

TÉCNICAS Y AVANCES DIAGNÓSTICOS EN LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS DE ORIGEN VIRAL

Carla López Causapé
Servicio de Microbiología HUSE



IMPORTANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS DE ORIGEN VIRAL

- Las Infecciones Respiratorias Agudas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el ser humano.
- Etiología condicionada por:
 - Edad
 - Medioambiente / ámbito asistencial
 - Enfermedad de base
- En pediatría extrahospitalaria...
 - 70% IRA → 50% etiología viral
- En pacientes de edad adulta...
 - Edad avanzada
 - Inmunodeficiencia grave
 - Enfermedad pulmonar subyacente



ETIOLOGÍA VIRAL DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	TIPOS Y SUBTIPOS
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	Virus de la gripe A	H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H7N3, H9N2
	<i>Influenzavirus B</i>	Virus de la gripe B	
	<i>Influenzavirus C</i>	Virus de la gripe C	
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	<i>Parainfluenza 1 y 3</i>	
	<i>Rubulavirus</i>	<i>Parainfluenza 2 y 4</i>	VPI-4 A, VPI-4 B
	<i>Metapneumovirus</i>	<i>Metapneumovirus humano</i>	
	<i>Pneumovirus</i>	<i>Virus respiratorio sincitial</i>	VRS-A, VRS-B
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus</i>	Varios (> 75)
		<i>Rhinovirus</i>	Varios (>130)
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	229E, OC43, NL63, HKU1, SARS, MERS	
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Adenovirus</i>	Varios (>100)
<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocavirus</i>	<i>Bocavirus humano</i>	Varios (4)

ETIOLOGÍA VIRAL DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

Virus	Catarro común	Faringitis	Traqueobronquitis	Neumonía
Virus respiratorio sincitial	+	+	+	-
Virus parainfluenza 1	+	+	+	-
Virus parainfluenza 2	+	+	+	-
Virus parainfluenza 3	+	+	+	-
Virus parainfluenza 4	+	+	+	-
Metapneumovirus humano	+	+	+	-
Virus influenza A	+	2+	3+	2+
Virus influenza B	+	2+	2+	+
Rinovirus	4+	2+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+
Adenovirus	+	+	+	+

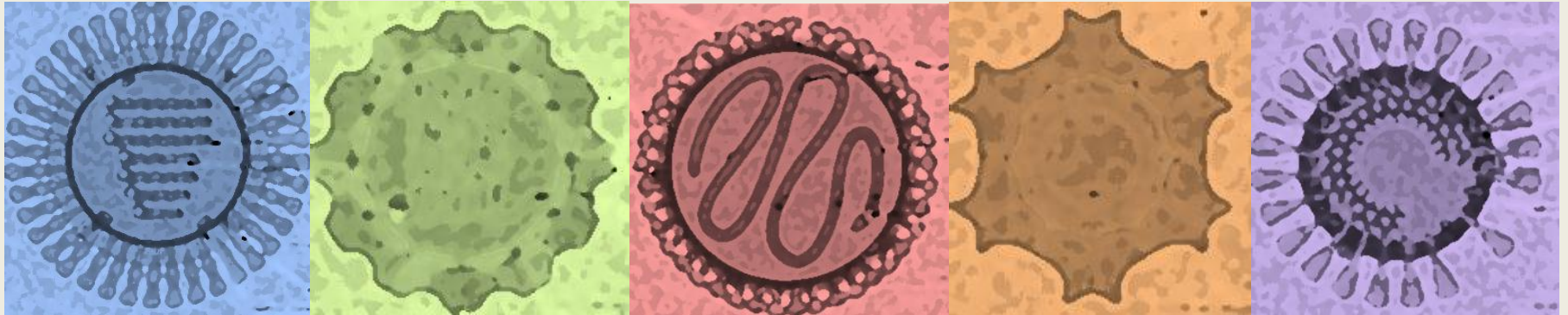
Virus	Catarro común	Faringitis	Laringotraqueobronquitis (crup)	Neumonía	Bronquiolitis
Virus respiratorio sincitial	3+	2+	2+	4+	4+
Virus parainfluenza 1	3+	2+	4+	2+	2+
Virus parainfluenza 2	2+	+	+	+	+
Virus parainfluenza 3	3+	2+	2+	3+	3+
Virus parainfluenza 4	2+	+	+	+	+
Metapneumovirus humano	2+	2+	+	+	3+
Virus influenza A	2+	2+	2+	3+	3+
Virus influenza B	2+	2+	+	+	+
Rinovirus	2+	2+	+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+	+
Adenovirus	3+	2+	+	+	+
Bocavirus humano	2+	2+	+	2+	3+

Tablas. Etiología viral de los síndromes respiratorios más frecuentemente documentados en adultos (arriba) y niños (abajo).

