

COMUNICACIONES BREVES

**EVALUACION DE UN METODO INMUNOHISTOQUIMICO PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA FIEBRE AMARILLA**

Orlando Ricaurte, Ladys Sarmiento*, María Leonor Caldas*, Gerzain Rodríguez***

La confirmación diagnóstica de casos fatales de fiebre amarilla (FA) es esencial en los programas de vigilancia epidemiológica de la entidad, en regiones endémicas. Se evaluó un método inmunohistoquímico para la detección de antígeno viral de FA en cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina. Aplicamos el procedimiento a 59 casos, con criterios clínico-patológicos y epidemiológicos de FA, dos de ellos con aislamiento viral, ocurridos en Colombia entre 1934 y 1992, incluyendo casos típicos y tardíos. La sensibilidad del método fue del 98,30% : 58 casos fueron positivos mientras que un caso con importantes cambios de autólisis fue negativo. Por otra parte, se seleccionaron 10 hígados con patologías diferentes, incluyendo 4 con hepatitis fulminante por coinfección de virus de la hepatitis B y delta, ninguno de los cuales mostró inmunorreactividad (especificidad: 100%). Estos resultados indican que este método es un recurso útil para la confirmación del diagnóstico histopatológico de la FA.

INTRODUCCION

El Grupo de Patología del INS es el centro nacional de referencia para el diagnóstico de la fiebre amarilla (FA). Desde 1934 cuando el programa de viscerotomía comenzó en Colombia (1,2), el diagnóstico histopatológico ha jugado un papel importante en el programa de vigilancia epidemiológica de la enfermedad (2,3), pues en cerca del 90 % de los casos los cambios morfológicos en el hígado tales como la necrosis acidofílica de distribución mediozonal, la necrosis salpicada pericentral y periportal, la esteatosis microvacuolar y la mínima o ausente inflamación son característicos de la FA (4-9), particular-

mente en las muestras de hígado obtenidas 5 a 7 días después del inicio de la enfermedad (5,6,8). Sin embargo, los casos de FA atípicos, bien sea por evolución muy aguda hacia la muerte, en 3 a 4 días, con necrosis acidofílica muy extensa y cambio graso vacuolar no muy severo o los casos tardíos, con muerte luego de 10 días de enfermedad, son difíciles de diagnosticar (5,8,9).

Además, en algunas regiones del país la FA coexiste con hepatitis fulminante por coinfección de virus de la hepatitis B y delta (10-12) y algunos de estos casos comparten aspectos morfológicos con la FA (13,14).

* Grupo de Patología Instituto Nacional de Salud.

** Jefe, Grupo de Patología, Instituto Nacional de Salud. Profesor titular de cátedra, Depto. de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional.

Recientemente se han desarrollado diferentes métodos para detectar antígeno viral de FA en muestras de tejido incluidas en parafina utilizando técnicas de inmunofluorescencia (15,16), inmunoenzimáticas (17,18) y métodos para detectar RNA del virus de FA mediante hibridización de ácidos nucleicos (19).

En octubre de 1990, la OPS organizó un taller sobre diagnóstico de FA y dengue en el Instituto Evandro Chagas, Belém-Pará (Brasil) y distribuyó un estuche para diagnóstico inmunohistoquímico de la FA. Describimos los resultados obtenidos utilizando el método propuesto en esa oportunidad, aplicándolo a muestras de hígado de nuestro archivo, los cuales indican que el método es de gran sensibilidad y especificidad.

MATERIALES Y METODOS

1. Muestras de hígado con fiebre amarilla:

Se seleccionaron 59 casos de hígados de pacientes con fiebre amarilla selvática de nuestro archivo, ocurridos entre 1934 y 1992. Las historias clínicas de estos enfermos así como la revisión del tejido hepático obtenido por viscerotomía, cortado y teñido con H&E, mostraban un cuadro característico de FA. En dos de estos pacientes se había aislado el virus de la FA *in vivo*. Tres casos tenían una sola muestra de suero con títulos positivos para FA. Se seleccionaron pacientes con cuadros típicos, atípicos y tardíos, éstos con más de 9 días de evolución (Tabla 1).

