PROTOCOLO USO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA EL LA NUEVA GRIPE PANDEMICA A (H1N1)

Agosto 2009

(Versión 1. Recomendaciones provisionales sujetas a actualización según se disponga de nueva información científica)

Consejo Interterritorial
SISTEMA NACIONAL DE SALUD

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL

Comité Asesor para el uso de pruebas diagnósticas para la nueva gripe A (H1N1).

- **Dr. José María Eiros Bouza**
  Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
- **Dra. Isabel García Bermejo**
  Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
- **Dr. José Luís Pérez Sáez**
  Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
- **Dr. Alberto Malvar Pinto**
  Sociedad Española de Epidemiología
- **Dr. Francisco González**
  Sociedad Española de Epidemiología
- **Dra. Amparo Torrecilla**
  Asociación Española de Vacunología

Revisores:

- **Dr. Rafael Cantón Moreno**
  Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal
- **Dr. Ángel Hernández Merino**
  Pediatra. Centro de Salud la Rivota (Madrid)
- **Dr. Manuel L. Fernández Guerrero**
  Jefe de Servicio de Medicina Interna Fundación Jiménez Díaz
- **Juan Carlos Sanz**
  Laboratorio de Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid

Agradecimiento:

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)

INDICE

I INTRODUCCIÓN 4

II OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS 6

1. Tipos de muestras 6

2. Toma de muestra 6

3. Conservación y transporte 7

4. Condiciones de bioseguridad 7

III DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES (PRUEBAS RÁPIDAS) 8

IV TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 10

V CULTIVO VIRAL 12

VI DETECCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL ESPECÍFICA 13

I Introducción

En las dos últimas décadas, el diagnóstico virológico de la gripe en nuestro país se ha realizado, en los denominados Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica (tres de los cuales son Centros de Referencia de la OMS) y en los Laboratorios de Microbiología Asociados a la Red, que generalmente se encuentran en los centros hospitalarios. La dotación y finalidades de estos laboratorios han condicionado, en gran parte, su actividad dirigida tanto a caracterizar las cepas circulantes como a dar soporte diagnóstico a las redes asistenciales de nuestro sistema sanitario.

Es oportuno señalar que, en la actual situación, las recomendaciones a efectuar sobre el diagnóstico de la nueva gripe pandémica A (H1N1) 2009 están sujetas a las siguientes premisas:

a) la actividad gripal es dinámica y cambiante y obligará a modificar este documento.

b) la dotación diagnóstica debe ser adecuada a la demanda asistencial.

Debe resaltarse el hecho de que todos los virus respiratorios pueden estar implicados en la mayor parte de los cuadros de infección respiratoria, y que en sus comienzos suelen ocasionar síntomas bastante inespecíficos. Por ello, la realización de un diagnóstico etiológico puede ser importante, pudiendo estar éste encaminado al tratamiento específico del paciente con el antiviral adecuado, a la toma de las medidas oportunas de aislamiento, o a la obtención de información epidemiológica que permita establecer la incidencia de un determinado virus en los diferentes procesos de infección respiratoria, en función de la edad de los pacientes o de las variaciones observadas en su distribución geográfica y estacional.

Desde un punto de vista conceptual este diagnóstico puede adoptar una doble estrategia: **una**, la que se fundamenta en métodos directos, como son los capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular, y los que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y de ácidos nucleicos). **Otra** estrategia es el diagnóstico indirecto, que valora la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

El objetivo de este documento es reflejar algunas recomendaciones que puedan servir como guía para los profesionales sanitarios cuya actividad se desarrolla, fundamentalmente, en la asistencia clínica.

II Obtención, conservación y transporte de las muestras

Un diagnóstico correcto se basa en obtener la muestra más adecuada. El requisito principal de la muestra es contener el mayor número posible de células epiteliales, por ser las células en las que, fundamentalmente, se replica el virus.

1. Tipos de muestras

Con mejor rendimiento diagnóstico

- frotis de nasofaringe
- lavado o aspirado nasofaríngeo

Menor rendimiento diagnóstico

- frotis nasal
- frotis faríngeo

Si se efectúan los dos simultáneamente se obtiene un rendimiento mayor.

