
ARTICULO ORIGINAL

*Desempeño de la prueba de inmunofluorescencia directa en el diagnóstico del virus Influenza A(H1N1)**

Direct immunofluorescence assay performance in diagnosis of the Influenza A(H1N1) virus

**Drs.: Luis Pianciola¹, Gladys González², Melina Mazzeo¹, Mariano Navello¹, Natalia Quidel¹,
María Fernanda Bulgheroni²**

Resumen

El 25 de abril de 2009, a menos de un mes de la detección en México del primer humano con virus Influenza A(H1N1), la enfermedad ya se había propagado a más de 40 países superando los 10 000 casos notificados. Dada su naturaleza impredecible, este tipo de virus requiere métodos diagnósticos apropiados, confiables y seguros, pero que también estén al alcance de los laboratorios clínicos. Mediante el estudio de 291 muestras de pacientes con sospecha de infección por virus Influenza A(H1N1) en Neuquén, Argentina, el presente trabajo compara los dos métodos de diagnóstico utilizados simultáneamente: la prueba de inmunofluorescencia directa (DFA) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). La DFA dio una sensibilidad de 44,4%, especificidad de 99,6%, valor predictivo positivo de 95,2% y valor predictivo negativo de 90,7%. Los resultados positivos de la metodología pueden considerarse verdaderos positivos. Un resultado negativo no excluye la presencia del virus y la muestra debe examinarse mediante RT-PCR. Del total de 291 muestras, 45 resultaron positivas por RT-PCR y 21 por DFA.

Palabras claves:

Rev Soc Bol Ped 2010; 49 (2): 85-8: Técnica del anticuerpo fluorescente directa; pruebas de sensibilidad microbiana; reacción en cadena de la polimerasa; sensibilidad y especificidad; subtipo H1N1 del virus de la influenza A; Argentina.

Abstract

By 25 April 2009, less than one month after the first human with Influenza A(H1N1) virus was detected in Mexico, the disease had already spread to more than 40 countries, with over 10 000 cases reported. Due to its unpredictability, this type of virus requires appropriate, reliable, and safe diagnostic methods that are also accessible to clinical laboratories. Through the analysis of 291 samples taken from patients with suspected Influenza A(H1N1) virus infection in Neuquén, Argentina, this study compares the two diagnostic methods used simultaneously: direct immunofluorescence assay (DFA) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). DFA had a sensitivity of 44.4%, a specificity of 99.6%, a positive predictive value of 95.2%, and a negative predictive value of 90.7%. Positive results obtained with this method can be considered true positives. A negative result does not rule out the presence of the virus. In this case, the sample should be examined by RT-PCR. Out of a total of 291 samples, there were 45 positive results with RT-PCR and 21 positive results with DFA.

Key words:

Rev Soc Bol Ped 2010; 49 (2): 85-8: Fluorescent antibody technique, direct; microbial sensitivity tests; polymerase chain reaction; sensitivity and specificity; influenza A virus, H1N1 subtype; Argentina.

1 Subsecretaría de Salud de Neuquén, Argentina. La correspondencia debe dirigirse a Luis Pianciola, Subsecretaría de Salud de Neuquén, Laboratorio central. Gregorio Martínez no. 65, Neuquén 8300, Argentina. Correo electrónico: luispianciola@yahoo.com.ar
2 Microbiología, Hospital Horacio Heller. Neuquén, Argentina.

Introducción

El 25 de abril de 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció la emergencia de un nuevo virus de influenza A que estaba traspasando fronteras. A menos de un mes de la detección en México del primer humano infectado, el luego denominado virus *Influenza A(H1N1)* ya se había diseminado a más de 40 países superando los 10 000 casos notificados⁽¹⁾. El 11 de junio siguiente la OMS elevó el nivel de alerta a fase 6 de pandemia y aconsejó el uso del diagnóstico molecular como método para la detección del virus *Influenza A(H1N1)*, especialmente las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés)⁽²⁾.

No hay dudas de que las pruebas de diagnóstico molecular ofrecen ventajas significativas, en particular porque son más sensibles y específicas, y tienen un alto valor predictivo, tanto positivo como negativo. Lamentablemente, su aplicación requiere equipos costosos y niveles de capacitación que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos de los países en desarrollo.

