antígeno con antiseros diluidos en forma seriada doble. Posteriormente se añaden eritrocitos para determinar una unión específica del anticuerpo a la molécula HA (3) (4) (5)

Es una técnica extremadamente confiable, pero es requisito indispensable que los antiseros de referencia se preparen basándose en las cepas vacunales, que son las cepas que circulan anualmente de forma mayoritaria en todo el mundo, a fin de poder obtener resultados comparativos.

En sentido general puede ser utilizada en la detección de anticuerpos contra la HA de diferentes cepas de virus de influenza, en la caracterización de nuevos aislamientos y para demostrar la efectividad de la vacuna antigripal (6, 7, 8).

II.1.-CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

El primer paso para la caracterización de los virus influenza es la diferenciación en los tipos A y B y posteriormente es preciso determinar los subtipos dentro del tipo A.

Este análisis se hace tradicionalmente por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH), utilizando antisueros específicos. Después del aislamiento, generalmente son necesarios uno o más pases del virus en huevos embrionados o en cultivos celulares, para obtener títulos hemaglutinantes suficientemente altos, que permitan realizar la IH (3, 4,5)

Ventajas:

Tiene una alta sensibilidad y especificidad

Simple, bajo costo, rápida.

Elevada reproducibilidad.

Desventajas:

Tratamiento para eliminar los inhibidores inespecíficos, que se encuentran normalmente en los sueros

Comprobar las 4 unidades hemaglutinantes del antígeno cada vez que se efectúa la prueba.

Experiencia del personal para leer la prueba e interpretarla.

Equipos.

Baño de agua 37 °C.

Baño agua 56 °C.

Centrífuga.

Materiales y Reactivos.

Placas de microtitulación de 96 pozuelos.

Costar #3897: V- Para usar con eritrocitos de pollo o de ganso.

Costar # 3797 U - Para usar con eritrocitos humanos tipo O, o de curiel.

Micropipetas y pipeta multicanal y puntas.

Tubos de centrífugas graduados (50 mL y 15 mL).

Tubos de 50 mL para preparar las diluciones de antígenos.

Gradillas.

Antisueros específicos

Estuche de reactivos de la OMS (suministrado a los Centros Nacionales de Influenza)

Sangre en solución de Alsever (pollo, curiel, ganso, humanos del grupo O).

Agua destilada y desionizada estéril.

Solución salina fosfatada (0,01M), pH 7,2 (PBS).

Solución salina normal, (NaCl al 0,85 %).

II.1.1.- Estuche de reactivos de la OMS.

El estuche de reactivos de referencia de influenza es preparado con las cepas vacunales seleccionadas para cada temporada y distribuido anualmente a los Centros Nacionales de Influenza Colaboradores de la OMS.

El estuche contiene reactivos para la identificación de los virus tipo A, subtipos A(H1N1) y A(H3N2) e influenza tipo B, así como reactivos para el diagnóstico serológico.

Los antisueros de referencia utilizados en la identificación de los aislamientos son preparados en carneros, mediante un esquema de inyecciones múltiples con HA purificadas de las cepas vacunales, o en pollos por inoculación intravenosa con virus multiplicados en huevos embrionados. Los controles de antígenos consisten en líquido alantoideo inactivado con beta-propiolactona.

Reactivos que contiene el estuche:

a) Reactivos para la identificación de aislamientos tipo A y diagnóstico serológico.

Control de antígeno Influenza A (H3N2).

Antisuero de referencia Influenza A (H3N2).

Control de antígeno Influenza A (H1N1).

Antisuero de referencia Influenza A (H1N1).

b) Reactivos para la identificación de aislamientos tipo B.

Dos juegos de reactivos son distribuidos para distinguir los aislamientos del tipo B: (linaje B/Panamá/45/90 y linaje B/Victoria/2/87).

Control de antígeno Influenza B/Beijing/184/93- semejante a (linaje B/Panamá/45/90).

Antisuero de referencia frente a Influenza B/Beijing/184-/93- semejante a B/Panamá/45/90).

Control de antígeno Influenza B/Guangdong/8/93-semejante a (B/Victoria/2/87).

Antisuero de referencia frente a Influenza B/Guangdong/8/93- semejante a (B/Victoria/2/87).

c) Reactivos para el diagnóstico serológico de influenza tipo B (SOLAMENTE)

Control de antígeno Influenza B/Beijing/184/93 (tratado con éter).

Control de antígeno Influenza B/Guangdong/8/93 (tratado con éter).

d) Otros reactivos.

Control de suero negativo.

Enzima destructora de receptores. (EDR).

II.1.2 SOLUCIONES

1.- Solución Salina Fosfatada (0,01M), pH 7,2 (PBS).

- Preparar una solución patrón 25 veces concentrada (25X).
Solución tampón de fosfato conteniendo en 100 mL:
 - Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).....2,74 g
 - Fosfato monobásico monohidratado de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....0,79 g
- Preparar PBS para 1 litro, mezclando y disolviendo en agua destilada y desionizada.
 - PBS 25X (Solución tampón de fosfato).....40 mL.
 - Mezclar bien.
 - Chequear el pH= 7,2 +/- 0,1)
 - Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.
 - Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 μm .)
 - Guardar a 4 °C, por un período no mayor de 21 días.

2.- Solución de Asever para la extracción de sangre.

- dextrosa.....20,5 g
- citrato de sodio deshidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)..... 8g
- cloruro de sodio (NaCl)..... 4,2 g
- Acido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).....0,55 g
- Disolver en agua destilada (c.s.p.).....1000 mL
- Mezclar bien.
- Chequear el pH = 6,1 (+/- 0,1.)
- Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.
- Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 μm .)

3.- Solución Salina Fisiológica (Na Cl al 0,85%)

NaCl 0,85 gramos

Disolver en agua destilada (c.s.p.).100 mL.

4.- Enzima Destructora de Receptores.

Reconstituir en solución salina normal (0,85%).

Almacenar hasta su uso a -20°C , o en -70°C .

Eliminar a los 6 meses de reconstituida.

5. Extracción de sangre y preparación de soluciones al 0.5% de eritrocitos de pollo o ganso, o al 0,75% si se utiliza curiel o humanos del tipo "O".

- Limpiar con alcohol al 70%, la zona donde se extraerá la sangre.
- Colectar la sangre por punción venosa (pollo, ganso, humano) o intracardiaca si se utiliza de curiel.
- La sangre se coloca en un tubo de centrifuga con 1 mL de Alsever (para evitar la coagulación) por cada 5 mL de sangre que se extraiga. Agitar suavemente el tubo para homogeneizar.
- Centrifugar a 1500 r.p.m., durante 5 minutos, eliminar el suero.
- Añadir PBS al paquete de eritrocitos para lavarlos y agitar suavemente para homogeneizar
- Centrifugar 1500 r.p.m., durante 5 minutos entre cada lavado..
- Repetir esta operación 3 veces.
- Prepare la solución al % indicado según el tipo de eritrocitos que vaya a utilizar.