Muestras inadecuadas

- moco
- saliva

2. Toma de muestra

2.1 Frotis nasal, faríngeo y nasofaríngeo

- Utilizar una torunda flexible. Se recomienda el empleo de torundas especiales con un polímero con alta capacidad de absorción y con medio de transporte incluido. Es importante señalar que no deben utilizarse torundas de alginato y/o con soporte de madera.
- Se recomienda proveerse de sistemas especiales para virus (medio de transporte de virus). La utilización de medios de transporte convencionales para bacterias se considera una opción subóptima.
- Introducir la torunda en la cavidad pertinente y rotarla dos o tres veces.
- Dejar la torunda dentro de la cavidad por un tiempo no inferior a 5 segundos, para asegurar una absorción óptima. Agitar la torunda en el interior del líquido (medio estabilizador) para conseguir una buena dispersión del exudado obtenido.

- Romper la torunda por una muesca al efecto, o cortarla con tijeras, desechar la parte superior en un contenedor para residuos biológicos, manteniendo la parte inferior (torunda) dentro del líquido (medio de transporte). Cerrar bien el tubo al finalizar la operación.
- Si no se realiza toma nasofaríngea, es pertinente realizar toma nasal y faríngea e introducir ambas torundas en un mismo medio de transporte.
- Es obligado identificar correctamente la muestra y remitirla, sin demora, al laboratorio, junto con la solicitud de realización de la prueba diagnóstica.
- Introducir la muestra y la solicitud en los contenedores normalizados para el transporte.

2.2 Aspirado nasofaríngeo

Utilizar los recipientes y dispositivos existentes al efecto.

3. Conservación y transporte

- Períodos no superiores a 48-72 horas: refrigeradas a 4º C. El transporte también será refrigerado (acumuladores de frío).
- Períodos superiores: congeladas, preferiblemente a -70º C. Se recomienda mantener la congelación durante el transporte.

4. Condiciones de bioseguridad

- Para el transporte y la manipulación de las muestras, se deben seguir las recomendaciones específicas de un nivel de bioseguridad 2

.

III Detección de antígenos virales (Pruebas rápidas)

- **Componente del virus que detecta:**

Antígenos virales, generalmente moléculas que se encuentran en la superficie del virus (hemaglutinina y neuraminidasa). Las pruebas comerciales detectan los virus tipo A y B por separado, o conjuntamente.

- **Tipo de ensayo:**

Generalmente, inmunocromatográfia capilar y enzimoinmunoanálisis de membrana.

- **Tiempo de realización:**

15-20 minutos.

- **Sensibilidad de la prueba: es variable, dependiendo de varios factores:**

a) fabricante, no todas los sistemas son comparables.

b) tipo de muestra obtenida y su calidad (para esta técnica la muestra más idónea es el aspirado nasofaríngeo).

c) si detecta los tipos A y B, puede variar para cada uno de ellos.

d) la experiencia de cada laboratorio, dependiendo de los pacientes muestreados, la época del año en que se realiza, etc. En épocas de epidemia estas pruebas alcanzan su mayor sensibilidad y valor predictivo positivo

En la dirección electrónica que se facilita al final de este documento puede encontrarse la sensibilidad y especificad de las pruebas comerciales existentes en el mercado para el diagnóstico del virus de la gripe A (H1N1) estacional. Para el nuevo virus de la gripe A (H1N1) no se conocen los datos respecto a la sensibilidad de estos ensayos; algunos datos previos apuntan a que no superaría el 50%, especialmente en pacientes con síntomas leves o moderados.

- **Especificidad de la prueba**. También es variable, dependiendo de:

a) La calidad del antígeno utilizado.

b) la experiencia del operador

- **Ventajas:**

a) Puede realizarse de forma individual, útil como prueba de urgencia.

b) Alta especificidad:

En las actuales circunstancias epidemiológicas (pandemia; julio de 2009) la detección positiva de virus influenza A tiene una elevada probabilidad de que se trate del nuevo virus A (H1N1), aunque deba ser confirmado con posterioridad.

- La positividad para virus influenza B descarta razonablemente una infección por virus A (H1N1)

- **Inconvenientes:**

a) Sensibilidad baja. En el caso de la nueva gripe A (H1N1), se considera que no son útiles como prueba de cribado. Un resultado negativo no excluye la presencia de un cuadro clínico de gripe.

b) Los ensayos existentes no diferencian entre la gripe A (H1N1) estacional y la nueva gripe por el virus A (H1N1), por lo que toda positividad debe ser confirmada.

- **¿Cuándo utilizarlas?:**

Dada su baja sensibilidad, no se recomienda su uso generalizado.

Pueden emplearse en la confirmación urgente de casos de alto riesgo, pero se deben conocer bien sus limitaciones. Un resultado negativo no excluye la presencia de un cuadro clínico de gripe.

IV Técnicas de amplificación genómica basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- **Componente del virus que detecta:**

Ácidos nucleicos.