Símbolos: + (caso aislado), 2+(pequeña proporción), 3+ (proporción considerable), 4+ (mayoría casos). De: J.M. Eiros et al. EIMC2009

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO VIRAL

- Tratamiento específico con el antiviral adecuado
- Toma de medidas oportunas de aislamiento
- Obtención de información epidemiológica



CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO VIRAL

MÉTODOS INDIRECTOS

- Detección de anticuerpos específicos (serología)

MÉTODOS DIRECTOS

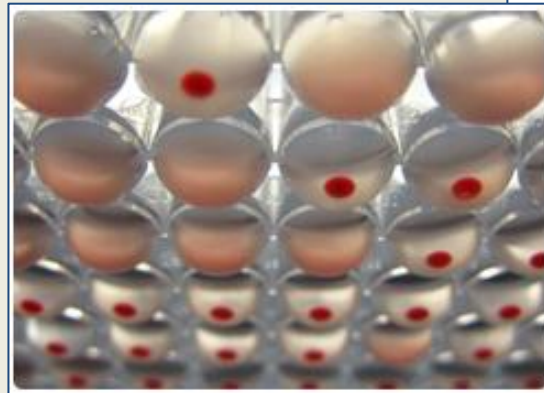
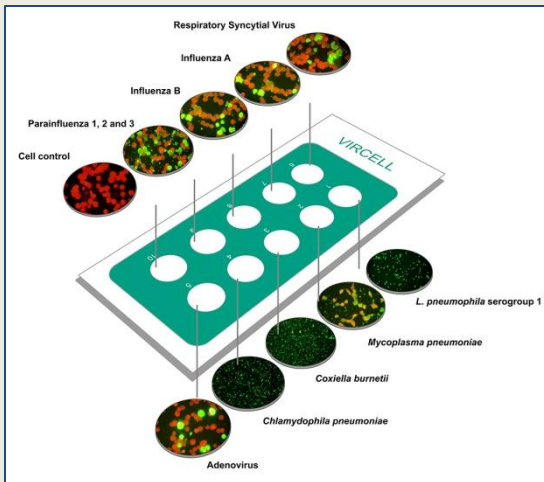
- Cultivos celulares
- Detección de antígenos
- Detección de ácidos nucleicos

OTROS MÉTODOS

- Visualización directa (microscopía electrónica), histología o citología

MÉTODOS INDIRECTOS: SEROLOGÍA

- Fijación del complemento (FC)
- Inhibición de la hemaglutinación (HAI)
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- Ensayos de neutralización (Nt)



ENSAYOS SEROLÓGICOS: VENTAJAS, DESVENTAJAS Y DISPONIBILIDAD

ENSAYO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	DISPONIBLES
FC	<ul style="list-style-type: none"> • Tipificación 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja sensibilidad y reproducibilidad ▪ Laborioso 	<i>Adenovirus</i> <i>VRS</i> <i>Parainfluenza</i> <i>Influenza</i>
HAI	<ul style="list-style-type: none"> • Tipificación • Subtipificación 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baja sensibilidad y reproducibilidad ▪ Falsos positivos ▪ Realización e interpretación compleja y subjetiva ▪ Aplicable a virus con capacidad hemaglutinante 	<i>Adenovirus</i> <i>Parainfluenza</i> <i>Influenza</i>
IFI	<ul style="list-style-type: none"> • Rápidez • Sencillez 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reacciones cruzadas 	<i>Adenovirus</i> <i>VRS</i> <i>Influenza</i> <i>Coronavirus</i>
Nt	<ul style="list-style-type: none"> • Títulos de Ac fiables 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicable a virus capaces de crecer en CC 	<i>Adenovirus</i> <i>VRS</i> <i>Parainfluenza</i> <i>Influenza</i> <i>Rhinovirus</i>

FC: Fijación del complemento; HAI: Inhibición de la hemaglutinación; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; Nt: Ensayos de neutralización

