

Recomendaciones y procedimientos de laboratorio para la detección del virus A(H5N1) de la influenza aviar en especímenes de casos humanos sospechosos¹

Revisado en agosto de 2007

Contenido

1. Información general y uso previsto para este documento
2. Recolección y manipulación de especímenes
3. Requisitos de laboratorio
4. Confirmación de los resultados
5. Técnicas de laboratorio disponibles para la detección de los virus A (H5N1) de la influenza en humanos
6. Identificación serológica de anticuerpos contra los virus A (H5N1) de la influenza aviar

Anexo A. Ejemplos de protocolos para algunos ensayos disponibles para detectar virus A(H5N1)

- A.1. Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR)
 - A.1.1 RT-PCR convencional
 - A.1.2 RT-PCR en tiempo real
- A.2. Cultivos de virus con identificación por IFA, HA y HI
- A.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Anexo B. Referencias y lectura adicional

Anexo C. Grupo de trabajo técnico de la OMS sobre protocolos de PCR para la detección de infección por influenza causada por un nuevo virus en humanos (2006–2007)

1. Información general y uso previsto para este documento

La infección de poblaciones de aves con ciertos subtipos de virus A de la influenza aviar plantea riesgos mundiales continuos para la salud pública humana de: (a) infecciones zoonóticas esporádicas en humanos y (b) aparición de una cepa pandémica de la influenza. Estos subtipos pueden considerarse nuevos para los humanos ya que se diferencian de los virus de la influenza estacional² que circulan actualmente y que son evaluados como rutina en los laboratorios. La infección humana con uno de estos nuevos virus de influenza aviar de

¹ Este documento reemplaza al documento *Pruebas de laboratorio recomendadas para identificar el virus A de la influenza aviar en especímenes humanos*. Revisado en marzo de 2007

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html

² "Se utiliza el término "nuevo" en este documento para describir cualquier virus de la influenza que no esté actualmente circulando estacionalmente en poblaciones humanas, es decir, subtipos que no corresponden a la influenza A(H1), A(H3), o B de origen humano

alta patogenicidad (IAAP), con el virus de la influenza A(H5N1), fue reconocida por primera vez durante el brote de 1997 en la Región Administrativa Especial de Hong Kong, China. Desde el año 2003, ha habido brotes de IAAP A(H5N1) en aves de corral de Asia, Europa y África y sigue habiendo infecciones humanas con este subtipo. La circulación actual del virus A(H5N1) de influenza aviar en aves de corral de zonas de Asia y África y las infecciones humanas continuas con este subtipo, así como también la documentación de infecciones humanas con los subtipos H9 y H7 de influenza aviar, enfatizan la necesidad de capacidad diagnóstica para la detección rápida y sensible de infecciones de influenza causada por un nuevo virus en humanos.

Los procedimientos propuestos en este documento tienen como intención analizar especímenes de pacientes con sospecha de infección por influenza aviar A(H5N1), según la descripción del documento Pautas de la OMS para la *investigación de casos humanos de influenza aviar A(H5N1)*³. Sólo se incluyen protocolos para identificación del subtipo H5, pero siempre deben considerarse otros virus nuevos de la influenza. Además, la investigación ante la sospecha de infección humana por influenza aviar A(H5N1) siempre debe considerarse en el contexto de los antecedentes clínicos y epidemiológicos y de acuerdo con la definición de casode la OMS para infecciones humanas por influenza aviar A(H5N1).⁴ Se debe registrar la información relevante, incluyendo historia del paciente y variables de exposición.

Este documento tiene como finalidad ser usado por los Centros Nacionales de Influenza (CNI, miembros de la Red Mundial de la OMS para la Vigilancia de la Influenza). Las recomendaciones y procedimientos están en conformidad con el rol de los Centros Nacionales de Influenza (CNI) durante las fases de alerta interpandémica y pandémica según se detalla en el documento de la OMS *El rol de los Centros Nacionales de Influenza (CNI) durante alerta interpandémica, pandémica y períodos pandémicos*.⁵ Siempre que sea posible, deben enviarse especímenes clínicos y/o aislados de virus a un Laboratorio de Referencia H5 de la OMS para confirmación del diagnóstico si es necesario, o a un Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación de la Influenza para una caracterización antigénica y genética completa, así como también para análisis de susceptibilidad antiviral.

Por favor, observe que los protocolos del Anexo A están sujetos a cambios con el transcurso del tiempo, en respuesta a los cambios en curso en los virus de la influenza y/o las tecnologías diagnósticas. Siempre se debe usar la última versión de este documento (siempre disponible en la página web de la OMS⁶).

2. Recolección y manipulación de especímenes

La recolección y manipulación de especímenes tiene un impacto directo sobre la validez de los resultados de laboratorio. Las muestras recolectadas o manipuladas en forma inadecuada pueden conducir a resultados diagnósticos incorrectos, incluso cuando los procedimientos de análisis se sigan correctamente.

³ Revisado en enero de 2007

http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_EPR_GIP_2006_4/en/index.html

⁴ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/case_definition2006_08_29/en/index.html

⁵ Documento interino, mayo 2007 http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RoleNICsMay07/en/index.html

⁶ en http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html

Los especímenes para el diagnóstico de H5N1 deben ser recolectados de acuerdo con los lineamientos de la OMS disponibles en los documentos *Recolección, conservación y envío de muestras para diagnóstico de infección por virus A(H5N1) de la influenza aviar: Guía para operaciones d campo*⁷ y *Pautas de la OMS para el almacenamiento y transporte especímenes humanos y animales para diagnóstico de laboratorio de infección sospechada de influenza aviar A*.⁸ Se deben tomar especímenes preferentemente antes de iniciar el tratamiento antiviral.

"Regla de Oro": Los especímenes de humanos y de animales **NUNCA** deben procesarse en el mismo laboratorio. Sin embargo, pueden procesarse en la misma institución si la separación de las salas de trabajo para especímenes humanos y animales es clara y estricta. Esto tiene como finalidad eliminar el riesgo de contaminación cruzada de muestras humanas y animales.

3. Requisitos de laboratorio

- **Bioseguridad.** El procesamiento de especímenes y las pruebas diagnósticas deben llevarse a cabo siguiendo las recomendaciones de la OMS para bioseguridad en el laboratorio⁹ así como también las recomendaciones de bioseguridad disponibles en las *Pautas de la OMS para bioseguridad en el laboratorio para manipulación de especímenes con sospecha de contener virus A de la influenza aviar*.¹⁰ Los procedimientos que involucran replicación viral (aislamiento del virus, pruebas de microneutralización) deben realizarse con contención de nivel de bioseguridad (BSL)-3. Los procedimientos que no involucran amplificación del virus pueden desarrollarse con contención BSL-2. Todos los aislados de virus A(H5N1) y los especímenes con resultados positivos para este virus deben guardarse en una instalación de contención adecuada. Se debe hacer un inventario de especímenes, virus y material genético y actualizarlo regularmente.
- **Aseguramiento de la calidad.** Los laboratorios deben tener protocolos estándar establecidos para aseguramiento de la calidad y validación de pruebas, incluyendo el uso apropiado de controles positivos y negativos. Con la continua evolución del virus H5N1, es esencial que los laboratorios usen los protocolos de pruebas que han sido validados para las cepas más recientes del virus A(H5N1). Podría ser necesaria la optimización de los métodos de prueba si los reactivos o el equipo utilizado fuesen diferentes de los protocolos validados originales. La capacitación del personal, el diseño adecuado de las instalaciones y el mantenimiento de los equipos son otros factores que pueden afectar los resultados de las pruebas. Los laboratorios que no sean CNI que lleven a cabo pruebas para virus A(H5N1) en muestras humanas deben colaborar con los CNI¹¹ o con un Laboratorio de Referencia H5 de la OMS¹² para establecer y validar los protocolos. Se recomienda firmemente la participación en los Programas Externos de