En este contexto, una de las opciones de solución más relevantes son los métodos de diagnóstico rápido, en particular las pruebas de inmunofluorescencia directa (DFA, por sus siglas en inglés), porque son más sensibles que otros métodos de detección rápida de antígenos virales⁽³⁾. Aun cuando también requieren equipo especial y personal capacitado, las DFA están actualmente disponibles en muchos más laboratorios de Argentina. Además, registran una alta especificidad y el tiempo total de procesamiento oscila entre dos y tres horas. Todas estas características convierten a estas pruebas en alternativas de elección para el diagnóstico de influenza, especialmente en situaciones de epidemia o de pandemia⁽⁴⁾.

No obstante estas cualidades favorables de la metodología de inmunofluorescencia directa, su sensibilidad y especificidad con respecto al virus *Influenza A(H1N1)* son todavía desconocidas. El presente

trabajo se propone precisamente comparar el método de DFA con el de RT-PCR recomendado por la OMS para el diagnóstico de infección por este nuevo virus.

En el análisis se incluyen 291 del total de 293 muestras tomadas entre el 14 de julio y el 14 de agosto de 2009 de pacientes ingresados en instituciones públicas y privadas de la provincia de Neuquén, Argentina. Las muestras fueron procesadas simultáneamente por DFA y RT-PCR y los casos cumplían con la definición de “sospechoso de influenza” emanada del Ministerio de Salud, que incluye a toda persona que presente enfermedad respiratoria aguda febril (>38 °C), con tos y/o dolor de garganta, mialgias y/o postración, en ausencia de otras causas. El promedio de edad de la muestra fue de 23,2 años, con una amplitud de 9 días a 98 años y 57,4% de los pacientes fueron de sexo masculino.

Las muestras fueron obtenidas a través de hisopado nasofaríngeo, utilizando hisopos Eurotubo-Deltalab (España), las cuales fueron colocadas en el medio de transporte viral suministrado por el fabricante del equipo y refrigerados hasta su procesamiento dentro de las 24 horas. Los especímenes fueron homogeneizados en vortex con 1 ml de buffer fosfato salino pH 7,2 (PBS, por sus siglas en inglés) estéril y, posteriormente, divididos en dos alícuotas para análisis por PCR y DFA. Para el diagnóstico por DFA se utilizó el equipo *Respiratory Panel 1 Direct Immunofluorescence Assay* (Light Diagnostic, Millipore, Livingston, Reino Unido), mientras que para el método molecular se realizó la extracción de ácido ribonucleico (ARN) sobre la otra alícuota, utilizando el equipo *QIAamp Viral RNA Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). El método de RT-PCR utilizado fue el recomendado por la OMS, basado en el protocolo de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos)⁽²⁾.

Este método utiliza cuatro juegos de iniciadores y sondas: “InfA”, que amplifica una región conservada del gen de la proteína M de todos los virus de influenza A; “Sw InfA”, diseñado para detectar

específicamente una secuencia del gen de la nucleoproteína de todos los virus de influenza de origen porcino; “Sw H1”, diseñado para detectar específicamente un segmento del gen de la hemaglutinina (subtipo H1) de los virus porcinos, y “RnasaP”, que amplifica específicamente una secuencia de un gen de origen humano. Los reactivos utilizados fueron Influenza A(H1N1) Primer and Probe Set (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y Super Script III Platinum One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos). Los resultados fueron considerados positivos cuando se observó una curva característica con un ciclo umbral (*cycle threshold*) de 40 ó inferior. Una muestra se confirmó como positiva para el virus H1N1 si las 4 secuencias estudiadas —InfA, Sw InfA, Sw H1 y RnasaP— fueron positivas, y como negativa, si las tres primeras lo fueron mientras que la última fue positiva.

Se consideraron en total 291 muestras analizadas durante el período de estudio y que cumplieron la condición de haber sido procesadas a través de ambas metodologías. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando SPSS versión 12.0 (nivel de significación $P < 0,05$). En el cuadro 1 se presentan los resultados de ambas pruebas. Con base en estos datos, el método DFA tiene una sensibilidad de 44,4% (intervalo de confianza de 95% [IC95%], 5,7), especificidad de 99,6% (IC95%, 0,7), valor predictivo positivo de 95,2% (IC95%, 2,5) y valor predictivo negativo de 90,7% (IC95%, 3,3).

El dato sobre los días de evolución de la sintomatología al momento de la toma de la muestra fue conocido en aproximadamente 50% de las muestras. La sensibilidad de DFA respecto a RT-PCR fue del 58,3% (7/12) en las muestras tomadas antes de los tres días de la aparición de los síntomas, y del 57,1% (4/7) para las tomadas con posterioridad ($P = 0,96$). Cabe destacar que no se encontraron resultados positivos con ninguna de las dos metodologías en los pacientes con siete o más días de evolución de su cuadro clínico al momento de la toma de la muestra.