SEROLOGÍA: INCONVENIENTES

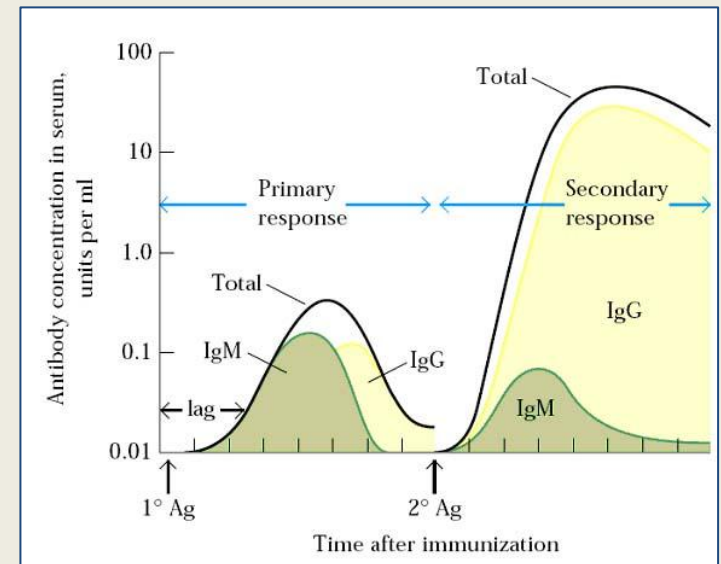
- Inherentes a las técnicas serológicas

- Seroconversión IgG (sueros pareados)
- Detección IgM (período ventana)

- Escasa respuesta inmunológica

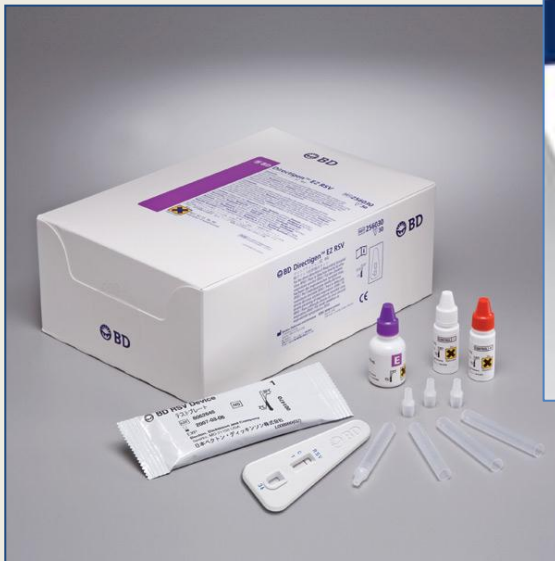
- Exposición previa
- Sistema inmune debilitado

- Elevado número de tipos y subtipos



MÉTODOS DIRECTOS: DETECCIÓN ANTIGÉNICA

- ELISA
- Inmunocromatografía
- Inmunofluorescencia



DETECCIÓN RÁPIDA ANTIGÉNICA. MÉTODOS COMERCIALES DISPONIBLES

NOMBRE COMERCIAL	COMPAÑÍA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Directigen Flu A+B ®	BD	A: 96% B: 88%	A: 99% B: 97%
FLU OIA A/B ®	Biostar	80-95%	60-70%
XPECT FLU A&B ®	Remel	A: 89-100% B: 93-100%	A: 100% B: 100%
NOW Influenza A&B ®	Binax	A: 100% B: 92-100%	A: 92-93% B: 94-99%
QuickVue Influenza A+B Test ®	Quidel	A: 72-77% B: 73-82%	A: 96-99% B: 96-99%
SAS FluAlert ®	SA Scientific	65-84%	95-99%
ZstatFlu ®	Zyme Tx	65-96%	77-98%
ClearView Exact Influenza A&B ®	Inverness	A: 81,7% B: 88,6%	A: 98% B: 97%

DETECCIÓN RÁPIDA ANTIGÉNICA. VENTAJAS E INCONVENIENTES

VENTAJAS

- Resultados tempranos (30')
 - Medidas profilácticas
 - Prevención diseminación
 - Administración antibióticos
- Aplicable en...
 - Virus no viables
 - Virus crecimiento lento
- Fácil realización

INCONVENIENTES

- Baja sensibilidad
- Especificidad dependiente calidad de la muestra
- Disponibilidad Ac monoclonales
- Variabilidad y deriva antigénica

MÉTODOS DIRECTOS: CC CLÁSICO

- **1948** Weller y Enders demuestran que el virus de la poliomielitis (tipo 2) podía replicarse en cultivo de tejidos de origen no nervioso de embriones humanos.