⁷ Octubre 2006 http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_CDS_EPR_ARO_2006_1/en/index.html

⁸ Enero de 2005 http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/transport/en/index.html

⁹ Manual de Bioseguridad de Laboratorio de la OMS - Tercera Edición, http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/

¹⁰ Enero de 2005 http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/index.html

¹¹ Lista de Centros Nacionales de la Influenza <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>

¹² Lista de Laboratorios de Referencia H5 de la OMS: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html

Evaluación de Calidad de la OMS¹³ para la detección de los subtipos de virus A de la influenza usando PCR.

- **Capacidad diagnóstica.** Los laboratorios que diagnostican el virus de la influenza A (H5N1) en especímenes de casos sospechosos humanos deben tener la capacidad de detectar e identificar las cepas de influenza estacional con fines de exclusión. Preferentemente, los laboratorios deben ser capaces de identificar otros subtipos nuevos de la influenza así como también otros virus respiratorios.

4. Confirmación de los resultados

Durante los períodos de Alerta Intrapandémica y Pandémica definidos en el *Plan de Preparación Mundial para la Influenza* de la OMS,¹⁴ los resultados de laboratorio para las infecciones sospechadas de influenza aviar en humanos deben ser confirmados por un laboratorio aprobado. En la práctica, la calidad del espécimen, el estadio de la enfermedad, la condición clínica y la exposición epidemiológica deben tenerse en cuenta al interpretar los resultados de las pruebas, especialmente en caso de resultado de laboratorio negativo en el contexto de sospecha clínica. Se pueden considerar investigaciones adicionales teniendo en cuenta cada caso.

Al recibir especímenes de pacientes con sospecha de infección por virus de influenza A(H5N1), los CNI (y otros laboratorios) que **carezcan de la capacidad para confirmar infecciones A(H5)** deben:

- a) Organizar el envío de especímenes a un CNI¹⁵ con adecuada capacidad de prueba o a cualquier Laboratorio de Referencia H5 de la OMS para pruebas confirmatorias;
- e
- b) Informar a la Oficina de la OMS del país y/o Oficina Regional de la OMS y/o Programa Mundial de la Influenza de la sede central de la OMS (whoinfluenza@who.int) que se están enviando especímenes o aislados de virus a otros laboratorios para identificación o caracterización adicionales.

5. Técnicas de laboratorio disponibles para la detección de los virus A (H5N1) de la influenza en humanos

Se pueden utilizar los siguientes ensayos para detectar (e inicialmente identificar) los virus tanto estacionales como nuevos de la influenza A en especímenes humanos. Los ensayos varían de acuerdo con la experiencia y los requerimientos de rapidez, costo y sensibilidad/especificidad de la infraestructura.

- **Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) convencional y ensayo de PCR por transcriptasa inversa en tiempo real.** La PCR detecta el ARN viral presente tanto en especímenes clínicos como en cultivos virales, y

¹³ Proyecto Externo de Evaluación de la Calidad de la OMS para la Detección de los Subtipos de los Virus A de la Influenza usando PCR, julio de http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/eqa_project/en/index.html

¹⁴ http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/index.html

¹⁵ Listado de Centros Nacionales de Influenza <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>

puede ser dirigida a los genes que están relativamente conservados en todos los virus A de la influenza (por ej., genes de la matriz) o genes de hemaglutinina o neuraminidasa que son específicos para subtipos. Incluyendo el tiempo que toma la extracción del ARN viral y la detección de amplicones, el tiempo de respuesta de los ensayos convencionales de RT-PCR es de 6–8 horas. Los métodos de RT-PCR en tiempo real pueden acortar este intervalo de tiempo a alrededor de 3–4 horas mientras brindan una mayor sensibilidad y la posibilidad cuantización del gen viral objetivo.

- **Otros sistemas de detección molecular.** Estos sistemas, la mayoría todavía en desarrollo, tienden a ser rápidos. Los mismos incluyen ensayos basados en amplificación del ácido nucleico y usan varios métodos de detección del punto final.
- **Cultivo de virus.** Los resultados están disponibles en 2–10 días usando métodos de shell-vial o métodos de cultivo celular convencionales. Los cultivos positivos de influenza pueden exhibir efectos citopáticos o no, por ende se necesita un segundo paso para identificar específicamente los virus por inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación (HI) o RT-PCR. Una ventaja del cultivo es que los virus están disponibles para una posterior caracterización. Los cultivos virales en líneas celulares adecuadas también pueden detectar otros virus respiratorios clínicamente importantes.

La mayoría de los virus aviares se desarrollan con facilidad en huevos embrionados y ésta es la opción de elección para la amplificación del virus de huéspedes aviares. Sin embargo, los virus de influenza aviar H5N1 de alta patogenicidad que infectan a los humanos son aún bastante virulentos en los huevos, matándolos rápidamente. Esto hace que los enfoques de amplificación de cultivos convencionales en huevos sean más difíciles. Por esta razón y debido al tema de la bioseguridad, el aislamiento de los virus H5N1 de alta patogenicidad comúnmente se realiza sólo en laboratorios especialmente calificados y equipados.

- **Detección rápida de antígenos.** La detección de antígenos virales puede realizarse por métodos de inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo (EIA). Los métodos basados en EIA son simples y convenientes de usar. Sin embargo, dichas pruebas están en la actualidad dirigidas a antígenos virales conservados (por ej., nucleoproteína viral, proteína de matriz) y detectan todos los subtipos de virus A de la influenza, ya sea de origen humano o aviar. Por lo tanto, estas pruebas no diferenciarán los subtipos de virus humanos H3N2 o H1N1 del H5N1 de la influenza aviar. Además, las pruebas rápidas para detección de antígenos virales actuales, si bien son sensibles para la detección de los virus de la influenza estacional humana, parecen tener baja sensibilidad para el diagnóstico de la influenza aviar H5N1 (es decir, un resultado negativo no excluye enfermedad por H5N1). Por lo tanto y en líneas generales, las pruebas para detección de antígenos comercialmente disponibles en la actualidad tienen una utilidad limitada para el diagnóstico de enfermedad A(H5N1) en humanos.

En el Anexo A se describen ejemplos de protocolos para algunos ensayos disponibles para detectar virus A(H5N1) de la influenza. Los protocolos de laboratorio descriptos en este documento han demostrado ser válidos para los virus H5N1 conocidos cuando los reactivos y las plataformas (y/o cebadores) enumerados se usan juntos como se presentan, y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Los protocolos presentados pueden requerir actualizaciones a medida que evolucionan las nuevas cepas de H5N1.