Tomar 500 μL (eritrocitos de pollo o ganso) o 750 μL (curiel, etc)

Mezclar con PBS) pH 7.2) c.s.p.-----100mL

Guardar a 4°C , hasta su uso

II.2.P ROCEDIMIENTO (3) (4) (5).

II.2.1.-Tratamiento de antisueros de referencia para la inactivación de inhibidores no específicos.

1.-Antisueros de referencia y el control negativo. A (H3N2), A (H1N1), B/Beijing/184/93 y B/ Guangdong/8/93 y suero de control negativo.

2.- Reconstituir los antisueros de referencia liofilizados con agua destilada estéril, con el volumen indicado en la etiqueta. Alicuotar 100 μL reconstituidos y almacenarlos hasta su uso a -20°C o -70°C .

3.- Reconstituir la enzima destructora de receptores con 25 mL de solución salina normal (0,85% NaCl). Almacenarla hasta su uso a -20°C o -70°C .

Tratamiento con EDR de los antisueros.

1.- Añadir 3 volúmenes de EDR a un volumen de suero (100 μL de suero + 300 μL de EDR). Mezclar bien.

2.- Incubar en baño de agua o Incubadora de 37°C , durante toda la noche (aproximadamente 16 a 18 horas).

3.- Incubar en baño de agua a 56°C durante 30 minutos para inactivar el resto de la EDR.

4.- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

5.- Añadir 6 volúmenes (600 μL) de solución salina normal (0,85% NaCl).

6.- Los sueros tratados se encuentran en una dilución final de 1:10.

7.- De no ser probados inmediatamente, congelarlos hasta su uso a -20°C .

Determinación de la presencia de aglutininas no-específicas en los sueros tratados.

1.- Seleccionar y rotular la placa de microtitulación en el orden que controlará los sueros tratados.

2.- Añadir 25 (μL) de PBS a los pozos necesarios para controlar todos los sueros tratados.

3.- Añadir 50 μL de PBS (pH 7.2) a dos pozos seleccionados para usarlos como control de eritrocitos.

4.- Añadir 25 μL de cada uno de los antisueros tratados a un pozo de los que añadió el PBS.

5.- Añadir 50 μL de los eritrocitos lavados y estandarizados a todos los pozos utilizados.

8.- Agitar las placas manualmente o usando agitador mecánico.

9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25°C), por un tiempo aproximado entre 30 minutos y 60 minutos.

Fíjese en el botón del control de eritrocitos.

Lectura y anotación de los resultados.

Interpretación.

A.- Si los eritrocitos sedimentan totalmente y forman un botón en el fondo de la placa, el tratamiento fue efectivo y el antisuero está listo para usarse en la prueba de IHA.

B.- Si los eritrocitos no sedimentan totalmente, la presencia de aglutininas no-específicas se hará evidente. Debe adsorberse el antisuero con eritrocitos. (Ver Sección III).

Adsorción de los sueros para eliminar las aglutininas inespecíficas.

Al suero que después de ser tratado según las instrucciones de la sección II, contenga aglutininas inespecíficas debe ser adsorbido de la siguiente forma:

- 1.-Añadir un volumen de eritrocitos (100 μ L), lavados 3 veces con PBS a 1500 r.p.m. y compactados.
- 2.- Agitar suavemente o mezcle de forma manual e incube a 4 °C por 2 horas, mezclando a repetición por intervalos de tiempo (aproximadamente 15 minutos) que permitan mantener los eritrocitos en suspensión.
- 3.- Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.-Transferir a otro vial el suero adsorbido cuidadosamente para no remover los eritrocitos.
- 5.- Sueros controles: Antisueros de referencia y el control negativo. A (H3N2), A (H1N1), B/Beijing/184/93 y B/ Guangdong/8/93 y suero de control negativo.
Se adsorben siguiendo la misma metodología.
- 6.-Repetir la adsorción con los eritrocitos, hasta que los controles sean negativos (sedimentación total de los eritrocitos).

II.2.2 -TITULACION DE LOS ANTIGENOS DE CONTROL Y LOS AISLAMIENTOS POR HEMAGLUTINACIÓN (HA).

- 1.- Preparar la solución al 0,5 % de eritrocitos en solución de PBS (pH 7,2).Ver preparación de materiales y reactivos.
- 2.- Rotular las placas de microtitulación (Ver Figura 1)
- 3.- Añada 50 μ L de PBS (pH 7,2) a los pozos desde el #2 al #12 (A2-H12).
- 4.- Añada 100 μ L de cada antígeno control o aislamiento al primer pozo (A1-G1), excepto el pozo de la fila H.
- 5.- Control de eritrocitos en la fila H1, se añade 100 μ L de PBS.
- 6.- Transferir sucesivamente 50 μ L del primer pozo de las filas de letras a los pozos de las otras filas, para hacer diluciones de serie doble. Se descartan los últimos 50 μ L.
- 7.- Añadir 50 μ L de la solución al 0,5 % de eritrocitos en solución de PBS (pH 7,2), a cada pozo de la placa.
- 8.- Agitar suavemente o mezcle de forma manual.

9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado entre 30 min. y 60 min. Fijese en el botón del control de eritrocitos que este sedimentado totalmente.

10.- Anotar los resultados obtenidos.

Interpretación.

Hemaglutinación: Ocurre cuando los eritrocitos permanecen en suspensión, en el mismo momento de lectura en que el control de eritrocitos esta sedimentado totalmente.

Lectura y anotación de la hemaglutinación.

- Hemaglutinación completa: + (los eritrocitos permanecen en suspensión)
- Hemaglutinación incompleta: + / - (solo una porción de los eritrocitos aglutinan o quedan parcialmente sedimentados).
- Ausencia de hemaglutinación: O. (Los eritrocitos forman un botón compacto en el fondo del pozo).

Como se determina la Hemaglutinación:

- Se inclina la placa de microtitulación y hay ausencia de la formación de lágrima en los eritrocitos sedimentados, imagen que se observa en el control de eritrocitos. Los eritrocitos de curiel y del grupo humano tipo O, forman un halo o círculo sedimentado en el fondo de la placa. (Ver Figura 2.)

Título de la Hemaglutinación:

- El título se corresponde con la dilución más alta del antígeno de control o de los aislamientos que muestre hemaglutinación completa, en la cual los eritrocitos forman una capa eventualmente distribuida.

FIGURA No1.

ESQUEMA PARA LA TITULACIÓN DE LOS CONTROLES DE ANTIGENOS Y DE LOS AISLAMIENTOS.