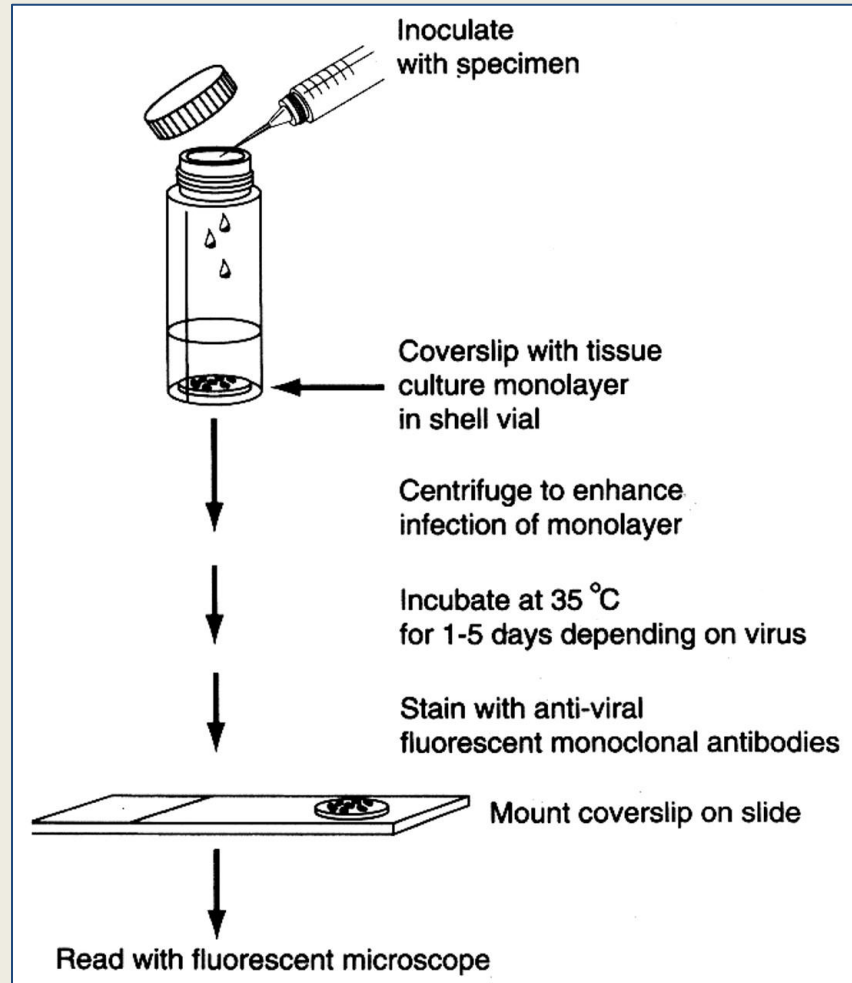


10-21 días

CULTIVO CELULAR: LÍNEAS CELULARES

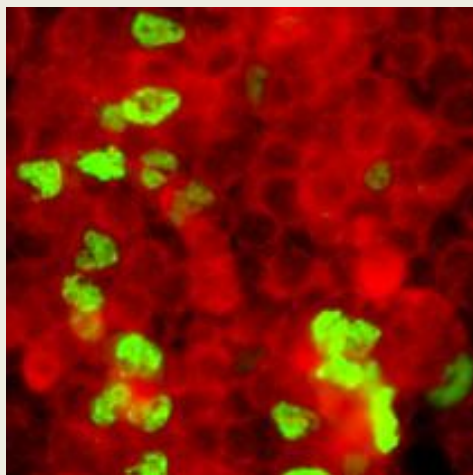
VIRUS RESPIRATORIO	LÍNEA CELULAR	OBSERVACIÓN EFECTO CITOPÁTICO
<i>Influenza</i>	MDCK	4-7 días
<i>Parainfluenza</i>	LLC-MK2 Vero	6-12 días
VRS	Hep-2 MRC-5	4-7 días
<i>Metapneumovirus</i>	LLC-MK2 Vero Hep-2	4-7 días
<i>Adenovirus</i>	Hep-2 HeLa	5-10 días
<i>Enterovirus</i>	MRC5 Hep-2	5-10 días
<i>Rhinovirus</i>	MRC5 HeLa	6-12 días