6. Identificación serológica de anticuerpos contra los virus A (H5N1) de la influenza aviar

Las pruebas serológicas disponibles para la medición del anticuerpo específico de la influenza A incluyen el test de inhibición de la hemaglutinación (HI), enzima inmunoensayo (EIA), y tests de neutralización viral (VN). El ensayo de microneutralización (MN) es la prueba actualmente recomendada para la medición de anticuerpos de la influenza aviar A altamente patogénica. Sin embargo, no es práctica como prueba diagnóstica de rutina de casos clínicos debido a las restricciones enumeradas a continuación. Por lo tanto, es más útil para los estudios de investigación (por ej., para determinación del grado de exposición en contactos de casos o de poblaciones en riesgo).

En forma óptima, los sueros pareados recolectados primero durante la fase aguda de la enfermedad y luego a los 14 días o más después del comienzo de la enfermedad, deben analizarse simultáneamente. En forma retrospectiva, la infección por H5N1 se confirma cuando se cumple uno de los siguientes criterios:

- Un aumento de cuatro veces o más en la titulación de anticuerpos contra A(H5N1) en sueros pareados (agudos y convalecientes), teniendo el suero convaleciente un título de 1:80 o superior.
- Título de anticuerpos de 1:80 o superior en un suero único recolectado el día 14 o posteriormente después del comienzo de los síntomas y un resultado positivo usando diferentes ensayos serológicos (por ej., título de 1:160 o superior en HI usando glóbulos rojos de caballo o un Western blot específico para H5).

Restricciones de las técnicas serológicas:

- Los anticuerpos pueden tardar varias semanas en desarrollarse y ser detectables en suero.
- En general, los paneles estándar de reactivos para H5N1 y otras cepas nuevas no están ampliamente disponibles y los resultados entre los laboratorios que realizan estas pruebas varían considerablemente.
- El ensayo de MN es técnicamente difícil de realizar.
- Los ensayos de VN y MN requieren el uso de virus vivo, por lo tanto sólo pueden usarse en laboratorios con instalaciones para contención con Bioseguridad Nivel 3.
- Dificultades para determinar el punto final en HI con glóbulos rojos de caballo debido a su pequeño tamaño. El ajuste de la concentración del buffer podría superar el problema.
- Puede ocurrir reactividad cruzada no específica en todos los ensayos serológicos debido a infecciones previas por virus de influenza humana u otros factores. Se recomienda la adecuada adsorción del suero antes de efectuar las pruebas.

Anexo A

Ejemplos de protocolos para algunos ensayos disponibles para detectar virus A(H5N1)

Los protocolos de laboratorios descriptos en este documento han demostrado ser válidos cuando los reactivos y plataformas (y/o cebadores) enumerados se usan juntos como se presentan, y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Los protocolos descriptos no contienen toda la información requerida para realizar estas pruebas. Se deben obtener detalles adicionales a partir de las referencias citadas en este documento, de un Laboratorio de Referencia H5 de la OMS,¹⁶ o de miembros del grupo de trabajo técnico de la OMS sobre protocolos de PCR (ver Anexo C). Los protocolos presentados pueden requerir actualizaciones a medida que evolucionan nuevas cepas de H5N1.

Todos los ensayos deben ser inicialmente validados en cada laboratorio antes de comenzar a analizar las muestras clínicas.

A1. Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) es una técnica eficaz para la identificación de los genomas del virus de la influenza. El genoma viral (que consiste en un ARN de hebra simple) debe ser extraído primero. Luego, durante la transcripción inversa, se sintetizan copias de ADN del ARN original (ADNc) usando una transcriptasa inversa (RT). Usando polimerasa en el siguiente paso, el ADNc es amplificado a un número elevado de copias (producto de PCR). Finalmente, los productos de amplificación del ADNc son detectados con diferentes técnicas y pueden ser analizados más profundamente mediante métodos de genética molecular como la secuenciación.

En la RT-PCR convencional, los productos son detectados al final de la reacción. Con RT-PCR en tiempo real, los productos se detectan durante el proceso de amplificación, permitiendo la cuantificación. Todavía se usa ampliamente el análisis RT-PCR convencional, pero cada vez más laboratorios están optando por utilizar RT-PCR en tiempo real a medida que decrecen los costos.

En ambos métodos, el procedimiento para amplificación requiere un par de cebadores (*o primers*) oligonucleótidos. Estos pares de cebadores (*o primers*) están diseñados sobre la base de secuencias conocidas de diferentes genes de la influenza (siendo los genes para la hemaglutinina (HA), y la neuraminidasa (NA) los más frecuentemente usados) de los subtipos de influenza de interés, y por lo tanto detectarán específicamente el ARN de sólo un subtipo. Otros cebadores están dirigidos a genes que están relativamente conservados en todos los virus A de la influenza (por ej., gen de la matriz). Con la continua evolución de los virus H5, la diversificación genética de las cepas del virus H5N1 en los dos últimos años ha convertido a la recomendación de conjuntos de cebadores específicos en un desafío. Se ha establecido un grupo

¹⁶ Listado de Laboratorios de Referencia H5 de la OMS:
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html

de trabajo técnico de la OMS (Anexo C) para preparar los protocolos modelo para cebadores RT-PCR convencionales y en tiempo real para detectar las cepas circulantes de influenza aviar. Además de los requerimientos generales para bioseguridad, aseguramiento de la calidad y capacidad diagnóstica en el laboratorio descritos en el cuerpo de este documento, los laboratorios que usan RT-PCR para detectar y diagnosticar las infecciones por influenza aviar deben considerar los temas específicos enumerados a continuación. Los mismos pueden causar efectos pronunciados en la probabilidad de obtener resultados falso-negativos o falso-positivos.

- **Cobertura de todos los clados circulantes de H5N1 que causan infección humana en todas las regiones.** La variación de la secuencia genética de los virus usados para diseñar las secuencias de los cebadores para RT-PCR puede afectar dramáticamente la reactividad cruzada y por lo tanto la sensibilidad de la prueba. En consecuencia, es importante seguir la magnitud de la variación genética en los virus de las diferentes regiones. La magnitud y la naturaleza de la variación de las cepas de H5N1 circulantes son analizadas periódicamente por los Laboratorios de Referencia H5 de la OMS con el fin de evaluar y actualizar regularmente los cebadores. Se recomienda la consulta con los Laboratorios de Referencia H5 de la OMS o con un miembro del grupo de trabajo técnico de la OMS (Anexo C) antes de usar los protocolos de este documento.
- **Algoritmos de evaluación/prueba/análisis.** El enfoque general para la detección del virus de la influenza mediante RT-PCR debe considerarse dentro del contexto de la situación nacional, por ej., cuántas muestras pueden manipularse (rendimiento), a qué secuencia genética se dirigirá la RT-PCR, si deben usarse pruebas concurrentes o secuenciales para RT-PCR de genes M y HA.
- **Buenas prácticas de laboratorio.** Se deben implementar los protocolos estándar para todos los procedimientos y deben ser revisados regularmente. Es fundamental asegurar que se usen y se manipulen adecuadamente los reactivos recomendados ya que las reacciones son complejas y los problemas con un reactivo único pueden tener importantes efectos.
- **Validación.** Todos los protocolos deben ser siempre validados en cada laboratorio para garantizar la adecuada especificidad y sensibilidad usando los mismos controles que se emplean en cada prueba.
- **Aseguramiento de la calidad.** Se deben implementar protocolos estándar de aseguramiento de la calidad y buenas prácticas de laboratorio. Es altamente recomendable la participación de los CNI en los ejercicios de evaluación (programa externo de aseguramiento de la calidad) para confirmar que los laboratorios están alcanzando un adecuado nivel de sensibilidad y especificidad en sus pruebas.
- **Capacitación del personal.** Conocer los protocolos y tener la experiencia que permita la correcta interpretación de los resultados son piedras fundamentales para cualquier diagnóstico exitoso.
- **Instalaciones y áreas de manipulación.** Debe haber instalaciones para la manipulación de especímenes y reactivos (incluyendo cadenas de frío) con la separación adecuada para los distintos pasos de RT-PCR para prevenir la contaminación cruzada. Las instalaciones y el equipo deben cumplir con los niveles adecuados de bioseguridad. Se