- **Tipo de ensayo:**

El más recomendable es la PCR a tiempo real, asegurándose que el ensayo comercial es capaz de detectar el nuevo virus de la gripe A (N1H1).

- **Tiempo de realización:**

3-4 horas.

- **Sensibilidad de la prueba:**

No está suficientemente evaluada, y depende de varios factores:

a) Del sistema de extracción del material genético del virus a partir de la muestra

b) de la propia técnica: no todas las técnicas de PCR son equivalentes

c) de la experiencia de cada laboratorio.

d) de la muestra a evaluar: tipo de paciente, situación epidémica, etc.

e) del patrón de referencia. Algunos datos preliminares sugieren que podría incrementar en un 20-30% los resultados de positividad respecto al cultivo celular.

- **Especificidad de la prueba:**

Igualmente, no está evaluada adecuadamente, y depende también del tipo de muestra y de la experiencia de cada laboratorio; en la actual situación epidémica, y en un laboratorio de Microbiología experimentado, puede asumirse que superará el 98%.

- **Ventajas:**

a) Sensible y específica.

b) Rápida, aunque debe tenerse en cuenta que esta rapidez, en la práctica, dependerá de la disponibilidad de equipos humanos organizados y bien entrenados y del volumen de muestras a procesar.

c) Algunas variantes técnicas permitirían la cuantificación de la carga vírica.

- **Inconvenientes:**

a) Requiere equipamiento específico.

b) Requiere de la existencia y disponibilidad de microbiólogos bien entrenados.

c) Detecta genoma viral, pero no informa si exista viabilidad del virus, por lo que no se recomienda para monitorizar tratamientos, ni evaluar la respuesta clínica.

- **¿Cuándo utilizarla? Puede ser utilizada como prueba diagnóstica básica si:**

a) La técnica utilizada es capaz de detectar el nuevo virus A (H1N1).

b) Existe una organización interna que permita obtener resultados rápidos, sin demoras externas a la técnica.

V Cultivo viral

- **Componente del virus que detecta**:

Partículas víricas viables.

- **Tipo de ensayo**:

Cultivo en líneas celulares primarias tipo Madin-Darby (MDCK). Otras líneas celulares pueden soportar el crecimiento, pero su eficiencia es menor. La experiencia con el virus de la nueva gripe A (H1N1) es corta.

- **Tiempo de realización**:

El nuevo virus de la gripe A (H1N1) crece en 24-48 horas.

- **Sensibilidad de la prueba**:

Depende del tipo de paciente y de la obtención de una buena muestra. Datos preliminares sugieren que, en casos graves, en los que se supone una elevada carga vírica, la sensibilidad es cercana al 100%. En casos menos graves, se apunta que la sensibilidad podría no superar el 70% tomando como referencia los métodos moleculares más sensibles.

- **Especificidad de la prueba**:

Por definición, el aislamiento en cultivo denota la presencia de virus de la gripe en la muestra. En las actuales circunstancias epidemiológicas (julio 2009), si se utilizan métodos de tipificación del cultivo, y se detecta virus A, la probabilidad de que se trate del nuevo virus A (H1N1) es cercana al 100%.

- **Ventajas**:

Permite secuenciar y tipificar el virus, realizar estudios de sensibilidad a los antivirales. Detecta la presencia de virus viables, aunque no está demostrada la utilidad de esta prueba para la monitorización de la respuesta clínica.

- **Inconvenientes**.

Tiempo de obtención de resultados superior a 24 horas. La sensibilidad podría ser insuficiente en casos leves o moderados.

VI Detección de la respuesta inmunitaria humoral específica

- **Componente del virus que detecta:**

Anticuerpos frente a la hemaglutinina del virus en el suero de un paciente.

- **Tipo de ensayo:**

Serológico.

- **Tiempo de realización:**

Requiere, al menos, una jornada laboral. **Limitaciones**:

a) Escasa utilidad real en la práctica clínica, y también en la actual situación epidemiológica.

b) Necesidad de evaluar muestras de sueros en pares, obtenidas con 14 días de diferencia (diagnóstico retrospectivo).

c) No distingue el tipo de virus infectante, salvo que se trate de pruebas específicas sólo al alcance de centros especializados.

- **Utilidad:**

Permite realizar estudios epidemiológicos. En análisis retrospectivos, permite establecer un diagnóstico clínico en ausencia de las muestras que permitan el aislamiento viral o la detección de sus antígenos o ácidos nucleicos.

Información complementaria sobre el diagnóstico de los virus respiratorios, disponible en la dirección de la ***Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*** http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/