		Títulos										<u>Títulos HA</u>																			
		HA																													
		H	G	F	E	D	C	B	A	↓		Antígeno 100µl ⇒		H	G	F	E	D	C	B	A	↓		Antígeno 100µl ⇒							
Antígeno 100µl ⇒		0	0	0	0	0	0	0	0	1	50 µl	Antígeno 100µl ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0	1	50µl	Antígeno 100µl ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS 50µl ⇒		0	0	0	0	0	0	0	0	2	↓ D	PBS 50µl ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0	2	↓ D	PBS 50µl ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	3	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	3	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	4	↓ L	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	4	↓ L	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	5	↓ U	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	5	↓ U	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	6	↓ C	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	6	↓ C	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	7	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	7	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	8	↓ O	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	8	↓ O	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	9	↓ N	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	9	↓ N	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	10	↓ E	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	10	↓ E	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	11	↓ S	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	11	↓ S	↓	0	0	0	0	0	0	0	
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	12	↓	↓	0	0	0	0	0	0	0	0	12	↓	↓	0	0	0	0	0	0	0	
										2048										2048											

I.- Dilución de antígenos y aislamientos

Placa No. 1 Controles de antígenos

- A Influenza A (H1)
- B Influenza A (H3)
- C Influenza B (B/Beijing/184/93)
- D Influenza B (B/Beijing/243/97)
- E Influenza B Tratado con Eter (B/Beijing/184/93)
- F Influenza B Tratado con Eter (B/Beijing/243/97)
- G PBS
- H Control de glóbulos rojos

Placa No. 2 Aislamientos

- A Aislamiento No. 1
- B Aislamiento No. 2
- C Aislamiento No. 3
- D Aislamiento No. 4
- E Aislamiento No. 5
- F Aislamiento No. 6
- G PBS
- H Control de glóbulos rojos

II. - Añadir 50 µL de la solución de glóbulos rojos.

III. - Incubar a TA y anotar los resultados

FIGURA No.2

ESQUEMA DE PATRONES DE AGLUTINACION



II.2.3.- PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE IHA.

La IHA en influenza se trabaja con 4 unidades hemaglutinantes, aunque algunos laboratorios prefieren 8 unidades. La última dilución donde hay hemaglutinación completa, es el título del antígeno y representa 1 unidad hemaglutinante. Las 4 unidades se obtienen dividiendo el título del antígeno entre 4.

Por ejemplo: un título de 160 dividido por 4 = 40. Proceder mezclando un volumen de antígeno con 39 volúmenes de PBS para obtener el volumen que se necesita de antígeno estandarizado.

Es necesario controlar las 4 unidades preparadas, de la siguiente forma:

- 1.- Determinar el volumen de antígeno estandarizado que necesite para la prueba.
- 2.- Calcular la dilución del antígeno que necesite para preparar una dilución que contenga 4 unidades de HA por cada 25 µL.

Las unidades finales que se añaden a la prueba de IHA serán 4 unidades HA por cada 25 µL.

- 3.- Anote las diluciones utilizadas.
- 4.- Realizar la titulación del antígeno, repitiendo una segunda prueba de HA con el antígeno para verificar las unidades de HA.(Descrito en el paso 4 y figura 1)
- 6.- Anote los resultados.
- 7.- Guarde el antígeno diluido a 4 °C y úselo en el día.

Interpretación.

Dosis correcta: Los antígenos requieren un título de 4 unidades por cada 25 μ L. Este título debe hemaglutinar los 3 primeros pozos (4 unidades HA).

Dosis débil: Cuando la HA se observa en el primer o hasta el segundo pozo, entonces hay que agregar más antígeno. (1 o 2 unidades HA).

Dosis fuerte: Cuando la HA se observa hasta el cuarto pozo o más, debe agregarse más PBS.

Siempre que haya que agregar más antígeno o PBS, deben controlarse de nuevo las 4 unidades, hasta que se observe la dosis correcta con 4 unidades no podrán ser empleadas.

Controle también la solución de eritrocitos.

II.2.4.-IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS.

A.- Rotular las placas de microtitulación. Determine el número de placas que necesita para que sean rotuladas de manera idéntica.

B.- Puede colocar dos antígenos por placa para procesar un conjunto de sueros.

C.- Preparar una placa adicional para el control de los sueros tratado (1/10). En lugar de antígeno se añade PBS, y determinar si hay aglutininas inespecíficas presentes.

D.- El conjunto completo de sueros de referencia tratados debe incluir:

- Influenza A (H3N2).
- Influenza A (H1N1).
- B/Beijing/184/93 (B/Panamá/45/90).
- B/Guangdong/8/93 (B/Victoria/2/87).
- Suero Control Negativo.

En las placas de microtitulación rotuladas: (Ver Figura 3 y 4).

1.- Añada 25 μ L de PBS a los pozos desde B1 hasta H12, de cada columna numerada.

2.- Añada 50 μ L de cada suero tratado al primer pozo de la columna seleccionada.

Por ejemplo: El suero #1 se añade a los pozos A1 y A8, el suero #2 se añade a los pozos A2 y A9, y así sucesivamente con el conjunto de sueros tratados.

3.- Añada 50 μ L de PBS al primer pozo de las columnas A6 y A7, como control de eritrocitos.

- 4.- Transfiera y diluya 25 μ L del primer pozo de las columnas 1 hasta la 12 sucesivamente. Descarte los 25 μ L después de la fila H.
- 5.- Añada 25 μ L del antígeno control #1, a todos los pozos de un conjunto de sueros tratados y diluidos desde A1 hasta A5. Continúe con todos los demás antígenos de control y los aislamientos.
- 6.- Añada 25 μ L de PBS a la placa de control de suero, sustituyendo el antígeno.
- 7.- Agite suavemente o mezcle de forma manual.
- 8.- Cubrir las placas evitando la evaporación.
- 9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado de 30 min.
- 10.- Añada 50 μ L de la solución de eritrocitos al 0,5%.
- 11.- Agite suavemente o mezcle de forma manual.
- 12.- Cubrir las placas y colocar a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado entre 30 y 45 minutos. Fíjese en el botón del control de eritrocitos que este sedimentado totalmente.
- 13.- Anote los resultados obtenidos.

Interpretación. (Ver Tabla No.1)

- 1.- Si ocurre una reacción antígeno –anticuerpo (se INHIBE la hemaglutinación de los eritrocitos).
- 2.- El título de IHA es el recíproco de la última dilución de antisuero que inhiba completamente la hemaglutinación.

FIGURA No. 3.

ESQUEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS UTILIZANDO LA REACCION DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION.