debe realizar la RT-PCR en un lugar separado del usado para técnicas de aislamiento de virus.

- **Equipo.** El equipo se debe usar y mantener de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- **Interpretación de los resultados.** Se considera que una muestra es positiva cuando los resultados de las pruebas que usan dos objetivos de PCR diferentes (por ej., cebadores específicos para influenza A y hemaglutinina H5) son positivos. El resultado negativo de PCR no excluye la infección de una persona con el virus de la influenza. Los resultados deben interpretarse junto con la información clínica y epidemiológica disponible. Los especímenes de pacientes con PCR negativa pero una alta sospecha de infección A(H5N1) deben ser investigados más profundamente y también analizados mediante otros métodos, como cultivo viral o serología, para descartar infección por influenza A(H5N1). Se recomienda hacer pruebas para cepas de influenza estacional y otros subtipos no típicos de la influenza (por ej. H7, H9) y otros virus respiratorios, cuando los resultados de las pruebas para influenza A (H5N1) no son claros.

A.1.1 Análisis convencionales de RT-PCR

PROTOCOLO 1¹⁷ de RT-PCR Convencional

A continuación se presentan los protocolos y cebadores (o *primers*) de PCR convencional y electroforesis en gel de productos para detectar virus A(H5N1) de influenza aviar en especímenes humanos. Estos protocolos han demostrado ser ampliamente efectivos para la identificación del virus H5N1 Clado 1, 2 y 3 cuando se los usa con los reactivos y cebadores indicados. Se recomienda a los laboratorios que tengan dudas sobre la identificación de los clados actualmente circulantes contactar a uno de los miembros del Comité de Expertos de la OMS sobre AI PCR (Apéndice C) o a uno de los Laboratorios de Referencia H5 de la OMS para obtener asistencia para la identificación de los cebadores óptimos para su uso.

Materiales requeridos

- QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN[®] Cat#51104)
- Juego RT-PCR de un solo paso (QIAGEN[®], Cat#210212)
- Inhibidor de RNasa 20U/μl (Applied Biosystems Cat# N808-0119)
- Agua sin RNasa
- Etanol (96–100%)
- Microcentrífuga (ajustable, hasta 13 000 rpm)
- Pipetas ajustables (10, 20, 200, 100 μl)
- Puntas para pipeta estériles, sin ARNasa con barrera de aerosol
- Vortex
- Tubos para microcentrífuga (0.2, 1.5ml)

¹⁷ Protocolo proporcionado por la Unidad Gubernamental de Virología, RAE de Hong Kong, China, CNG

- Termociclador
- Conjuntos de cebadores
- Control positivo (se puede obtener por pedido a un Laboratorio de Referencia H5 de la OMS¹⁸)

¹⁸ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/

Cebadores

Gen	H5
Clado	1, 2, 3
Secuencias de cebadores	H5-1: GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC H5-3: CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG
Tamaño esperado del producto	219 bp
Referencia	Modificado a partir de Yuen et al. 1998 (Anexo B)
Gen	M
HClado	1, 2, 3
HSecuencias de cebadores	M30F: TTC TAA CCG AGG TCG AAA CG M264R2: ACA AAG CGT CTA CGC TGC AG
HTamaño esperado del producto	232 bp
HReferencia	NIID ¹⁹
HGen	N1
HClado	-
HSecuencias de cebadores	N1-1: TTG CTT GGT CGG CAA GTG C N1-2: CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC
Tamaño esperado del producto	616bp
Referencia	Wright et al. 1995 (Anexo B)

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral del espécimen con QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit o equipo para extracción equivalente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Realizar RT-PCR de un solo paso

Para genes H5 o N1

- a. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR según se detalla a continuación:

Solución amortiguadora	
5x QIAGEN [®] para RT-PCR	10 µl
Mezcla de dNTP	2 µl
Solución 5x Q	10 µl
Cebador directo (5 µM)	6 µl
Cebador inverso (5 µM)	6 µl
Mezcla enzimática	2 µl
Inhibidor de RNasa (20U/µl)	0.5 µl
Agua (grado molecular)	9 µl
Total	45 µl

¹⁹ Cebadores diseñados por el Laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas [Laboratory at National Institute of Infectious Diseases (NIID)], Tokyo, Japón, Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación de la Influenza y Laboratorio de Referencia H5 de la OMS

b. Agregar 5 µl de ARN viral

Para gen M

a. Preparar la mezcla maestra para RT-PCR según se indica a continuación:

Solución amortiguadora	
5x QIAGEN® para RT-PCR	10µl
Mezcla de dNTP	2 µl
Cebador directo (5 µM)	6 µl
Cebador inverso (5 µM)	6 µl
Mezcla enzimática	2µl
Inhibidor de RNasa(20U/µl)	0.5µl
Agua (Grado molecular)	19µl
Total	45µl

b. Agregar 5 µl de ARN viral

3. Condiciones de ciclado de la temperatura para PCR

H5, N1

Transcripción inversa	30 min 50 °C
Activación inicial de PCR	15 min 95 °C

Ciclo en 3 pasos

Desnaturalización	30 sec 94 °C
Templado	30 sec 55 °C
Extensión	30 sec 72 °C
Número de ciclos	40

Extensión final	2 min 72 °C
-----------------	-------------

M

Transcripción inversa	30 min 50 °C
Activación inicial de PCR	15 min 95 °C

Ciclo en 3 pasos

Desnaturalización	30 sec 94 °C
Templado	30 sec 50 °C
Extensión	30 sec 72 °C
Número de ciclos	40

Extensión final	2 min 72 °C
-----------------	-------------

4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR

Preparar el gel de agarosa, cargar los productos de PCR y el marcador de peso molecular, y ejecutar de acuerdo con los protocolos estándar. Visualizar la presencia del marcador con luz UV. A continuación se da un ejemplo del procedimiento.