Conclusiones

Es sabido que las probabilidades de controlar cualquier brote de infección por un nuevo virus de influenza dependen, entre otros factores, de la mayor o menor disponibilidad de medios diagnósticos de desempeño adecuado^(4,5). Gran parte de los métodos de diagnóstico rápido de influenza han sido diseñados para detectar virus estacionales, como virus *Influenza* A(H1N1 y H3N2) y B. Los informes sobre su calidad diagnóstica varían según los diferentes estudios, con tasas de sensibilidad que oscilan entre 10% y 93%. Las tasas de especificidad son altas en la mayoría de los trabajos, frecuentemente mayores de 90%^(1,3,5,6).

CUADRO 1. Resultados de las pruebas de inmunofluorescencia directa (DFA) y de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), aplicadas al diagnóstico del virus H1N1 en muestras nasofaríngeas, Neuquén, Argentina, 2009

	RT-PCR positiva	RT-PCR negativa
DFA positiva	20	1
DFA negativa	25	245

Fuente: elaborado por los autores.

Si bien en general pocos métodos de diagnóstico han sido evaluados frente a un panel amplio de subtipos de virus Influenza A, en el caso particular del subtipo H1N1 los informes sobre el desempeño de los distintos métodos no solamente son escasos sino que además muchos de ellos revelan resultados contradictorios^(1,3,5). Las muestras del estudio fueron obtenidas después del período de máxima circulación del virus *Influenza* A(H1N1) en la Región, cuando la prevalencia de muestras positivas había descendido a un promedio de 15,5%, después de haber superado 70% durante el pico epidémico.

En estas condiciones, la sensibilidad de DFA fue baja (44,4%), inferior a las informadas en Argentina sobre metodologías similares de detección del virus estacional fuera del período pandémico⁽⁶⁾. La sensibilidad

de DFA parece no variar según los días de evolución de los síntomas, aunque el escaso número de datos no permite ofrecer una valoración adecuada acerca de este parámetro. Por otro lado, aun cuando el valor predictivo negativo encontrado (90,4%) parece ser adecuado para aplicar la metodología a la situación pandémica estudiada, se debe tener en cuenta que tal resultado tiene relación con la baja prevalencia de la enfermedad en el período de estudio. En condiciones de mayor prevalencia, como las encontradas en el pico de la epidemia, este valor predictivo descendería sustancialmente. De esta manera se puede concluir que los métodos DFA no son adecuados para descartar una infección por el virus *Influenza A(H1N1)*, por lo que su utilización debe realizarse con una cuidadosa interpretación de los resultados, teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica.

Los resultados positivos de DFA en cambio sí pueden considerarse verdaderos positivos, dada su alta especificidad y valor predictivo en estos casos. De acuerdo a lo observado tanto en Argentina como en otros países, este resultado puede relacionarse con la presencia del virus *Influenza A(H1N1)*. Esto es así ya que si bien el método no diferencia los distintos subtipos del virus Influenza A, en condiciones de pandemia más de 90% de virus A circulantes son del nuevo subtipo H1N1. En el caso de un resultado negativo, como se dijo, no es posible excluir la presencia del virus y la muestra debe examinarse con las metodologías recomendadas por la OMS.

Es posible que la utilización de muestras distintas a las usadas en el presente trabajo cambie

en algo los resultados. En este muestreo solo se utilizaron hisopados nasofaríngeos, siguiendo las guías del Ministerio de Salud argentino que desalentaron al comienzo de la pandemia otras muestras, como los aspirados, por generar más aerosoles y ser potencialmente más riesgosas para el operador.

Referencias

1. Hurt AC, Baas C, Deng Y, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A (H1N1) influenza virus. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3:171–6.
2. World Health Organization. CDC protocol of real time RT-PCR for swine influenza A (H1N1). Hallado en: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtime_ptpcr/en/index.html. Acceso el 16 de junio de 2010.
3. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in the diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*. 2006;194(2 suppl):S98–110.
4. Pollock NR, Duong S, Cheng A, Han LL, Smole S, Kirby JE. Ruling out novel H1N1 influenza virus infection with direct fluorescent antigen test. *Clin Infect Dis*. 2009;49:e66–8.
5. Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol*. 2009;45:191–5.
6. Savy VL, Baumeister EG, Campos AM, Pontoriero A. Comparison of 2 techniques for the laboratory diagnosis of influenza virus infections. *Rev Argent Microbiol*. 2000;32:144–8.