		25 μ l					25 μ l								
		ANTIGENO 1					ANTIGENO 2								
		CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	Títulos IHA		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Antisuero 50 μ l \Rightarrow	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	25 μ l
PBS 25 μ l \Rightarrow	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	\downarrow D
\downarrow \downarrow	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	\downarrow I
\downarrow \downarrow	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	\downarrow L
\downarrow \downarrow	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	160	\downarrow U
\downarrow \downarrow	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	\downarrow C.
\downarrow \downarrow	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	640	\downarrow
\downarrow \downarrow	H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1280	\downarrow

I.- Preparación de las diluciones de los antisueros de referencia.

1	Influenza A (H1)	7	Control de glóbulos (50 μ L PBS)
2	Influenza A (H3)	8	Influenza A (H1)
3	Influenza B (B/Beijing/184/93)	9	Influenza A (H3)
4	Influenza B (B/Beijing/243/97)	10	Influenza B (B/Beijing/184/93)
5	Control de suero negativo.	11	Influenza B (B/Beijing/243/97)
6	Control de glóbulos rojo (50 μ L PBS)	12	Control de suero negativo.

II. - Adicionar 25 μ L del control de antígeno

IV.- Añadir 50 μ L de la solución de glóbulos rojos.

III. - Incubar a TA.

V.- Incubar, anotar los resultados e interpretar.

FIGURA No. 4.

IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS. ILUSTRACIÓN DE LA REACCION DE IHA.

	AISLAMIENTO 1					C	C	AISLAMIENTO 2					Título de IH ↓
	1	2	3	4	5	G	G	8	9	10	11	12	
A	O	●	O	O	O	●	●	●	●	O	O	O	10
B	O	●	O	O	O	●	●	●	●	O	O	O	20
C	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	40
D	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	80
E	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	160
F	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	320
G	O	●	O	O	O	●	●	O	O	O	O	O	640
H	O	O	O	O	O	●	●	O	O	O	O	O	1280
Antisuero	H1	H3	B/184	B/243	Neg	PBS	PBS	H1	H3	B/184	B/243	Neg	

TABLA No.1**INTERPRETACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE UN AISLAMIENTO.**

(En la identificación de un aislamiento deben ser utilizados los reactivos que se correspondan con la temporada de influenza.(OMS).

ANTIGENOS DE CONTROL	ANTISUEROS DE REFERENCIA.				
	A 3N2	A H1N1	B/BEIJING	B/GUANGDONG	NEGATIVO
1. A(H3N2)	<u>2560</u>	< 10	10	< 10	< 10
2. A(H1N1)	< 10	<u>1280</u>	10	< 10	< 10
3.B/Beijing/184/93-Like	< 10	< 10	<u>320</u>	40	< 10
4.B/Guandong/08/93-like	< 10	< 10	< 10	<u>320</u>	< 10
Aislamientos para identificar					
					INTERPRETACION
AISLAMIENTO # 1	<u>1280</u>	< 10	80	20	H3
AISLAMIENTO # 2	< 10	<u>1280</u>	< 10	< 10	H1
AISLAMIENTO # 3	< 10	< 10	<u>160</u>	80	B/ BJ
AISLAMIENTO # 4	< 10	< 10	< 10	<u>640</u>	B/Gu

REFERENCIAS:

- 1.- Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. In Fields BN, Knipe DM Howley P . Fields Virology. Vol 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
- 2.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de Microbiología Médica. 14ed. México:El Manual Moderno, 1992.
- 3.- Palmer D,Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part. 2: procedural guide US Department of Health Educat. And Public Health Service. 1975: 25-62.
- 4.- WHO/ PAHO/ CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May14-18, 2001.Atlanta, GA EEUU.
- 5.- Goyenechea a, Oropesa S, López E, Bello M, Comellas MM, Savón C. Curso Nacional de Diagnóstico Viroológico de las enfermedades respiratorias agudas. La Habana: MINSAP, 1983.
- 6.- Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Iceberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM, 1992: 8-11.
- 7.- Wood J, Gaines Das, Taylor J, Chacraverty P. Comparison of influenza serological techniques by inteARNtional collaborative study. Vaccine 1994;12(2): 165-178.
- 8.- Weissenbasher C, Avila W. Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: características generales y diagnóstico En: Benguigui Y, Antuñano F, Schmunis G, Yunes J, editores. Infecciones respiratorias en niños. EEUU: OPS-OMS,1997.

III.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA POR INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION.

El diagnóstico de la gripe mediante el aislamiento viral es definitivo, permite identificar la cepa involucrada y es generalmente más rápido que la serología. Sin embargo, el diagnóstico serológico es un procedimiento importante cuando se hace imposible obtener la muestra clínica del individuo o se carece de los recursos en el laboratorio. Muchos laboratorios dependen de la serología para identificar infecciones individuales recientes. El diagnóstico se basa en la toma de una muestra de suero durante la fase aguda (hasta el 5 día de comenzados los síntomas) y otra en la fase convaleciente, 2-3 semanas más tarde. La respuesta de los anticuerpos se reflejará mediante el incremento de 4 títulos entre las fases aguda y convaleciente, frente a un tipo o subtipo de los virus de influenza. No puede realizarse el diagnóstico de la influenza mediante un solo suero, pues la mayor parte de los individuos tienen anticuerpos frente a los virus de influenza. El diagnóstico de casos individuales usando la muestra de la fase convalescente no será confiable y no debe realizarse salvo en circunstancias muy especiales. (1, 2)

Para determinar si un brote ha sido causado por influenza, se deben coleccionar un gran número de sueros de las fases agudas y convalecientes. Los sueros deben parearse de acuerdo a la edad de los pacientes. Para determinar si un brote ha sido causado por el virus de influenza se deberá demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias geométricas de los títulos agudos y de los convalecientes. (3)

La IH es la técnica recomendada para el diagnóstico serológico, aunque pueden utilizarse otras técnicas como la fijación de complemento y técnicas inmunoenzimáticas. (4) (5)

Los reactivos necesarios para la IH son los mismos del Estuche de Influenza de la OMS.

III.1.-PROCEDIMIENTO

Los antígenos de este estuche utilizados para la identificación de aislamientos, son apropiados para el diagnóstico serológico de infecciones causadas por los subtipos de influenza A (H3N2) y A (H1N1). Sin embargo dada la disminución en la sensibilidad de los antígenos virales completos de influenza B, se requieren antígenos tratados con eter para las pruebas de diagnóstico serológico de infecciones con influenza B. (6). A causa del volumen limitado de los reactivos del Estuche OMS, si se desean hacer encuestas para serovigilancia o un número elevado de

diagnósticos sexológicos es conveniente preparar antígenos propios, utilizando los de la OMS como controles.

EQUIPOS: Descritos anteriormente al inicio del capítulo

MATERIALES Y REACTIVOS: Descritos anteriormente al inicio del capítulo.

III.1.1.-Tratamiento del suero.