Materiales requeridos

- Bandeja para gel de agarosa y cámara de electroforesis
- Suministro eléctrico y electrodos
- Caja de luz UV (302nm)
- Cámara y película Polaroid o computadora conectada a la cámara
- Pipetas ajustables
- Gel de agarosa al 2% en 1× TAE
- Amortiguador 1× TAE
- Bromuro de etidio (10 mg/ml)
- 6 x Solución amortiguadora con carga de gel (GLB)
- Marcador de peso molecular

Procedimiento

Fundir un gel de agarosa

- 1) Colocar una bandeja para fundición del gel dentro de una base para fundición de gel. Inserte un peine y nivele la base.
- 2) Preparar agarosa al 2% pesando 4 g de polvo de agarosa y disuélvala en 200ml 1× amortiguador TAE. Disuelva el agar calentándolo en horno de microondas.
- 3) Enfriar el agar derretido hasta aproximadamente 60 °C, y luego agregue 10 µl de bromuro de etidio.
- 4) Verter la agarosa derretida en una bandeja para fundición de gel.
- 5) Dejar que el gel se solidifique a temperatura ambiente.
- 6) Retirar el peine del marco.
- 7) Colocar la bandeja dentro de la cámara de electroforesis con las fosas del lado de los cátodos.
- 8) Llenar la cámara amortiguadora con 1× TAE a un nivel que pueda cubrir la parte superior del gel.

Carga de las muestras

- 1) Agregar 5 µl de GLB de PCR.
- 2) Cargar el marcador de peso molecular en la fosa del gel de agarosa.
- 3) Pipetear 15 µl del producto de PCR /GLB en el gel.
- 4) Cerrar la tapa de la cámara y conecte los electrodos. Correr el gel a 100V durante 30–35 min.
- 5) Visualizar la presencia de bandas de marcadores y productos de PCR con luz UV.
- 6) Documentar la imagen del gel con una fotografía.

5. Interpretación de los resultados

El tamaño de los productos de PCR obtenidos debe compararse con el tamaño esperado de los productos (dado en las tablas anteriores). Si la prueba se ejecuta sin un control positivo, los productos deben ser confirmados mediante secuenciación y comparación con las secuencias disponibles.

PROTOCOLO 2 de RT-PCR Convencional²⁰

Materiales requeridos

Los mismos que para el PROTOCOLO 1 de PT-PCR Convencional descripto anteriormente.

Cebadores

Gen M (NIID):

Clado 1, 2, 3

Secuencias cebador	Tipo A/M264R2:	5'-ACAAAGCGTCTACGCTGCAG
	Tipo A/M30F:	5'-TTCTAACCGAGGTCGAAACG

Tamaño esperado
del producto: 232bp

Gen H5 (NIID):

Clado 1, 2, 3

Secuencias cebador	H5-248-270F:	5'-GTGACGAATTCATCAATGTRCCG
	H5-671-647R:	5'-CTCTGGTTTAGTGTTGATGTYCCAA

Tamaño esperado
del producto: 424bp

Gen N1 (NIID):

Clado 1, 2, 3

Secuencias cebador	N1-580-607F:	5'-TGAAGTACAATGGCATAATAACWGACAC
	N1-891-918R:	5'-CCACTGCATATATATCCTATTTGATACTCC

Tamaño esperado
del producto: 343bp

Procedimiento

1. Extraer el ARN viral del espécimen clínico con QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit o equipo de extracción equivalente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Realizar RT-PCR de un solo paso
 - 1) Retirar los reactivos de su almacenamiento, descongelarlos a temperatura ambiente. Una vez descongelados, mantenerlos en hielo.
 - 2) Preparación de la mezcla maestra (**trabajar sobre hielo**)

Agregar lo siguiente a los tubos para microcentrifugado y mezclar pipeteando la mezcla maestra hacia arriba y hacia abajo diez veces. (**Nota: Es importante mezclar las soluciones completamente antes de usar para evitar diferencias localizadas en la concentración de sal.**)

²⁰ Protocolo suministrado por el Laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas [National Institute of Infectious Diseases (NIID)], Tokyo, Japón, Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación sobre la Influenza y Laboratorio de Referencia H5 de la OMS

Reacción sin Solución Q

Agua sin RNasa	9.5 µl
Amortiguador 5 x QIAGEN® OneStep RT-PCR	5 µl
Mezcla de dNTP (con 10mM de cada dNTP)	1 µl
Cebador sentido (+) (10 µM)	1.5 µl
Cebador antisentido (-) (10 µM)	1.5 µl
Mezcla Enzimática QIAGEN® OneStep RT-PCR (5 U/µl)	1 µl
Inhibidor de la RNasa (40 U/µl)	0.5 µl
Volumen total	20 µl /prueba

3) Distribuir 20 µl de la mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.

4) Añadir 5 µl de ARN de la muestra a la mezcla maestra. Para reacciones de control, usar 5 µl de agua destilada para control negativo, y 5 µl de los ARN virales adecuados para control positivo.

5) Programar el termociclador de acuerdo con las condiciones de termociclado.

6) Iniciar el programa de RT-PCR mientras los tubos de PCR están todavía en el hielo. **Esperar hasta que el termociclador haya alcanzado los 50 °C.** Luego, colocar los tubos de PCR en el termociclador.

3. Condiciones de termociclado

Transcripción inversa 50 °C 30 min.

Activación de la

PCR inicial 95 °C 15 min.

Desnaturalización 94 °C 30 sec.

Templado 50 °C 30 sec.

Extensión 72 °C 1 min.

Número de ciclos 40

Extensión final 72 °C durante 10 min

Mantener a 4 °C

4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR

Preparar el gel de agarosa, cargar los productos de PCR y el marcador de peso molecular, y ejecutar de acuerdo con los protocolos estándar. Visualizar la presencia del marcador con luz UV. En el PROTOCOLO 1 de RT-PCR Convencional antes descrito se provee un ejemplo del procedimiento.

5. Interpretación de los resultados

El tamaño de los productos de PCR obtenidos debe compararse con el tamaño esperado de los productos (dado en las tablas anteriores). Si las pruebas se ejecutan sin un control positivo,

los productos deben ser confirmados mediante secuenciación y comparación con las secuencias disponibles.

A.1.2 Análisis de RT-PCR en tiempo real

La RT PCR en tiempo real presenta diferentes desafíos en comparación con la RT-PCR convencional. Además de las consideraciones anteriores sobre RT-PCR, las consideraciones específicas para RT-PCR en tiempo real incluyen:

- Garantizar que se usen y manipulen correctamente los equipos, el software y los reactivos para fluorescencia adecuados.
- Garantizar la capacitación adecuada del personal para la interpretación de los resultados (es esencial la experiencia para reconocer los verdaderos positivos, interpretación de los controles/valor ct y fluorescencia aberrante, etc.).
- Para hacer determinaciones cuantitativas, es esencial la validación en el laboratorio y la optimización de las reacciones.
- Hay poca probabilidad de contaminación cuando se descartan las reacciones después de realizar las pruebas. Sin embargo, muchos laboratorios hacen análisis post reacción adicionales (por ej., polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción usando geles, secuenciación) que pueden reintroducir la contaminación.

PROTOCOLO 1 de RT-PCR en tiempo real²¹

Extraer el ARN viral del espécimen clínico según se describe en la sección anterior A.1.1 *Análisis convencionales de RT-PCR*.

