

Evaluación preliminar de un inmunoensayo óptico en la detección del virus influenza A en aspirados nasofaríngeos

Sr. Director. La gripe es una infección causada por los virus influenza A y B (IA e IB) que se presenta como brotes epidémicos en los meses invernales. Este hecho epidemiológico favorece el diagnóstico clínico de esta infección. Sin embargo es preciso realizar un diagnóstico etiológico de seguridad al inicio de una nueva temporada epidémica, así como a lo largo de la misma para establecer la prevalencia y aparición de nuevas cepas o subtipos no incluidos en las vacunas recomendadas. Así mismo la aparición de los inhibidores de la neuraminidasa requieren de un diagnóstico rápido y específico de la infección gripal^{1,2}.

La técnica de referencia para el diagnóstico de seguridad de la gripe es el aislamiento vírico; éste puede realizarse por inoculación en huevos embrionados o mediante cultivo celular (convencional o tipo *shellvial*)^{3,4}. Estas técnicas presentan sin embargo un importante inconveniente y es su lentitud y laboriosidad, precisando entre dos y siete días para la obtención del resultado final. Debido a ello se han desarrollado técnicas rápidas basadas en la detección de antígenos o actividades fisiológicas víricas. La inmunofluorescencia es una técnica de elevada sensibilidad y especificidad pero precisa de un número mínimo de células en la muestra³⁻⁶. Los sistemas de enzoinmunoensayo (ELISA) han aportado una elevada sensibilidad, especificidad, rapidez diagnóstica y sencillez técnica. La mayoría de ellos se realizan sobre un soporte sólido (membrana) y se basan en una reacción enzimática³⁻⁶.

El objetivo de este estudio es realizar una evaluación preliminar de un nuevo inmunoensayo óptico (IO) en la detección del virus IA en aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos (edad inferior a dos años).

El estudio se ha realizado con 30 muestras (aspirados nasofaríngeos) consideradas previamente como positivas para el virus IA (por cultivo celular *Shell-vial* en la línea MDCK) y conservadas a -70°C. Con estas muestras se ha comparado la eficacia del sistema de IO (FluOIA, BioStar Inc.) frente al sistema ELISA rutinario tipo *dot-blot* (Directigen FluA, Becton & Dickinson) en la detección del virus IA, así como, de nuevo, frente al cultivo celular (*shell-vial* MDCK) considerado como técnica de referencia.

El sistema IO se basa en la extracción previa del antígeno vírico (nucleoproteína) y posterior fijación a un soporte sólido de silicona. La adición del anticuerpo frente a este antígeno determina la formación de inmuno-complejos que determinan un cambio en la densidad óptica de la superficie del soporte, de modo que el cambio de grosor de la misma modifica el índice de refracción y la observación visual de un cambio de color (púrpura). En todo momento se han seguido estrictamente las instrucciones del fabricante tanto en la realización del sistema de IO como del ELISA *dot-blot*.

De las 30 muestras, de nuevo positivas por el cultivo celular, el sistema ELISA *dot-blot* ha detectado como tales 26 (86,6%) frente a las 11 (36,6%) detectadas por el sistema de IO ($p < 0,05$). Al comparar el sistema de IO con el ELISA *dot-blot* se ha obtenido para el IO una sensibilidad del 34,6%, especificidad del 50%, valor predictivo positivo del 81,8% y valor predictivo negativo del 10,5%. En 17 muestras de ELISA *dot-blot* fue positivo y el sistema de IO negativo; y en sólo dos muestras el ELISA *dot-blot* fue negativo y el sistema de IO positivo. En dos muestras ambas técnicas fueron negativas a pesar del cultivo repetido positivo de las mismas.

El sistema de IO ha mostrado una sensibilidad excesivamente baja (36,6%) como para utilizarlo de una forma rutinaria, al menos por lo comprobado en este estudio preliminar. En el estudio de Covalciuc et al⁷ se comunica para el sistema de IO una sensibilidad media del 80% que oscila entre el 62% y el 88% dependiendo del tipo de muestra. En el caso de los aspiradores nasofaríngeos la sensibilidad y especificidad fue el 83% y 76% respectivamente. Por otro lado, en el reciente estudio de Hindiyeh et al⁸ la sensibilidad media del método de IO fue del 52%, descendiendo al 25% en los frotis faríngeos, resultado incluso peor que el obtenido en nuestro estudio. Parece evidente la distinta eficacia del sistema de IO en función del tipo de muestra y el modo de conservación y transporte de las mismas. Es posible que la congelación previa de las muestras pueda haber interferido en el proceso de extracción antigénica, aunque se ha comparado con otro sistema ELISA que también extrae el mismo antígeno vírico (nucleoproteína). También, y según la empresa responsable del sistema de IO, el empleo de escobillones de alginato de calcio o de algodón pueden interferir en el resultado final.

El sistema de IO presentaba una gran ventaja sobre el sistema ELISA

dot-blot utilizado por nosotros (sólo detecta el virus influenza A) y es la capacidad para detectar simultáneamente los virus influenza A y B, aunque da un resultado único no distinguiendo entre ellos. Recientemente se ha comercializado un ELISA *dot-blot* de la misma empresa (Directigen Flu A+B) con capacidad para detectar y diferenciar ambos virus gripales. Por otro lado el sistema de IO precisa de un mayor tiempo total en la realización de las pruebas, presentando dos periodos de incubación de seis minutos y un tiempo total recomendado de quince minutos por muestra (frente a los cinco minutos del ELISA *dot-blot*). Así mismo la lectura ha sido en algunas ocasiones dificultosa dado que depende de la incidencia de la luz sobre la superficie de reacción.

En resumen en este estudio preliminar realizado sobre aspirados nasofaríngeos previamente positivos y mantenidos congelados, el sistema de IO no ha mostrado una eficacia suficiente para ser recomendado como de utilización rutinaria, sin embargo sería necesario realizar estudios más amplios y sobre muestras frescas para poder establecer una conclusión definitiva.

Jordi Reina, Xavier Mesquida
y Mabel Galmes

Unidad de Virología. Servicio de
Microbiología Clínica.
Hospital Universitario Son Dureta. Palma
de Mallorca.

Bibliografía

- Centers for Diseases Control. Prevention and control of influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization practices. MMWR 200; 49(RR3): 1-38.
- Calfee DP, Hayden FG. New approaches to influenza chemotherapy. Neuraminidase inhibitors. Drugs 1998; 56: 537-553.
- Wallace LA, McAulay KA, Douglas JDM, Elder AG, Stott DJ, Carman WF. Influenza diagnosis: from dark isolation into the molecular light. J Infect 1999; 39: 221-226.
- Johnston SLG, Siegel CS. A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture and conventional cell culture for the rapid detection of influenza A and B. Diagn Microbiol Infect Dis 1991; 14: 131-134.
- Reina J, Munar M, Blanco I. Evaluation of a direct immunofluorescence assay, dot-blot enzyme immunoassay, and shell vial culture in the diagnosis of lower respiratory tract infections caused by Influenza A virus. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25: 143-145.
- Reina J, Saurina J, Fernández-Baca V, Munar M. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay and two cell lines in the detection of Influenza B virus in nasopharyngeal samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 532-534.

7. Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (Flu OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3.971-3.974.
8. Hindiyed M, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, et al. Evaluation of BioStr Flu OIA assay for rapid detection of Influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2000; 17: 119-126.