

Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio

Dra. Vivian Luchsinger

Programa de Virología, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile

Resumen

El virus influenza es causa frecuente de infección respiratoria. Pertenece a la familia *Orthomixoviridae*, existiendo tres géneros. Todos comparten características estructurales con un manto de lípidos y glicoproteínas hemaglutinina y neuraminidasa, que participan en la patogenicidad viral y determinando los diferentes subtipos de virus; en su interior una hebra de ácido ribonucleico de polaridad negativa. El presente artículo resume las principales características de laboratorio, clínicas y de diagnóstico de este emergente virus respiratorio.

Palabras Claves: Influenza, características, laboratorio, virología.

INTRODUCCIÓN

El virus influenza es causa frecuente de infección respiratoria en los distintos grupos etarios de la población humana en todo el mundo⁽¹⁻⁷⁾. Se asocia a enfermedad grave e incluso letal, en lactantes, ancianos, pacientes con enfermedades crónicas e inmunocomprometidos^(2,5,7). Este virus pertenece a la familia *Orthomixoviridae*, cuyo nombre deriva del griego *orthos*: derecho, y *myxo*: mucus. Existen tres géneros Influenza virus A, B y C; formados por los virus influenza A, B y C, respectivamente. Cada virus influenza se denomina internacionalmente indicando el género o tipo de virus (A, B, C); el nombre en inglés de la especie animal de la que se aisló (excepto si es de humano); el lugar del aislamiento; el número de caso del laboratorio; el año de su aislamiento, y, entre paréntesis, se escribe el subtipo de HA y NA. Por ejemplo: A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1)^(1,3,5,8).

Todos los virus influenza comparten características estructurales como el diámetro de 50 a 120 nm; la forma esférica; la presencia de una envoltura o manto y el tipo de genoma⁽¹⁾. El manto corresponde a una bicapa de lípidos derivados de la membrana celular, de la cual sobresalen alrededor de 500 espículas (Figura 1), conformadas por las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína matriz (M) y más al interior, está la nucleocápsula de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoprotéico que incluye el genoma viral. Este es una hebra de ácido ribonucleico (ARN), de polaridad negativa, formada por 12000 a 15000 nucleótidos y segmentada en 7 (influenza C) u 8 fragmentos (influenza A y B)^(1,3,4).

El genoma viral codifica para 9 proteínas. Las proteínas NS1 y NS2 no son estructurales, es decir, están ausentes en las partículas virales; sin embargo, se detectan en altas cantidades en las células infectadas. NS1 es inmunomodulador determinando diversos efectos como la inhibición del interferón de tipo I (IFN) en las células infectadas. Las proteínas PA, PB1 y PB2 interactúan con el genoma viral constituyendo el complejo nucleoprotéico y sintetizan nuevos ARN virales actuando como ARN polimerasa. La nucleoproteína (NP) se asocia a los segmentos del ARN viral y a las polimerasas, conformando la nucleocápsula helicoidal. La proteína M1 forma la matriz y, junto a NP, constituyen el antígeno profundo que permite clasificar los virus influenza en los 3 tipos: A, B y C. La hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son los antígenos de superficie del manto, participando en la patogenicidad viral y determinando los diferentes subtipos de virus. La hemaglutinina es la glicoproteína de superficie más abundante (80%); reconoce receptores específicos de la mucosa respiratoria, permitiendo la adsorción del virus a la célula