1. Trate los sueros y los antisueros de referencia para el control positivo con Enzima Destructora de Receptores (EDR), según fue descrito. Cada prueba debe contener sueros de la etapa aguda o convaleciente y antisueros de referencia para el control de los subtipo A (H3N2) y A (H1N1), del Tipo B (B/Panamá/45/90 y del linaje B/Victoria/02/87).
2. Adsorba los sueros para eliminar las aglutininas no inespecíficas según se describió anteriormente
3. II.- Solución de eritrocitos al 0,5%. Descritos anteriormente
4. III.-Titulación de los antígenos de control. Descritos anteriormente
5. IV.- Preparación de los antígenos estandarizados para la IH y su titulación.

Cada antígeno de control debe estandarizarse para que contenga 4 unidades por cada 25 μ L.

III.2.-Prueba de Inhibición de la hemaglutinación. (Ver Figura No.5)

1. Rotular las placas de microtitulación.
2. Añadir 25 μ L de PBS a los pozos desde B hasta H (B1 – H12) por cada columna numerada.
3. Añadir 50 μ L de cada suero tratado (1:10) en los primeros pozos de la columna numerada (A1 - A12).
4. Transferir 25 μ L a fin de diluir los sueros tratados desde (A1-A12) el primer pozo de las columnas numeradas 1-12 a los pozos sucesivos.
5. Añadir 25 μ L de antígeno estandarizado a todos los pozos (A1 a H12) de un conjunto de sueros tratados.

6. Mezclar el contenido de las placas con un dilutor mecánico (vibrador mecánico) por 10 segundos o agitando las placas manualmente, teniendo en cuenta que es crítico coseguir una mezcla perfecta.
7. Tapar la placa e incubar a la temperatura ambiente (22 a 25 °C) durante 30 min.
8. Añadir 50 µL de la solución de eritrocitos al 0,5% estandarizados a todos los pozos y mezcle como lo hizo anteriormente.
9. Cubra las placas para permitir que los eritrocitos se asienten a temperatura ambiente (22 a 25 °C) por un periodo apropiado, de acuerdo a los eritrocitos que esté empleando generalmente ocurre entre 30–45 minutos. Leer los títulos.
10. – Anote los títulos de IH obtenidos.

Interpretación. (Ver Figura No. 6)

La hemaglutinación y la inhibición de la hemaglutinación se leen según fue descrito anteriormente.

El título de cada suero será el valor recíproco de la dilución donde haya una inhibición total de la hemaglutinación.

Se considera positivo el diagnóstico para un tipo o subtipo cuando se demuestre el incremento de 4 títulos entre la fase aguda y convalescente.

FIGURA NO. 5

ESQUEMA PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO POR INHIBICON DE LA HEMAGLUTINACION

		25 µl ANTIGENO 1												Títulos	
		IHA													
Antisuero 50 µl ⇒	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	25 ul
PBS 25 µl ⇒	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	↓ D
↓ ↓	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	↓ I
↓ ↓	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	↓ L
↓ ↓	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	160	↓ U
↓ ↓	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	↓ C.
↓ ↓	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	640	↓
↓ ↓	H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1280	↓

- | | |
|--|--|
| <p>I Preparar diluciones de antisueros</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Muestra de suero humano No. 1 (S1) 2 Muestra de suero humano No. 1 (S2) 3 Muestra de suero humano No. 2 (S1) 4 Muestra de suero humano No. 2 (S2) 5 Muestra de suero humano No. 3 (S1) 6 Muestra de suero humano No. 3 (S2) 7 Muestra de suero humano No. 4 (S1) 8 Muestra de suero humano No. 4 (S2) 9 Antisuero de referencia A(H1) 10 Antisuero de referencia A(H3) 11 Antisuero de referencia Tipo B (B/Beijing/184/93- parecido) 12 Antisuero de referencia Tipo B (B/Beijing/243/97- parecido) | <p>II Añadir 25µL del control de los antígenos</p> <p>Controles de Antígenos</p> <ul style="list-style-type: none"> Influenza A (H1) Influenza A (H3) Influenza B (B/Beijing/184/93) Tratado con Eter Influenza B (B/Beijing/243/97) Tratado con Eter PBS como antígeno para el control de sueros. <p>III Incubar</p> <p>IV Añadir 50 µL de la solución de eritrocitos</p> <p>V Incubar, anotar los resultados e interpretar.</p> |
|--|--|

S1 = Suero de la fase aguda S2 = Suero de la fase convaleciente

FIGURA No. 6

DIAGNOSTICO SEROLOGICO. ILUSTRACIÓN DE LA REACCION DE IHA.

	Influenza A(H3) Antígeno de control												Título de IH ↓
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	10
B	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	20
C	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	40
D	○	●	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	80
E	○	○	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	160
F	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	320
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	640
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1280
Antisuero	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	H3	H1	B/184	B/243	
	SP 1		SP 2		SP 3		SP 4		Control de sueros				

INTERPRETACIÓN.

SP 1 = Una diferencia de título de dos diluciones es interpretado como evidencia de anticuerpos preexistentes a A(H3N2) y probablemente no relacionada con una infección reciente.

SP 2 = Una diferencia de título mayor de cuatro diluciones se interpreta como significativo e indicativo de una infección reciente por un virus de influenza A (H3N2) – (Seroconversión)

SP 3 = Negativo.

SP 4 = Un título \geq de cuatro diluciones es indicativo de una infección reciente por un virus de influenza A (H3N2)

REFERENCIAS.

- 1.- Palmer D, Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part.2: Procedural guide US Department of Health Educat. and Public Health Service. 1975:25-26
- 2.- Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Iceberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM,1992: 8-11.
- 3.- Cough RB, Kasel JA. Influenza. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. ed. USA: American Public Health Associations,1995.
- 4.- Stuart- Harris S, Schild G, Oxford J. Influenza: the viruses and the diseases.2ª.ed. Great Britain: Edward Arnold, 1985.
- 5.- Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.
- 6.- WHO/PAHO/CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May 14 –18, 2001. Atlanta,GA, EEUU.

III.3.-TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS DE LOS SUEROS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFLUENZA. (3) (4) (5).

Las cepas de influenza difieren en su sensibilidad a los diferentes inhibidores inespecíficos presentes en los sueros.

III.3.1.-Tratamiento con Enzima Destructora de Receptores. (EDR).

Generalmente el tratamiento usado es el que se refiere a continuación, aunque las cantidades pueden variar con relación al productor de EDR e inclusive al lote del reactivo.

Conjuntamente con el estuche de reactivos de la OMS, viene un bulbo de EDR (producida por Sigma).

- 1.- Reconstituir la EDR con 5 mL de agua estéril.
- 2.- Diluir con solución salina de calcio.
- 3.- Añadir 4 volúmenes de EDR a 1 volumen de suero (400 µl EDR + 100 µL de suero).
- 4.- Incubar toda la noche a 37⁰ C.
- 5.- Añadir 5 volúmenes (500 µL) de 1.5% de citrato de sodio.
- 6.- Poner en Baño María a 56⁰ C. para inactivar la EDR remanente.