2. Hígados controles:

Se seleccionaron bloques y preparaciones histológicas de tejido hepático de 9 casos con otras hepatopatías (Tabla 1).

3. Cerebros de ratón lactante:

Se utilizaron dos tipos de especímenes. Uno inoculado con virus de dengue suministrado

por la OPS en el mismo taller (Tabla 1) y otro inoculado con virus de la fiebre amarilla cepa 17D, en el INS.

TABLA 1

INMUNORREACTIVIDAD PARA ANTIGENO D FIEBRE AMARILLA

Diagnóstico clínico patológico	Casos positivos	Total de casos
FA típica	52	53
FA atípica	6	6
FA tardía	7	7
FA cerebro de ratón	1	1
<i>Hepatitis fulminante:</i>		
Coinfección por virus B y D	0	4
Hepatitis tuberculosa	0	1
Hepatotoxicidad por drogas	0	1
Necrosis isquémica del hígado	0	1
Cirrosis alcohólica	0	2
Dengue, cerebro de ratón	0	1

4. Anticuerpos y método inmunohistoquímico:

Como anticuerpo primario se utilizó un antisuero constituido por fluido ascítico hiperinmune de ratón inoculado con virus de la FA, cepa 17D (National Institute of Allergy and Infectious Diseases of Maryland. Cat No v525-701-562).

El antígeno de la FA fue demostrado utilizando el método de estreptavidina-fosfatasa alcalina:

Se obtuvieron cortes de tejido hepático de 5 micras sobre láminas pretratadas con adhesivo Poly-L-Lisina (Sigma Cat. No.P8920). Las láminas fueron desparafinizadas, rehidratadas

y tratadas con una solución de proteasa VIII al 0,05% (Sigma, Cat. No. P5380), pH 7,8 a 37°C y lavadas en PBS. Posteriormente se agregó el anticuerpo contra antígeno de FA y se incubó por una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Lab. Cat. No. BA2000), durante 1 hora, seguido de incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina (Bethesda Research Laboratories, Cat. No. 4542SA) por una hora. Como sustrato se utilizó ácido 6-bromo-2-hidroxi-3 naftóico y levamisol para inhibir la fosfatasa alcalina endógena (Histomark red, Kirkegaard and Perry Labs. Cat. No. 7100), incubándolo por una hora en cámara oscura. Como tinción de contraste se utilizó hematoxilina y posteriormente las preparaciones se deshidrataron y montaron.

El estuche de inmunohistoquímica utilizado fue suministrado por la OPS en el taller mencionado.

La intensidad de la inmunorreactividad fue evaluada semicuantitativamente (grados ligero, moderado o fuerte).

RESULTADOS

De los 59 pacientes con diagnóstico de FA, 52 fueron hombres y 7 mujeres, su edad promedio fue 27,34 años (rango: 4 a 53 años). La duración media de la enfermedad fue 6,22 días (rango: 2 a 14 días); 7 casos (11,86%) fueron considerados tardíos (evolución: 9 a 14 días). Por otra parte, 2 casos fueron confirmados por aislamiento viral y 3 tuvieron serología positiva para FA. 53 casos (89,83%) tuvieron un patrón histopatológico típico de FA y 6 (10,17%) tuvieron una presentación atípica, 3 de los cuales fueron también casos tardíos. 8 casos tenían cambios de autólisis moderados a severos.

En 58 casos se obtuvo inmunorreactividad para antígeno de FA (sensibilidad: 98,30%). El caso negativo tenía un cuadro histopatológico reconocible como FA pero con importantes cambios de autólisis. Los dos casos con aislamiento viral y los tres con serología positiva para FA, fueron positivos también a la inmunohistoquímica para el antígeno de FA.