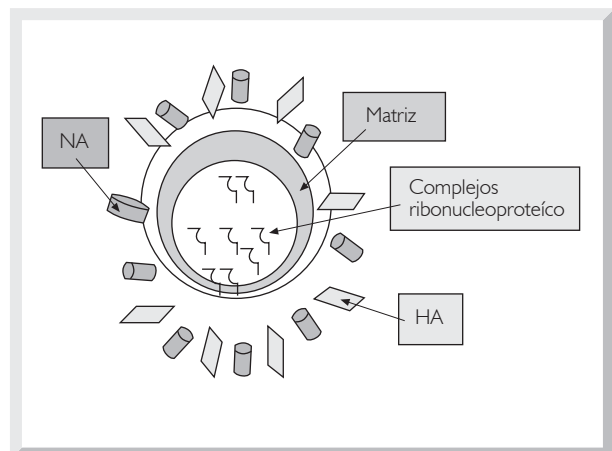


Figura 1. Esquema de una partícula de virus influenza

huésped (infectividad). En la naturaleza se han descrito variantes (H1 - H16), de las cuales sólo las H1, 2 y 3 afectan al ser humano. La neuraminidasa es una enzima capaz de romper la unión del ácido neurámico (siálico) a la proteína, facilitando la liberación viral; se han detectado 9 variantes de N, de las cuales sólo N1 y N2 infectan a las personas^(3,8).

Los diferentes subtipos de virus influenza se originan por los cambios en los antígenos de superficie H y/o N. Estas variaciones antigénicas ocurren por recombinaciones genéticas o por mutaciones puntuales, fenómenos frecuentes en estos virus debido a la fragmentación del ARN y a la baja fidelidad de la replicación viral. Esta enzima comete errores durante la síntesis de las nuevas hebras de ARN que no se corrigen por la ausencia de un sistema de reparación, por lo que los virus ARN tienden a tener 10.000 veces más mutaciones que los ADN, lo que en el caso de la HA del virus influenza A ocasiona cambios de 2 a 3 de sus 250 aminoácidos por año. Estos cambios puntuales (*drifts*) se acumulan geográficamente y temporalmente, disminuyendo la similitud antigénica entre las antiguas y las nuevas cepas circulantes, ocasionando brotes epidémicos aunque de menor cuantía. Por otra parte, la recombinación de genes puede generar cambios mayores (*shift*) en los antígenos H o N, creando un nuevo subtipo viral capaz de producir epidemias y pandemias. Este proceso ocurre entre cepas de virus influenza de diversas especies (humanos, aves marítimas y domésticas, cerdos, equinos, ballenas, focas) durante una doble infección. Es así como a partir de la coinfección del cerdo con cepas de aves y humanas, se han producido cepas recombinantes de Flu A. Como la inmunidad que inducen los virus Flu es subtipo específica, los anticuerpos que produce el hospedero están dirigidos contra los antígenos de superficie (H y N) del virus que la infecta, y sólo reaccionan en forma cruzada con cepas del mismo subtipo^(1,3,8).

Entre los virus influenza, la virulencia y variación antigénica del A son mayores que las de los tipos B y C, por lo que estas últimas no producen grandes epidemias. En cambio, desde su aislamiento en 1933, se han producido varias pandemias por distintas cepas de virus influenza A como H1swN1 en 1918-19; H2N2 en 1957; H3N2 en 1968 y H1N1 en 1977². En 1997 y 1999, en Hong Kong se detectaron dos brotes por cepas aviarias H5N1 y H9N2, que afortunadamente no se diseminaron; en la actualidad, se han informado casos de influenza aviar en Asia, Europa, África, Canadá y EE.UU. Gran alarma ha causado la detección de perros y gatos infectados. Si bien los virus influenza aviar generalmente no infectan a humanos, se han confirmado más de 100 casos desde 1997 en Asia y África, la mayoría de los cuales se han adquirido mediante el contacto directo con aves infectadas o superficies contaminadas y la mitad de los cuales ha fallecido. La potencial variación del virus podría determinar la diseminación entre personas, por lo que se ha establecido una estrecha vigilancia de casos humanos. En el 2001, se detectaron cepas H1N2 en Europa y recientemente en América, que no son particularmente agresivas⁽¹⁾.