SOLUCIONES

Preparación de la solución Salina de Calcio. (pH 7,2)

Pesar:

- a.- Cloruro de Calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).....1 gr.
- b.- Cloruro de Sodio (NaCl)..... 9 gr.
- c.- Acido Bórico (H_3BO_3)..... 1.2 gr.
- d.- Borato de Sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).....0.052 gr.
- e.- Autoclavear o esterilizar por filtración, pH 7,2.
- f.- Guardar a 4°C por un tiempo no mayor de 3 semanas.

Preparación de la solución de Citrato de Sodio 1,5%, pH 7,2.

- a.- Citrato de Sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....1.6 gr.
Disolver en 100 ml de PBS, pH 7.2
- b.- Autoclavear o esterilizar por filtración.
- c.- Dispensar en frascos ambar para prevenir la fotodegradación.
- d.- Guardar a 4°C por un tiempo no mayor de 3 semanas.

III.3.2.-Tratamiento de los sueros con Periodato de Potasio. (KIO_4).

Para realizar este tratamiento es necesario preparar las siguientes soluciones.

Preparación de la solución de glucosa al 5%.

- a.- glucosa.....5 gr.
- b.- Agua destilada c.s.p.....100 ml.

Preparación de la solución 0,05M de KIO_4 .

- a.- KIO_41,15 gr.
- b.- Agua destilada c.s.p.....100 ml.

Disolver en baño de agua a 70°C ., agitando el frasco hasta que no quede ningún precipitado.

Tratamiento de los sueros.

Inactivar el suero (100 μL) a 56°C , durante 30 minutos.

- a.- Mezclar 100 μL de suero inactivado con 100 μL de la solución de KIO_4 .
- b.- Dejar los sueros tratados a temperatura ambiente durante 2 horas.
- c.- Neutralizar el KIO_4 con 200 μL de glucosa al 5% .

d.- Agregar 600 μ L de PBS, pH 7,2.

e.- El suero tratado queda a una dilución de 1/10.

IV.-TIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA.

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.

Para facilitar y perfeccionar el análisis de las cepas de influenza los laboratorios necesitan métodos más rápidos y menos engorrosos en la identificación en tipo y subtipo de estos virus, aislados de muestras clínicas o después de un pase por alguno de los sistemas clásicos para su aislamiento. El aislamiento viral tiene como ventaja su alta sensibilidad y provee además un material que puede ser utilizado posteriormente para la caracterización viral por diferentes métodos (1, 2).

La técnica de inmunoperoxidasa utilizada en el diagnóstico rápido de los virus de influenza , se basa en la detección rápida de antígenos virales en un cultivo celular de MDCK-L(placa de 96 pozos). Se inoculan 4 pozos de cada cepa de referencia por cada caso clínico, reservándose 4 pozos no infectados como control negativo. Los pozos con virus de influenza tipo A (subtipos H1N1 y H3N2) y tipo B,se utilizan como controles positivos y en el resto de los pozos se inoculan casos clínicos. Se incuba toda la noche, se lava, y se fijan las células con metanol. Posteriormente se incuban con anticuerpos monoclonales específicos de tipo y subtipo, eliminados después de una hora, para añadir anticuerpos antiratón conjugados con peroxidasa que también son eliminados a la hora por lavados sucesivos .Todos los periodos de incubación hasta este paso se realizan a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y finalmente se coloca el sustrato 3-amino-9-ethylcarbazole que le imprime un sello característico a las células, al ser observadas al microscopio de luz invertida, observándose de color de rojo las células infectadas por los virus de influenza.

Esta técnica es altamente recomendada para la identificación de especímenes clínicos de emergencia, por su capacidad de ser rápida, específica, sensible y además capaz de detectar cepas de nueva circulación (3, 4,5, 6).

EQUIPOS:

Gabinete de seguridad Clase II
Incubadora de CO₂.
Refrigerador (4 °C).
Congelador (- 70 °C).
Centrifuga (aditamentos para placas de 96 pozuelos.)
Bomba de vacío.

MATERIALES Y REACTIVOS

1.- Células.

Resuspender las células a una concentración de 100,000 células /mL en medio Dulbecco's modificado (DMEM), suplementado con 0,2% de albúmina bovina, 1% de suero bovino fetal , 25mM HEPES y antibióticos.

Se prepararon placas de 96 pozos(Costar, Cambridge, Mass) con 100 µLde la suspensión celular (10,000 cel/pozo).

2.- Virus. (Controles positivos).

Cepas de referencia que incluyen los tipos A (H1N1), A (H3N2) y tipo B.

3.- Anticuerpos monoclonales.

Para tipar y subtipar. Procedentes del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU.

OMS /Pool de anticuerpos contra Influenza A.

OMS/Pool de anticuerpos contra el tipo B.

OMS/ Anticuerpos HA1-71.

OMS/Anticuerpos HA2-76.

4.- Leche descremada al 5% en PBS.

5.- Anticuerpo antiratón conjugado con peroxidasa (Amersham).

6.-Sustrato: 3-amino-9-ethylcarbazole.

7.- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30%).

8.- PBS, pH 7,2.

9.- Placas de 96 pozos.Costar, Cambridge, Mass.

10.- Metanol.

11.-Pipeta multicanal

12.- Pipetas graduadas.

13.- Puntas.

IV.1.- PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

1.- Virus. (Controles positivos).

Cepas de referencia que incluyen los tipos A (H1N1), A (H3N2) y tipo B.

2.- Anticuerpos monoclonales. Procedentes del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU.

La dilución de los Ac Ms se realiza con la solución de leche descremada al 5% en PBS, según las indicaciones del centro productor para cada uno de ellos.

Pool de anticuerpos contra el tipo A.

Pool de anticuerpos contra el tipo B.

Anticuerpos HA1-71.

Anticuerpos HA2-76.

3.- Solución de leche descremada al 5%.

leche descremada.....5 g

PBS (c.s.p.).....100 mL.

Debe calcularse la cantidad que se va a utilizar por cada placa.

4.- Anticuerpo antiratón conjugado con peroxidasa.

La dilución del conjugado se realiza con la solución de leche descremada al 5%.

Debe calcularse la cantidad que va a ser utilizada del conjugado 1/1000 o de acuerdo a la dilución de trabajo obtenida.

5.- Solución del sustrato: 3-amino-9-ethylcarbazole.

Solución A: solución de acetato de sodio

acetato de sodio.....4,76 g en 700 mL de agua.

Añadir ácido acético glacial.....0,9ml en 299.1 mL de agua.

Unir las dos soluciones y eliminar 50 mL.

tenemos 950 mL de solución de acetato de sodio.