Materiales requeridos

Transcripción Inversa

Amortiguador I 10X PCR con 15 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)
Hexámero aleatorio 50 µM (Applied Biosystems)
Transcriptasa Inversa de MuLV 50 U/µl (Applied Biosystems)
Inhibidor de la RNasa 20 U/µl (Applied Biosystems)

PCR en tiempo real

Kit LightCycler[®] – FastStart[™] DNA Master HybProbes (Roche)
Cebadores y mezcla de sondas: Agregar igual volumen de los siguientes componentes para preparar los cebadores y la mezcla de sondas para H5 y M

²¹ Protocolo suministrado por la Unidad Gubernamental de Virología, Hong Kong, RAE, China, Laboratorio de Referencia H5 de la OMS

Cebadores y sondas

Gen	H5
Clado	1, 2, 3
Secuencia de cebadores	H5-266F: 5'- TGCCGGAATGGTCTTACATAGTG -3' (5 µM)
	H5-1615F: 5'- GTGGCGAGCTCCCTAGCA -3' (5 µM)
	H5-347R: 5'- TCTTCATAGTCATTGAAATCCCCCTG -3 (5 µM)
	H5-1695R: 5'- TCTGCATTGTAAACGACCCATTG -3' (5 µM)
	H5-290P: 5'-(FAM)-AGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTA-(TAMRA)-3' (2.5 µM)
	H5-1634P: 5'-(FAM)-TGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGG-(TAMRA)-3' (2.5 µM)

Gen	M
Clado	1, 2, 3
Secuencia de cebadores	FLUAM-1F: 5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3' (10 µM)
	FLUA-2F: 5'-CATTGGGATCTTGCACTTGATATT-3 (10 µM)
	FLUAM-1R: 5'-CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' (10 µM)
	FLUAM-2R: 5'-AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA-3' (10 µM)
	FLUA-1P: 5'-(FAM)-TTTGTGTTTCACGCTCACCGT-(TAMRA)-3' (5 µM)
	FLUA-2P: 5'-(FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCA-(TAMRA)-3' (5 µM)

Procedimiento

Realizar RT

Reactivo	Volumen (µl) por reacción
Amortiguador I 10X PCR con 15 mM MgCl ₂	2
Extra 25mM MgCl ₂	2.8
2.5mM dNTPs	8
Hemámero aleatorio 50µM	1
Inhibidor de la ARNasa 20U/µl	1
Transcriptasa Inversa 50 U/µl	1
ARN extraído	4.2

- (1) Agitar en Vortex y centrifugar el tubo con la mezcla brevemente.
- (2) Mantener el tubo a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego incubar a 42 °C por lo menos durante 15 minutos.

(3) Incubar el tubo a 95 °C durante 5 minutos y luego enfriar en hielo.

Realizar PCR en tiempo real

- (1) Preparar la mezcla de reacción “Hot Start” pipeteando suavemente 60 µl de Sondas de Hibridación para Mezcla de Reacción LC-FastStart™ (frasco ampolla 1b) en el LC-Enzima FastStart™ (frasco ampolla 1a).
- (2) Para cada muestra de prueba y controles positivos y negativos, preparar la mezcla del reactivo con cebadores y mezcla de sondas de acuerdo con lo siguiente:

Mezcla maestra:

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O grado PCR	7.6
MgCl ₂ (25 mM)	2.4
Cebadores y mezcla para sondas (H5 o M)	3
Mezcla para reacción “Hot Start”	2
Volumen total	15
Cada reacción:	
Mezcla maestra	15
ADNc	5

Condiciones de ciclado de la temperatura de PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (minuto:segundo)	No. de ciclos
95	10:00	1
95	0:10	} 50
56	0:15	
72	0:10	
40	0:30	1

PROTOCOLO 2 de RT-PCR en tiempo real²²

Extraer el ARN viral del espécimen clínico como se describe anteriormente en el capítulo 1.1 *Análisis de RT-PCR convencional*.

Materiales requeridos

- QIAGEN[®] QuantiTect[®], Equipo de Sonda para RT-PCR (#204443):
 - 2 x QuantiTect[®], Mezcla Maestra de Sonda de RT-PCR
 - QuantiTect[®], Mezcla RT
 - Agua sin RNasa
- Cebadores
- Sonda
- Equipo: Sistema de Detección de PCR en tiempo real Chromo-4[™] (BioRad)

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realiza mediante RT-PCR de un solo paso usando una sonda TaqMan[®]

Cebadores y sondas:

Gen	Tipo A (M)	
Clado	1, 2, 3	
Secuencia de cebadores	MP-39-For (10 µM)	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
	MP-183-153Rev (10 µM)	TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
Secuencias de sondas	MP-96-75ProbeAs (5pmol/µl)	FAM-ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG-MGB

Gen	H5	
Clado	1, 2, 3	
Secuencia de cebadores	H5HA-205-227v2-For (10 µM)	CGATCTAGAYGGGGTGAARCCTC
	H5HA-326-302v2-Rev (10 µM)	CCTTCTCCACTATGTANGACCATTC
Secuencias de sondas	H5-Probe-239-RVa (5pmol/µl)	FAM-AGCCAYCCAGCTACRCTACA-MGB
	H5-Probe-239-RVb (5pmol/µl)	FAM-AGCCATCCCGCAACACTACA-MGB

²² Protocolo suministrado por el Laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas [National Institute of Infectious Diseases (NIID)], Tokyo, Japón, Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación de la Influenza y Laboratorio de Referencia H5 de la OMS

Gen	N1
Clado	1, 2, 3
Secuencias de cebadores	N1-For-474-502-v2 TAYAACTCAAGGTTTGAGTCTGTYGCTTG (10 µM)
	N1-Rev-603-631-v2 ATGTTRTTCCTCCAACCTCTTGATRGTGTC (10 µM)
Secuencias de sondas	N1-Probe-501-525-v3 FAM-TCAGCRAGTGCCATGATGGCA-MGB (5pmol/µl)

Mezcla de Reacción

Mezcla Maestra para Sonda de

RT-PCR 2x QuantiTect®	12.5 µl
Cebador Directo (10µM)	1.5 µl
Cebador Inverso (10µM)	1.5 µl
*Sonda (5pmol/µl)	0.5 µl
Mezcla QuantiTect® RT	0.25 µl
Agua sin RNasa	3.75 µl
Total	20 µl

**Para la reacción de la detección de H5 se usa una mezcla de dos sondas.*

H5-Probe-239-RVa	0.375 µl
H5-Probe-239-RVb	0.125 µl

Procedimiento

- 1) Distribuir 20 µl de la mezcla de reacción en cada placa de reacción para RT-PCR.
- 2) Agregar 5 µl ARN de muestra a la mezcla de reacción. Para reacciones de control, usar 5 µl de agua destilada para control negativo, y 5 µl de ARN virales positivos adecuados para control positivo.
- 3) Programar el termociclador de acuerdo con el programa que se describe a continuación.
- 4) Iniciar el programa de RT-PCR en tiempo real mientras que las placas de reacción para RT-PCR todavía están **en hielo. Esperar hasta que el termociclador haya alcanzado 50 °C.** Luego, colocar las placas de reacción para RT-PCR en el termociclador.

Condiciones de ciclado de temperatura de RT-PCR

Transcripción inversa 50°C 30min.

↓

Desnaturalización 95°C 15min.

↓

PCR	94°C 15sec.	} 45 ciclos
	56°C 1min.	