El virus influenza A es capaz de producir enfermedad en humanos, equinos, porcinos, focas y aves. Los B y C sólo se

asocian a enfermedades humanas, aunque se ha detectado infección en algunos animales⁽²⁾. La infección se disemina por vía aérea en aerosoles o por contacto con manos u objetos contaminados (fomites). El período de incubación es corto (horas - 4 días). El virus llega a la mucosa del aparato respiratorio superior, vence la acción defensiva de cilios y mucus rompiendo los enlaces de ácido N-acetil-neuroamínico de éste mediante la neuraminidasa viral (antígeno N).

Otra proteína externa del virus, la HA, permite la adsorción viral a receptores celulares que contienen ácido siálico, siendo incorporado a la célula en una vesícula endoplasmática por endocitosis. La acidificación de la vesícula cambia la conformación de la HA e induce la fusión del manto viral con la membrana endocítica, liberando al citoplasma el complejo ARN - nucleoproteína (NP) - polimerasas (PA-PB1-PB2), el cual es transportado al núcleo. Allí se transcriben los 8 ARN mensajeros que originarán proteínas estructurales y no estructurales (NS1, NS2). Los nuevos viriones se ensamblan en la superficie celular y se liberan por yemación. En esta etapa, la neuraminidasa juega el papel fundamental de separar el ácido siálico de las glicoproteínas viral y celular, permitiendo la liberación del virus y evitando su aglutinación en la mucosa. En este proceso algunas células mueren por efecto del virus o de la respuesta inmune celular; otras permiten varios ciclos replicativos virales⁽¹⁾.

Como en todo agente infeccioso, el diagnóstico de infección por virus influenza, tanto con fines clínicos como epidemiológicos, se puede realizar mediante la detección del agente o de la respuesta inmune del hospedero. Las técnicas disponibles varían en sensibilidad y especificidad según el método, el laboratorio donde se realizan y el tipo de muestra utilizado. La búsqueda del agente se realiza en muestras de secreciones respiratorias y, si bien la muestra ideal depende de la técnica a utilizar, en general es de elección el aspirado nasofaríngeo en los niños y el lavado nasal en adultos, por la mayor concentración de virus que en ella se presenta^(1,3). Asimismo, el rendimiento de la detección viral es mayor si la muestra se obtiene en los primeros cuatro días de enfermedad y si su traslado al laboratorio se realiza en corto tiempo, en medio de transporte viral y en frío para preservar la partícula o el genoma viral.

La presencia del virus se puede establecer mediante el aislamiento viral, la detección de antígenos o del genoma viral. Para aislar el virus se utilizan huevos embrionados o cultivos celulares como las células de riñón de mono verde o de perro (MDCK). Los primeros se inoculan e incuban por 3- 4 días y los segundos se mantienen hasta 7 días a 33°C⁽⁷⁾. El efecto citopático - vacuolización y muerte celular- indicará replicación viral, confirmándose la presencia del virus mediante la detección de antígenos virales con anticuerpos monoclonales específicos, reacción que generalmente se visualiza por inmunofluorescencia. El aislamiento viral es la técnica de referencia, pero la demora en el resultado (5-10 días), la necesidad de disponer de personal entrenado y de equipamiento especial para trabajar con cultivos celulares dificultan su aplicación. Su principal ventaja es la posibilidad de determinar

el subtipo viral, identificando las cepas circulantes. Esta información es crucial para definir la composición de la vacuna y determinar la relación entre las cepas de ésta y las prevalentes. Se ha desarrollado una variante rápida del aislamiento viral - shell vial- en la cual se acelera la infección centrifugando la muestra con el cultivo celular, lo que permite detectar antígenos virales a los dos días⁽²⁾.