MÉTODOS DIRECTOS: CC EN SHELL VIAL

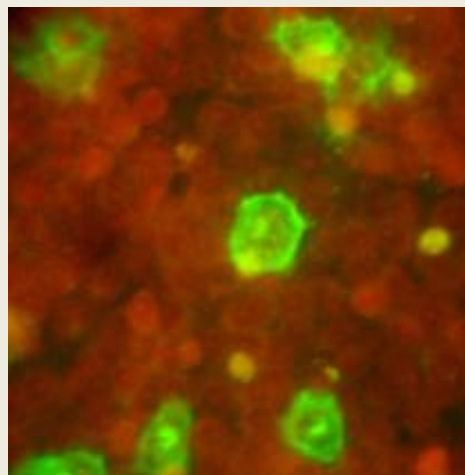


CC EN SHELL VIAL: INMUNOFLUORESCENCIA

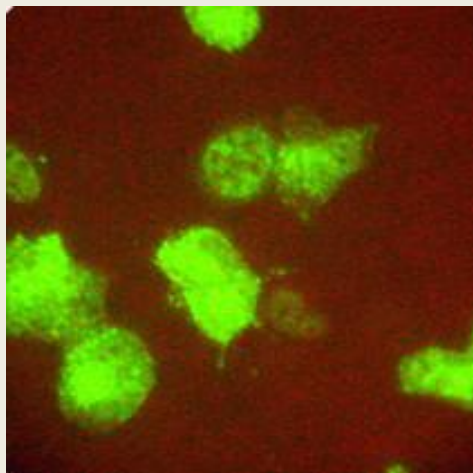
Adenovirus



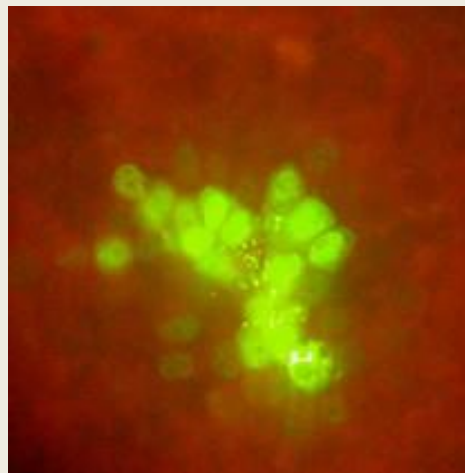
VRS



*Influenza A
H1N1*



Influenza B



CC CLÁSICO vs CC EN SHELL VIAL

	CC CLÁSICO	CC SHELL VIAL
Sensibilidad	+	+++
Especificidad	+	+++
Tiempo respuesta	+	+++
Coste	+++	+++
Manejabilidad	+	++
Simultaneidad	+++	+
Interpretabilidad	+	+++

CULTIVO CELULAR

VENTAJAS E INCONVENIENTES

VENTAJAS

- Confirmación viabilidad /infectividad
- Obtención de virus viables
 - Caracterización cepas circulantes
 - Detección nuevos virus
 - Detección nuevos serotipos
 - Estudios fenotípicos sensibilidad

CULTIVO CELULAR

VENTAJAS E INCONVENIENTES

INCONVENIENTES

- Virus no viables, de crecimiento lento o que no producen un efecto citopático evidente.
- Sensibilidad variable (muestra)
 - Recogida
 - Transporte
 - Conservación
- Elevado coste: elevado número de LC
- Necesidad equipo y personal cualificado

MÉTODOS DIRECTOS: DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

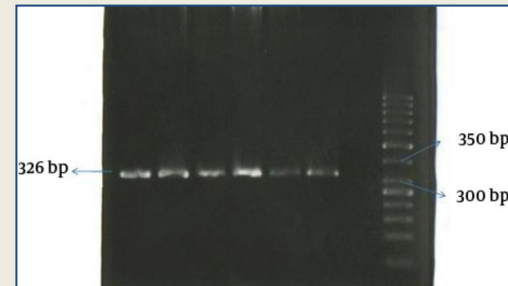
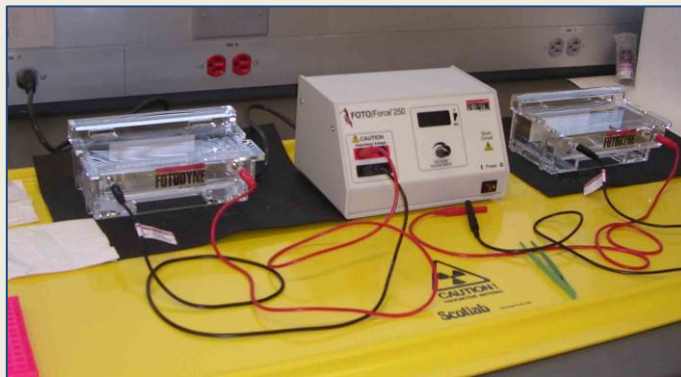


Figura: Electroforesis gel agarosa PCR simple de VRS.