Solución B:

3- amino-9-ethylcarbazole200 mg.

Disolverlos en:

Dimethylformamide.....50 mL.

Agregar la solución B (50mL) a la solución A (950 mL).

Filtrar con membrana de poro 0,22 um, para eliminar algún precipitado.

Guardar en alicuotas de 10mL, a -20 °C.

6.- Solución Salina Fosfatada (0,01 M), pH 7,2.

Preparar una solución stock 25 veces concentrada (25 X).

Solución buferada de fosfato conteniendo en 100 mL:

-Fosfato dibásico de sodio (Na₂ HPO₄).....2,74 gr.

-Fosfato monobásico monohidratado de sodio (Na H₂PO₄. H₂O).....0,79 gr.

Preparar PBS para 1 litro, mezclar y disolver. En agua destilada y desionizada.

-PBS 25 X (Solución buferada de fosfato).....40 mL.

-H₂O c.s.p.....960 mL.

Mezclar bien.

-Chequear el pH 7,2 (más o menos 0,1).

-Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.

-Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 um).

-Guardar a 4° C, por un período mayor de 21 días.

IV.2.-PROCEDIMIENTO (3)(4).

Este procedimiento debe ser realizado en un gabinete de seguridad Clase II.

1.- Lavar la placa 3 veces con PBS estéril (200 µl por /pozo).

2.- Inocular 4 pozuelos con 20 µL de cada una de las cepas de referencia (controles) .

3.- Inocular 4 pozuelos con 20 µL de cada muestra clínica.

4.- Reservar 4 pozuelos no infectados, como control negativo. Se mantienen con medio de cultivo. Incubar a 37° C en CO₂ al 5% durante 20 minutos para equilibrar el pH.

5.- Centrifugar a 2500 r.p.m. (aprox. 700 x g) a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las placas pueden colocarse durante una hora a temperatura ambiente, sino se las puede centrifugar.

6.- Añadir 80 µl a cada pozuelo de medio DMEM, (suplementado con albúmina bovina al 0,2%, Hepes 25 mM, antibiotico y 4ug/ml de TPCK tratado con tripsina al 0,25%).

7.- Incubar a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante toda la noche (16 a 20 horas).

Al día siguiente:

8.- Aspirar el medio a toda la placa, con mucho cuidado de mezclar el medio de diferentes pozuelos, evitando la contaminación (utilizar bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

9.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µl /pozo).

Consecutivamente agregar a todos los pozos para FIJAR LAS CELULAS :

10.- Añadir 50 µL de PBS a cada pozuelo.

11.- Añadir 50 µL de metanol absoluto a cada pozuelo.

12.- Añadir 100 µL de metanol absoluto a cada pozuelo.

Una vez que se haya realizado la dosificación anterior en todos los pozuelos:

13.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

14.- Añadir de nuevo 100 µl de metanol absoluto a cada pozuelo.

15.- Incubar la placa 10 minutos a temperatura ambiente.

16.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µl -pozo).

Anticuerpos Monoclonales

17.-Preparar las diluciones de trabajo de los anticuerpos monoclonales (según el centro productor), en una solución de leche descremada al 5% con PBS:

18.- Añadir 75 µl de los anticuerpos monoclonales por pozo (diluciones de trabajo) a la fila correspondiente.

Pool A en las columnas 1,5 y 9; AcM HA1-71 en las columnas 2, 6, y 10; AcM HA2-76 en las columnas 3, 7 y 11; y el Pool B en las columnas 4, 8, y 12.(Figura 1).

19.- Incubar a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 60 minutos.

20.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa)

21.- Lavar la placa 4 veces con PBS (200 µL -pozo).

Conjugado.

Preparar la dilución del conjugado en una solución de leche descremada al 5% con PBS.

(generalmente 1:1000).

22.- Añadir 75 µl de anticuerpos antiratón conjugado con peroxidasa-por pozo.

23.- Incubar a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 60 minutos.

24.- Eliminarlo todo (aspirar con bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

25.- Lavar la placa 4 veces con PBS (200 µL -pozo).

Sustrato.

26.- Añadir 60 µL del sustrato-por pozo.

27.-Incubar a temperatura ambiente por 30-60 minutos, tiempo en que se desarrolla la coloración.

28.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacio y sacudir vigorosamente la placa.)

29.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µL -pozo).

30.- Añadir 100 µL de PBS a todos los pozuelos.

31.- Observar al microscopio invertido (magnificación 40x100).

IV.3.-INTERPRETACIÓN. (VER FIGURA No.2

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

Las células infectadas reaccionan coloreándose frente a:

Pool A positivo = Influenza tipo A.

Pool A + HA1- 71 + HA2-76 positivos = Influenza subtipo A H3N2.

Pool A + HA2-76 positivo = Influenza subtipo A H1N1

Pool B positivo = Influenza tipo B.

FIGURA No.1

REACCIÓN DE LAS CELULAS INFECTADAS FRENTE A LOS AcsM EMPLEADOS POR TIPO Y SUBTIPO.

COLORACIÓN DE LAS REACCIONES POSITIVAS: ROJA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

A.- Control H3N2. (Columnas 1-2-3-4)

- B.- Control H1N1. (Columnas 1-2-3-4)
- C.- Control tipo B. (Columnas 1-2-3-4)
- D.- Control Celular. (Columnas 1-2-3-4)
- E.- Continuar con las muestras clínicas. (Resto de la placa)

1.- Pool de anticuerpos contra el tipo A. (Columnas 1-5-9)

- 2.- Pool de anticuerpos contra el tipo B. (Columnas 2-6-10)
- 3.- Anticuerpos HA1-71. (Columnas 3-7-11)
- 4.- Anticuerpos HA2-76. (Columnas 4-8-12).

FIGURA No. 2

REACCIÓN DE LAS CELULAS INFECTADAS FRENTE A LOS AcM EMPLEADOS POR TIPO Y SUBTIPO.

COLORACIÓN DE LAS REACCIONES POSITIVAS ROJA.

	Pool A	HA2-71	HA2-76	Pool B
A(H1N1)				
A(H3N2)				
TIPO B				

REFERENCIAS

- 1.- Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF. Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol 1979; 9:175-9.
- 2.- Johnston SL, Bloy H. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for detection of influenza A virus. J Clin Microbiol 1993; 31:142-3.
- 3.- CDC. Protocolo Técnico. Influenza Branch. CDC. Atlanta, GA EEUU.
- 4.- Oropesa S, Morier L, Vazquez S, Goyenechea A, Valdivia A, Hernández B, García S. Caracterización de los virus influenza utilizando anticuerpos monoclonales. Montaje y validación. Rev Cub Med Trop 1996; 48(3):149-154.
- 5.- Sanchez-Fauquier A, Guillén M, Martín J, Kendal AP, Melero JA. Conservación 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.
- 6.- Ziegler T, may H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J Clin Microbiol 1995; 33(2):318-21.