Para la detección de antígenos se utilizan anticuerpos específicos y un sistema de visualización de la reacción que puede ser una marca fluorescente (inmunofluorescencia) o una reacción enzimática (ensayo inmunoenzimático, ELISA). La primera se utiliza en múltiples centros hospitalarios, pues sólo requiere de microscopio de luz ultravioleta. El resultado se obtiene entre 2-4 horas, aunque esto varía según la disponibilidad del personal entrenado. La detección de antígenos rápida puede realizarse en menos de 30 minutos y se dispone de distintos sistemas comerciales, algunos de los cuales detectan sólo virus influenza A, otros A y B, e incluso unos pueden distinguir entre estos dos virus^(2,7). En general, se pueden aplicar a cualquier tipo de muestra respiratoria, no identifican subtipos virales y su mayor desventaja radica en la menor sensibilidad (70%) y especificidad (90%) respecto al aislamiento viral. Por esto, el resultado debe evaluarse en conjunto con la situación epidemiológica local, siendo necesario aplicar otra técnica que confirme o descarte un falso resultado negativo en un paciente con sospecha clínica durante una epidemia. Los falsos positivos son menos probables, debiendo considerarse esta posibilidad fuera del período epidémico^(1,2).

El genoma viral se puede detectar sintetizando el DNA complementario al ARN viral mediante la transcripción reversa y posteriormente amplificando un fragmento a través de la reacción en cadena de la polimerasa. El resultado se obtiene en 2-4 horas, es la técnica de mayor sensibilidad⁽⁸⁾ y de alta especificidad (superior al 95%), pero sólo se realiza en ciertos laboratorios por la necesidad de equipos especiales y de personal entrenado, que garantice un resultado confiable porque la elevada sensibilidad del método puede ocasionar falsos positivos por contaminación de la muestra^(1,2).

La detección de anticuerpos séricos requiere de dos muestras, una en la fase aguda de la enfermedad y la otra en el período convaleciente, con un mínimo de 3 semanas de diferencia, con el fin de detectar el aumento del título de anticuerpos por sobre 4 veces. No es de utilidad clínica, pero es útil en estudios de seroprevalencia como diagnóstico retrospectivo. Se realiza en pocos laboratorios y la técnica más sensible es la inhibición de la hemaglutinación^(1,2). Durante el período de epidemia, el diagnóstico de infección por virus influenza puede realizarse sobre la base del cuadro clínico sugerente (fiebre, mialgias, cefalea, odinofagia, tos). Sin embargo, como los síntomas no son exclusivos de esta enfermedad, en ocasiones es necesario recurrir a técnicas de laboratorio, cuyo resultado -como en todo examen- debe evaluarse en conjunto con la sintomatología del paciente.

La existencia del virus influenza se conoce desde hace largo tiempo y, sin embargo, sigue ofreciendo interesantes desafíos a nivel médico y científico, debido especialmente a su gran

variabilidad, siendo necesario vigilar en forma constante y a nivel mundial las cepas circulantes y sus características patogénicas.

REFERENCIAS

1. Knez V. Familia Orthomixoviridae. En: Virología Médica, Carballal G, Oubiña J. Ed. El Ateneo, 3ª edición, Buenos Aires, Argentina: 157- 180.
2. Dwyer D, Smith D, Catton M, Barr I. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. MJA 2006; 185: S48-S53.
3. García- García J, Ramos C. La influenza, un problema vigente de salud pública. Salud Pública Mex 2006; 48: 244-67.
4. Graeme W, Bischofberger N, Webster R. Disarming flu viruses. Scientific American, marzo 1999.
5. <http://www.CDC.gov> revisado el 03 de septiembre 2008.
6. Jansen A, Sanders E, Hoes A, van Loon A, Hak E. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated mortality and hospitalizations. Eur Respir J 2007; 30: 1158-1166.
7. Lee B, Robinson J, Khurana V, Pang X, Preiksaitis J, Fox J. Enhanced identification of viral and atypical bacterial pathogens in lower respiratory tract samples with nucleic acid amplification tests. J Med Virol 2006; 78: 702-710.
8. Lynch J, Walsh E. Influenza: Evolving Strategies in Treatment and Prevention. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 144-58.
9. van Elden L, Nijhuis M, Schuipper P, Schuurman R, van Loon A. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real- time Quantitative PCR. J Clin Microbiol 2001; 39: 196-200.