PROTOCOLO 3 de RT-PCR en tiempo real²³

Extraer el ARN viral RNA de los especímenes clínicos manualmente con el equipo de aislamiento High Pure total RNA (Roche Diagnostics, Almere, Holanda) o automáticamente con un sistema MagnaPure LC (Roche) y el equipo de aislamiento de ácido nucleico total MagnaPure LC de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Materiales requeridos

Transcripción Inversa y PCR en tiempo real

Reactivos de núcleo TaqMan® EZ-RT/PCR (Applied Biosystems, cat. nr. N808-0236)

Cebadores y sondas (ver la lista a continuación)

Cebadores y sondas

Gen	H5
Clado	Clásico (Eurasian LPAI), 0, 1, 2
Secuencias de cebadores	RF 1151 5'-GGA-ACT-TAC-CAA-ATA-CTG-TCA-ATT-TAT-TCA-3'
	RF 1152 5'-CCA-TAA-AGA-TAG-ACC-AGC-TAC-CAT-GA-3'
	RF 1153 5'-6-FAM-TTG-CCA-GTG-CTA-GGG-AAC-TCG-CCA-C-TAMRA-3'

Gen	M (modificado a partir de Ward et al., J. Clin. Virol. 29:179-188, 2004)
Clado	Todos los virus A de la influenza
Secuencias de cebadores	RF 1073 5'-AAG-ACC-AAT-CCT-GTC-ACC-TCT-GA -3'
	RF 1074 5'-CAA-AGC-GTC-TAC-GCT-GCA-GTC-C-3'
	RF 1293 5'-6-FAM-TTT-GTG-TTC-ACG-CTC-ACC-GTG-CC-TAMRA-3'

Procedimiento

Realizar RT-PCR de un solo paso. Usar el kit de reactivos Applied Biosystems TaqMan® EZ-RT/PCR y los siguientes cebadores/sondas:

Cebador /Sonda	Solución stock	Solución de trabajo
RF 1073	200 pmol/μl	30 pmol/μl
RF 1074	200 pmol/μl	40 pmol/μl
RF 1293	200 pmol/μl	20 pmol/μl
RF 1151	200 pmol/μl	40 pmol/μl
RF 1152	200 pmol/μl	40 pmol/μl
RF 1153	200 pmol/μl	10 pmol/μl

²³ Protocolo suministrado por el Centro Médico Erasmus, Centro Nacional de la Influenza, Rotterdam, Holanda

RT-PCR de un solo paso:

Reactivo	Volumen (µl)
Cebador 1 (solución de trabajo)	1
Cebador 2 (solución de trabajo)	1
Sonda (solución de trabajo)	1
Amortiguador 5 x EZ	10
25 mM Mn(OAc) ₂	6
dNTP (2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, 5 mM dUTP)	6
Polimerasa rTth	2
Amperasa	0.5
ARN	20 *
Agua bidest	2.5 *

* Esta cantidad de ARN de entrada se basa en ARN purificado MagnaPure. Para el ARN aislado en forma manual con el equipo de aislamiento High Pure total RNA (Roche), usamos 5 µl de ARN y 17.5 µl de agua.

Cubrir la placa con una cubierta especial TaqMan® 7 y retirar los deslizamientos laterales de la cubierta de la placa.

Haga girar la placa a 1000 rpm durante 5 segundos.

Condiciones de ciclado de la temperatura de RT-PCR

Temperatura (°C)	Tiempo (minuto:segundo)	No de ciclos
50	2:00	1 x
60	30:00	
95	5:00	
94	0:20	50 x
60	1:00	

2. Cultivos de virus con identificación por IFA, HA y HI

El aislamiento de virus mediante cultivo es una técnica sensible con la ventaja de que el virus está luego disponible tanto para identificación como para posterior caracterización antigénica y genética, análisis de susceptibilidad a las drogas, y preparación de vacunas. Los medios preferidos para el desarrollo del virus de la influenza incluyen células MDCK o huevos de pollo embrionados. A diferencia de otras cepas de la influenza A, la influenza A(H5N1) también se desarrollará en otras líneas celulares comunes como las células Hep-2 y RD. El desarrollo del virus A(H5N1) de la influenza humana no requiere el agregado de tripsina exógena.

La identificación y la tipificación de un virus de influenza cultivado puede entonces llevarse a cabo por PCR, por inmunofluorescencia (IFA) usando anticuerpos monoclonales específicos, o

mediante hemaglutinación (HA) y análisis antigénico (subtipificación) mediante inhibición de la hemaglutinación (HI) usando antisueros de referencia seleccionados.

El cultivo de virus sólo se puede recomendar donde haya instalaciones BSL-3 disponibles, y se deben tomar precauciones de bioseguridad al manipular cultivos celulares que potencialmente contengan influenza aviar altamente patogénica.

Materiales requeridos

- Células Renales Caninas Madin-Darby (MDCK), ATCC CCL34
- Juego de Reactivos de la Influenza de la OMS para la Identificación del Virus A(H5) de la Influenza. Los reactivos para identificación de A(H5N1) en cultivo celular incluyen:
 - Antígeno de control de la influenza A(H5N1): virus inactivado
 - Suero de cabra para A/Tern/South Africa/61/ H5
 - Suero mezclado de pollo para A/Goose/Hong Kong/437-4/99
- Juego de Reactivos de la Influenza de la OMS (distribuidos anualmente)
 - Antígenos de referencia y antisueros de referencia para A(H1N1) y A(H3N2)
- Enzima destructora de receptores (RDE).
- Glóbulos rojos (pollo, pavo, humano tipo O, o de cobayo) en solución de Alsever.

Procedimiento

Se deben seguir los procedimientos estándar para cultivo celular en laboratorio para la propagación de los cultivos celulares, la inoculación de especímenes y la cosecha de células infectadas para IFA o cultivo de sobrenadantes para pruebas de HA y HI (Lennette & Schmidt, 1995; OMS, 2002²⁴), RT-PCR, o análisis de secuencia.

Se deben seguir los procedimientos estándar de HA y HI, incluyendo todos los controles recomendados. En el *Manual de la OMS sobre diagnóstico y vigilancia de la influenza en animales (WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance)*²⁵ se incluyen detalles específicos sobre estos procedimientos.

Interpretación de los resultados

La dilución más elevada de virus que causa hemaglutinación completa es el punto final de titulación de HA. La última dilución del antisuero que inhibe completamente la hemaglutinación es el punto final de HI. El título se expresa como el recíproco de la última dilución.

La identificación del aislado de campo se lleva a cabo comparando los resultados del aislado no conocido con aquellos del control de antígenos. Un aislado se identifica como un subtipo específico de influenza A si el título de HI específico para el subtipo es cuatro veces o más superior al título obtenido con el otro antisuero.

²⁴ <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>

²⁵ <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>

En el suero puede haber aglutininas no específicas que pueden resultar en reacciones falso-negativas; alternatively, algunos aislados pueden ser altamente sensibles a inhibidores no específicos en sueros, dando lugar a reacciones falso positivas.

3. Ensayo de inmunofluorescencia

El ensayo de inmunofluorescencia (IFA) puede utilizarse para la identificación de los virus de la influenza en cultivos celulares. Realizar IFA en cultivos celulares inoculados es preferible a analizar muestras clínicas ya que permite la amplificación de cualquier virus presente.