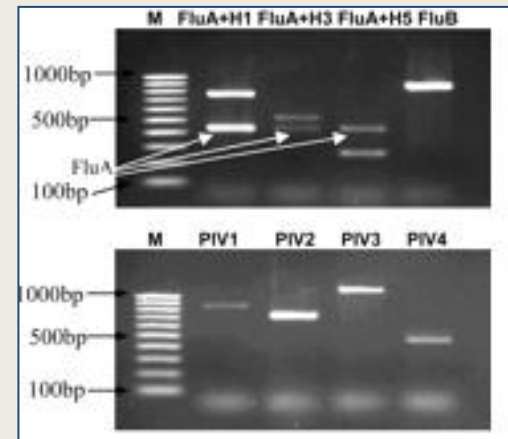


Figura: Electroforesis gel agarosa PCR múltiple

REAL TIME - PCR MULTIPLEX

xTAG RVP FAST®
Abbott



Anyplex II RV16®
Seegene



XTAG RVP FAST [®] vs ANYPLEX RV16 [®]

xTAG RVP FAST [®] Abbott

VIRUS DETECTABLES	
<i>Influenza A</i>	VRS
<i>Influenza A H1</i>	<i>Metapneumovirus</i>
<i>Influenza A H3</i>	<i>Adenovirus</i>
<i>Influenza B</i>	<i>Entero-Rhinovirus</i>
<i>Parainfluenza 1</i>	<i>Coronavirus NL63</i>
<i>Parainfluenza 2</i>	<i>Coronavirus HKU1</i>
<i>Parainfluenza 3</i>	<i>Coronavirus 229E</i>
<i>Parainfluenza 4</i>	<i>Coronavirus OC43</i>
	<i>Bocavirus</i>

Anyplex II RV16 [®] Seegene

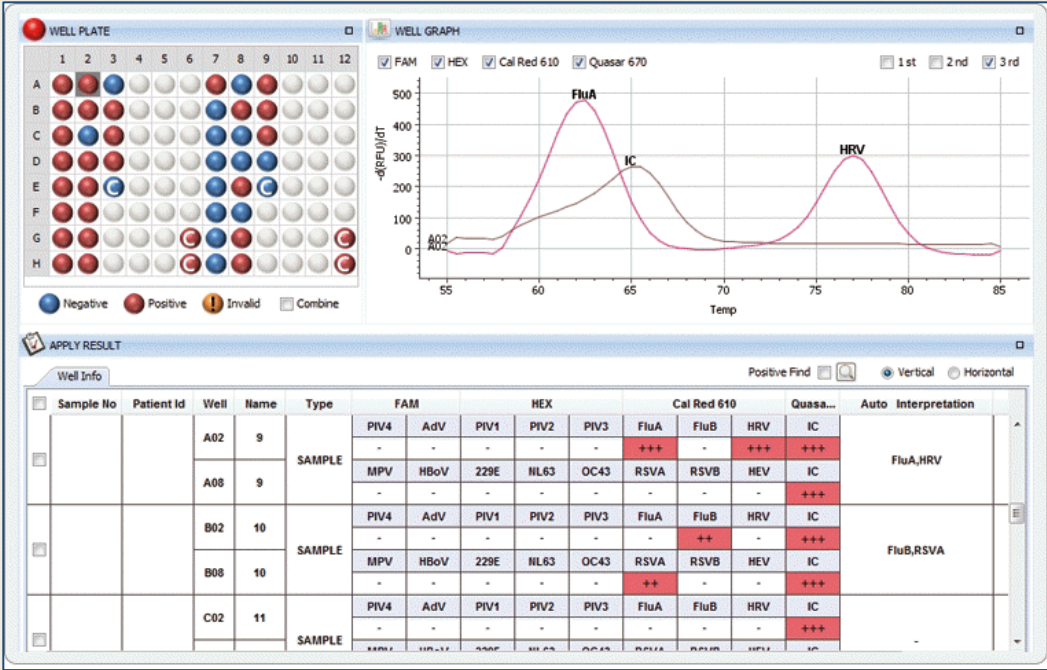
VIRUS DETECTABLES	
<i>Influenza A</i>	VRS - A
<i>Influenza B</i>	VRS - B
<i>Parainfluenza 1</i>	<i>Metapneumovirus</i>
<i>Parainfluenza 2</i>	<i>Enterovirus</i>
<i>Parainfluenza 3</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>Parainfluenza 4</i>	<i>Coronavirus NL63</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Coronavirus 229E</i>
<i>Bocavirus</i>	<i>Coronavirus OC43</i>

XTAG RVP FAST [®] vs ANYPLEX RV16 [®]