V.-IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-SEGUIDA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Lic. Odalys Valdés Rámirez MsC.

Desde 1977 cocirculan en humano. dos subtipos de virus de influenza A, el subtipo A (H3N2) y el subtipo A (H1N1) y del tipo B dos linajes, antigénica y genéticamente diferentes, representados por las cepas B/Beijing/184/93 (o B/Panama/45/90) y B/beijing/243/97(o B/Victoria/2/87).

La cocirculación de múltiples tipos y subtipos de virus de influenza incrementa la dificultad del diagnóstico y la identificación viral. Los métodos de diagnóstico de rutina para las infecciones virales por virus de influenza incluyen la detección de antígenos y el cultivo viral, los que resultan altamente sensibles y específicos. Sin embargo, el uso de las técnicas moleculares para la detección directa de estos virus en muestras clínicas facilita el estudio de los brotes de infección respiratoria aguda y puede ofrecer una rápida identificación de estos virus. (1).

La RT-PCR constituye un método altamente específico y sensible que garantiza la amplificación de un número bajo de copias del genoma viral, pudiendo ser aplicada directamente a muestras clínicas para la identificación de los diferentes subtipos del virus y para la caracterización de virus multiplicados en huevos embrionados o cultivo de tejidos, utilizando para ello cebadores específicos de subtipo, que son regiones complementarias altamente conservadas del gen que codifica para la HA1. (2)(3)

El proceso consiste en la repetición del ciclo de síntesis de ADN que cuenta con tres secuencias: desnaturalización de la cadena molde por calor, hibridación de los cebadores al ADN desnaturalizado y extensión o polimerización de la nueva cadena de ADN a partir del cebador por una polimerasa. La amplificación se realiza utilizando oligonucléotidos cebadores sintéticos, que flanquean la región diana e hibridan en cadenas opuestas del ADN. Los productos de cada ciclo de síntesis son utilizados como molde en el ciclo siguiente, por lo que la amplificación presenta una cinética exponencial (3) (4).

Finalmente los productos de PCR pueden ser examinados por electroforesis en gel de agarosa, y el tipo y subtipo puede ser determinado de acuerdo con la talla (pares de base pb) del fragmento amplificado. (5)(6)(7).

Equipos

- Gabinete de seguridad clase II
- Centrífuga
- Termociclador
- Cámara de electroforesis con fuente de alimentación
- Transiluminador y cámara fotográfica
- Horno microondas

Materiales y Reactivos

- Tubos de 500 μ L
- Pipeta estériles de cristal (2-5mL)
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta con filtro
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables.
- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Estuche TR-PCR Access System
- Taq Polymerasa (Perkin-Elmer)
- Agarosa LE
- Tris
- Acido Bórico
- EDTA
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidium
- 100 pb ADN Ladder.

Tabla1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Cebadores	Posición de (nucleotidos)	Secuencia (5'  3')
Primera reacción de amplificación		
H1N1 +	1-20	AGCAAAGCAGGGGAAATAA
H1N1 -	1175-1193	GTAATCCCGTTAATGGCA
H3N2 +	7-25	ACTATCATTGCTTTGAGC
H3N2 -	1166-1184	ATGGCTGCTTGAGTGCTT
B +	36-54	GAAGGCAATAATTGTACT
B -	845-874	TCACCATTAAAGGCAAGGACCCTTTTATT

V.1.-Extracción de ARN.

Procedimiento:

Se realiza la extracción de ARN viral para cada una de las cepas de Influenza virus (H1N1, H3N2, B) y de cada uno de los aislamientos a partir de cultivo embrionario, utilizar como control negativo cultivo embrionario sin inocular.

- Tomar 250 μ L de cada muestra (líquido coro alantoideo).
- Añadir 750 μ L de TRIZOL, dar vortex durante 30 segundos. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 100 μ L de cloroformo, mezclar dando vortex 30 segundos y dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Transferir la fase superior a otro tubo eppendorf, evitar tomar de la interfase.
- Añadir 500 μ L de Isopropanol, mezclar por agitación manual e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 minutos bajo las mismas condiciones.
- Adicionar 1000 μ L de Etanol al 75%.
- Centrifugar 15 minutos en igualdad de condiciones.
- Retirar el sobrenadante y secar el ARN (para ello se deja cada eppendorf abierto en el gabinete de seguridad). Es importante que el pellet no se seque demasiado ya que se vuelve insoluble.
- Resuspender en 30 μ L de agua bidestilada estéril.

- Guardar el ARN a -70°C

V.2.-Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Preparar tubos eppendorf de $500\mu\text{L}$ con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10 μL
MgSO ₄ 25Mm	6 μL
DNTP (A, T, G, C) 10mM	1 μL
H1N1 + (100 ng)	1 μL
H1N1 - (100 ng)	1 μL
H3N2 + (100 ng)	1 μL
H3N2 - (100 ng)	1 μL
B + (100 ng)	1 μL
B - (100 ng)	1 μL
AMV RT 5U	1 μL
Taq Poli 5U	1 μL
H ₂ O	15 μL
	40 μL

- Añadir $10\mu\text{L}$ del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de $50\mu\text{L}$.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	48°C	45min
	92°C	2min
PCR x 30 ciclos	94°C	1min
	50°C	1min
	72°C	1min
Final	72°C	7min

V.3.-Detección del producto amplificado.

- Tomar $8\mu\text{L}$ de cada uno de los productos de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (Macarcador de peso molecular ADN Ladder) y mezclar con $2\mu\text{L}$ de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.

- Realizar la electroforesis a 90V durante 1 hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura. Si es posible fotografiarlo.

Se consideran positivas aquellas muestras que den el peso molecular esperado para las bandas de H1N1 (1193 pb) , H3N2 (1177 pb), B (838 pb).

REFERENCIAS

- 1.-Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. Jul 22;94(15):7712-8
- 2.- Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza. Sem Virol. 1995; 6: 359-370.
- 3.- Wright KE, Wilson GA, Novosad D, Dimock C, Tand D. Typing and subtyping of influenza virus in clinical samples by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 10:95-98.
- 4.-Class EJ, Sprenger MJ, Kleter GE, van Beek R. Type specific identification of influenza viruses A, B and C by the polimerase Caín reaction. J Virol Methods. 1992;39:1-13.
- 5.- WHO/ PAHO/ CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May14-18, 2001. Atlanta, GA EEUU.
- 6.- Ellis JS, Slader CJ, Laider P. Análisis of influenza AH3N2 strains isolated in England during 1995-1996 using polymerase Caín reaction restriction J. Med Virol. 1997; 51:234-41.
- 7.- Zhang W, Evans D. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase Chaín reaction. J Virol Methods. 1991; 33: 165-89.