Materiales requeridos

Juego de Reactivos para la Influenza de la OMS para la Identificación del virus A(H5N1) de la influenza (versión 1997–98, 2003 o 2004). Los reactivos en este juego para ensayo de inmunofluorescencia incluyen:

- mezcla de anticuerpos monoclonales específicos para la influenza tipo A(H5)
 - mezclas de anticuerpos monoclonales específicos para la influenza tipo A y tipo B
 - anticuerpos monoclonales específicos para influenza A(H1) y un subtipo A(H3)
- Anti-ratón IgG conjugado con FITC
 - Portaobjetos para microscopio
 - Cubreobjetos, 24 x 60 mm
 - Medio de Montaje
 - Acetona
 - Microscopio para inmunofluorescencia

Procedimiento

Esta prueba debe realizarse de acuerdo con las instrucciones incluidas en el Juego de Reactivos para la Influenza de la OMS. Se lava el moco contaminante de las células epiteliales mediante centrifugado, se las fija y se las tiñe con anticuerpos monoclonales específicos. Las células epiteliales respiratorias infectadas de un espécimen clínico son muy inestables y se dañan fácilmente; por lo tanto, se las debe mantener frías con hielo durante el procesamiento y no centrifugarlas a más de 500g. Deben incluirse los portaobjetos de control con células infectadas con influenza A(H3) y A(H1) (y, cuando haya disponibilidad, células infectadas con H5) y células no infectadas, para permitir un control adecuado de los anticuerpos monoclonales y el conjugado y para asistir en la interpretación de la tinción específica.

Interpretación de los resultados

La tinción específica debe ser de una intensa fluorescencia de color verde manzana intracelular. Se puede observar fluorescencia nuclear y/o citoplasmática. Es importante asegurarse de que la densidad celular sea la adecuada. Una o más células que muestren fluorescencia intracelular específica pueden ser aceptadas como un resultado positivo.

Debido a que los anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles para subtipificación de la influenza A(H1) han demostrado reacción cruzada con los subtipos de la influenza A(H5), incluyendo las cepas 2004, se deben llevar a cabo pruebas de confirmación usando el anticuerpo monoclonal suministrado en el juego de la OMS.

Anexo B

Referencias

- Lennette EH, Schmidt NJ, eds (1979). *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th ed. Washington, DC, American Public Health Association.
- WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance.
<http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whodscsrncs20025rev.pdf>
- WHO (2004). WHO Laboratory Biosafety Manual - Third Edition,
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/
- WHO (2005). WHO global influenza preparedness plan, 2005.
http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/index.html
- WHO (2005). WHO guidelines for the storage and transport of human and animal specimens for laboratory diagnosis of suspected avian influenza A infection January 2005
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/transport/en/index.html
- WHO (2005). WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens suspected of containing avian influenza A virus January 2005
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/index.html
- WHO (2006). Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A(H5N1) virus infection. Guide for field operations October 2006
http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_CDS_EPR_ARO_2006_1/en/index.html
- WHO (2007). The role of National Influenza Centres (NICs) during interpandemic, pandemic alert and pandemic periods, Interim document, May 2007
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RoleNICsMay07/en/index.html
- WHO (2006). WHO case definitions for human infections with influenza A(H5N1) virus August, 2006
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/case_definition2006_08_29/en/index.html
- WHO (2007). WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1) January, 2007
http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_EPR_GIP_2006_4/en/index.html
- WHO (2007). WHO H5 Reference Laboratories:
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html
- WHO (2007). WHO National Influenza Centres
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>

Lectura adicional

- Fouchier RA et al. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene (Detección de los virus A de la influenza desde diferentes especies mediante amplificación de PCR de secuencias conservadas en el gen de la matriz). *Journal of Clinical Microbiology*, 38:4096–4101.
- Lee CW, Suarez DL (2004). Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus (Aplicación de RT-PCR en tiempo real para la cuantización y estudio de replicación competitiva del virus de la influenza aviar subtipo H5 y A7) . *Journal of Virological Methods*, 119:151–158.
- Nicholson KG, Wood JM, Zambon M (2003). Influenza (Influenza). *Lancet*, 362:1733–1745.
- Spackman et al. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes (Desarrollo de un ensayo de PCR por transcriptasa inversa a tiempo real para el virus de la influenza tipo A y los subtipos de hemagglutinina H5 y H7 aviar). *Journal of Clinical Microbiology*, 40:3256–3260.
- Wright KE et al. (1995). Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR (Tipificación y subtipificación de los virus de la influenza en muestras clínicas mediante PCR). *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1180–1184.
- Yuen KY et al. (1998). Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus (Características clínicas y diagnóstico viral rápido de enfermedad humana asociada con el virus A H5N1 de la influenza aviar). *Lancet*, 351:467–471.
- Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, Snowden BW, Tisdale M (2004). *Journal of Clinical Virology*, 29:179–88.

Anexo C

Grupo de trabajo técnico de la OMS sobre protocolos de PCR para la detección de infección por influenza causada por un nuevo virus en humanos (2006–2007)

Dr Ron Fouchier

Erasmus Medical Centre, National Influenza Centre,
P.O. Box 2040, 3000CA Rotterdam
The Netherlands

Professor Yi Guan

State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases
Department of Microbiology
The University of Hong Kong
Pokfulam
Hong Kong SAR
China

Dr Lance Jennings

Christchurch Hospital
Cnr Hagley Ave and Tuam Street
P.O. Box 151
Christchurch
New Zealand

Dr Wilina Lim

Virology Division
Centre for Health Protection
9/F Public Health Laboratory Centre
382 Nam Cheong Street
Shek Kip Mei
Kowloon
Hong Kong - SAR
China

Dr Stephen Lindstrom

Influenza Branch, G-16
DVFD, NCID
Centres for Disease Control and
Prevention (CDC)
1600 Clifton Road, NE
Atlanta, GA 30333
United States of America

Dr Takato Odagiri

National Institute of Infectious Diseases (NIID)
Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama,
208-0011 Tokyo
Japan

© World Health Organization 2007

Todos los derechos reservados.

Las denominaciones empleadas y la presentación de material en esta publicación no implica la expresión de opinión de ningún tipo por parte de la Organización Mundial de la Salud concerniente al estado legal de ningún país, territorio, ciudad o área o de sus autoridades, ni concerniente a la delimitación de sus fronteras o límites. Las líneas punteadas de los mapas representan líneas fronterizas aproximadas sobre las cuales puede no haber aún acuerdo total.

La mención de compañías específicas o de ciertos productos de fabricantes no implica que los mismos estén avalados o recomendados por la Organización Mundial de la Salud en preferencia sobre otros de naturaleza similar que no se mencionan. Con excepción de errores u omisiones, los nombres de productos patentados se distinguen con la primera letra en mayúsculas.

La OMS ha tomado todas las precauciones razonables para verificar la información contenida en esta publicación. Sin embargo, el material publicado se distribuye sin ningún tipo de garantía explícita o implícita. La responsabilidad de la interpretación y el uso del material recae sobre el lector. En ningún caso se podrá responsabilizar a la Organización Mundial de la Salud por daños ocasionados a partir de su uso.