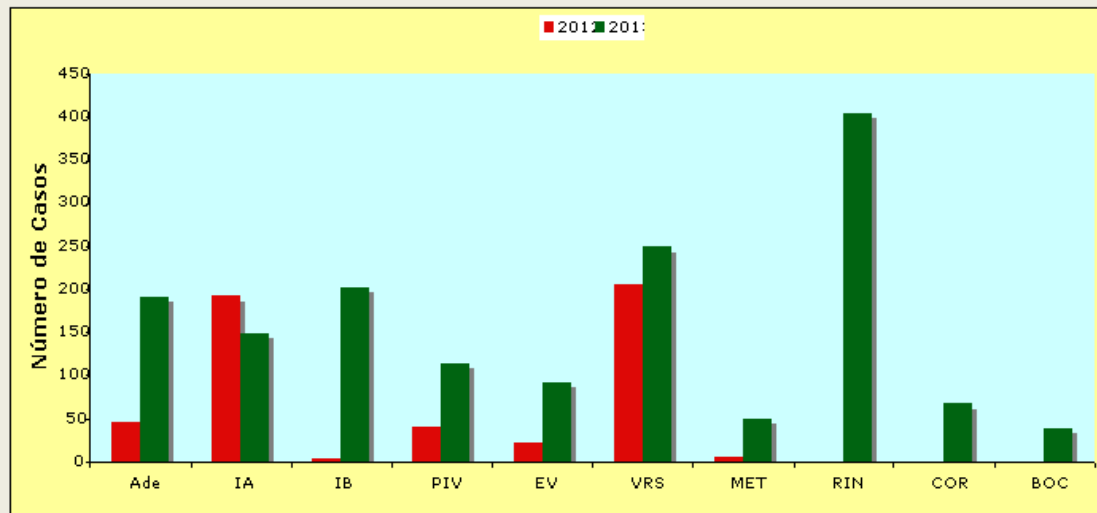
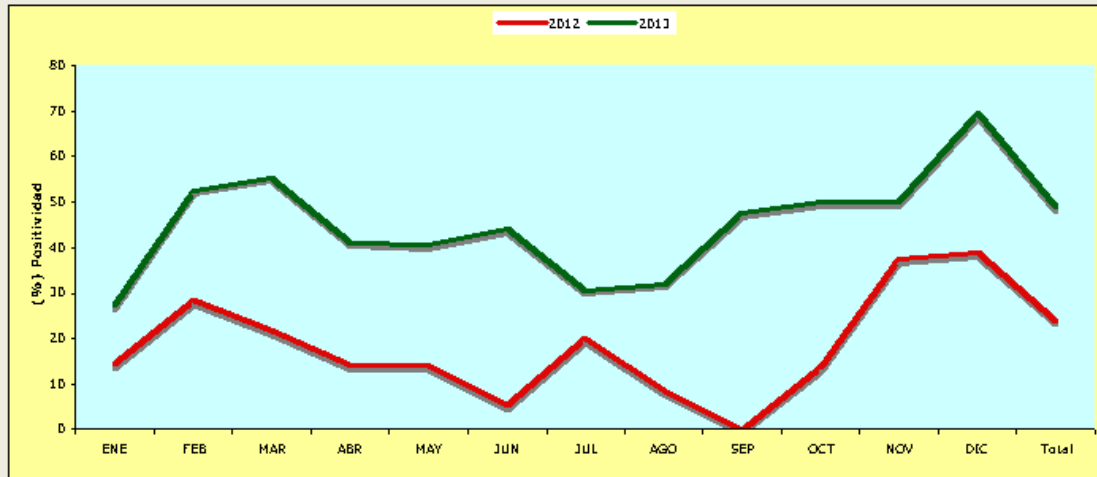
DIANA	RV16		xTAG	
	S(%)	E(%)	S(%)	E(%)
INF A	100	100	96,6	100
INF B	97,1	100	94,1	100
VRS A-B	100	99,8	84,2	100
PI 1-4	97,9	98,6	83	99,8
AdV	100	100	79,5	100
RhV/EV	89,4	99,5	97,9	100
hMPV	88	100	96	100
CoV OC43 /HKU1	100	100	26,1	100
CoV NL63 / 229E	100	99,8	79,5	100

De: Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG Respiratory Viral Panel and Seeplex RV15 for Detection of Respiratory Viruses. Hyun-Ki Kim et al. JCM2013

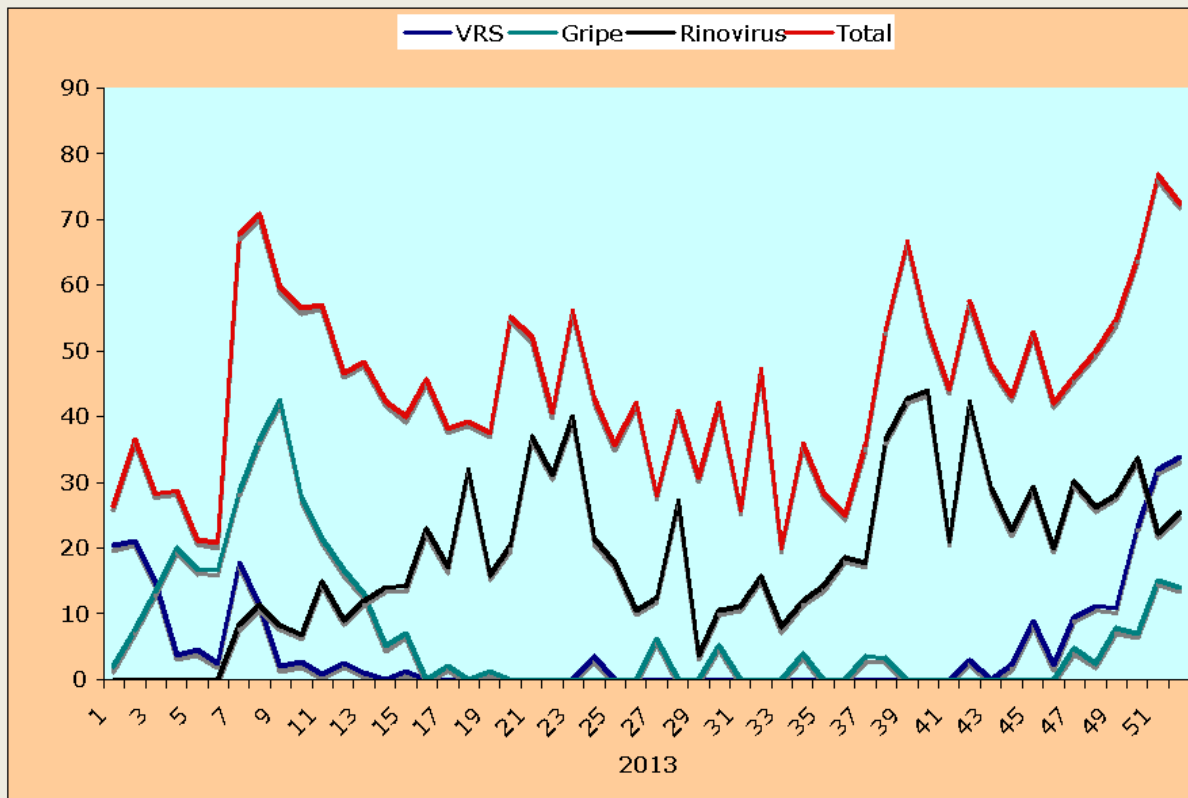
HUSE: ANYPLEX RV16 ® (SEEGENE)



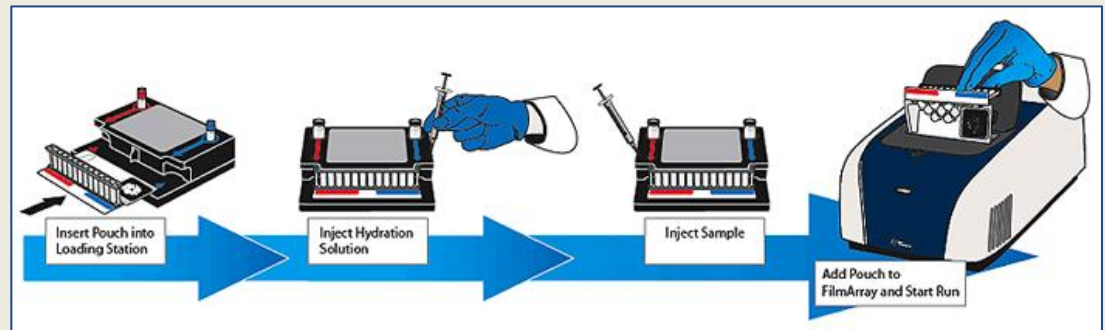
HUSE: IMPACTO RT-PCR



HUSE: IMPACTO PCR



ARRAYS



- Detección de gran número de virus respiratorios
- Tipado y subtipado virus *Influenza A*

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

VENTAJAS E INCONVENIENTES

VENTAJAS

- Técnicas rápidas
- Elevada sensibilidad
- Elevada especificidad
- Mayor rendimiento diagnóstico
- Secuenciación productos PCR
 - Genotipado
 - Sensibilidad

INCONVENIENTES

- ¿Infectividad virus?
- ¿Co-detecciones?
- ¿Estado portador?

¡Gracias por vuestra atención!