La inmunorreactividad antiamarílica se manifestó con una coloración rojiza en el citoplasma de los hepatocitos, en los cuerpos de Councilman (Figura 1) y en las neuronas del cerebro de ratón utilizado como control positivo (Figura 2). Se identificaron dos patrones de distribución de la positividad: en 15 casos ésta fue difusa y en 43 casos fue focal. La intensidad de la inmunorreactividad fue moderada o fuerte en 38 casos (64,41%) y ligera en 20 casos (33,90%). 4 de ellos tenían un cuadro histopatológico atípico y además, dos casos de este grupo fueron tardíos y otros dos tenían cambios de autólisis.

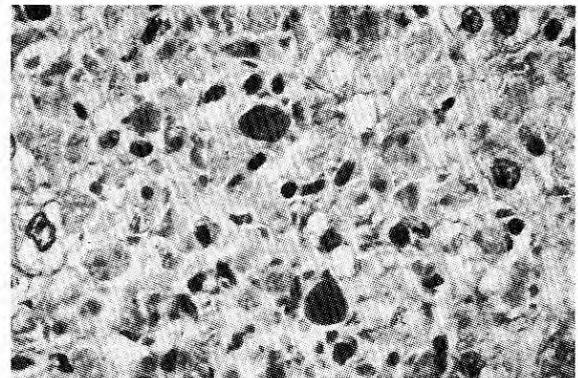


Figura 1. Hígado humano con fiebre amarilla. La inmunorreactividad para antígeno de FA es positiva en hepatocitos y cuerpos de Councilman. Método de inmunoestreptavidina-fosfatasa alcalina 400X.

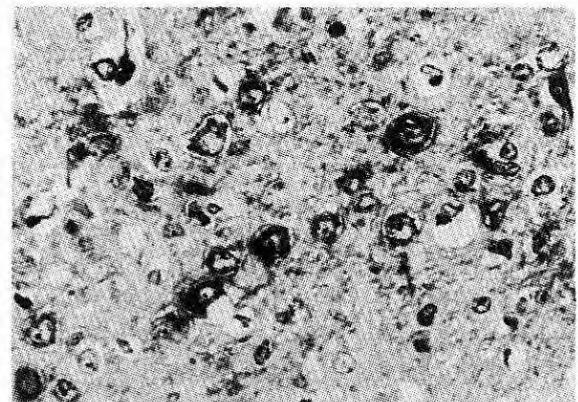


Figura 2. Cerebro de ratón inoculado con virus de la fiebre amarilla, cepa 17D. Muestra inmunorreactividad en todas las neuronas presentes. Método de inmunoestreptavidina-fosfatasa alcalina 400X.

No encontramos ninguna correlación entre el grado de severidad de los cambios histológicos-necrosis, esteatosis e inflamación con la intensidad de la inmunorreactividad.

Ninguno de los hígados con diagnóstico clínico-patológico diferente de FA, mostró inmunorreactividad para antígeno de FA (especificidad: 100%).

El cerebro de ratón inoculado con virus de dengue también presentó resultado negativo con la inmunohistoquímica para FA.

Los valores predictivos positivo y negativo correspondieron a 100% y 90,9% respectivamente.

DISCUSION

La confirmación del diagnóstico de FA depende de estudios serológicos, virológicos, epidemiológicos e histopatológicos, a partir de muestras de hígado obtenidas por viscerotomía o autopsia. Entre nosotros, la mayoría de casos de FA fatales son diagnosticados mediante el estudio histopatológico pues, tratándose de una enfermedad selvática, es difícil obtener las muestras para los análisis virológicos y serológicos adecuados.

Las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica permiten hacer un diagnóstico objetivo de FA al detectar antígeno viral en muestras de tejido hepático (15-18). Nuestros hallazgos de sensibilidad (98,30%), especificidad (100%), valor predictivo positivo (100%) y valor predictivo negativo (90,9%) son superiores a los resultados informados por Hall y col (18) e indican que el método empleado en este estudio es útil para confirmar el diagnóstico de FA en casos típicos y tardíos así como en la mayoría de los que presenten cambios de autólisis. Estos, si bien deterioran los determinantes antigénicos e interfieren su identificación en la prueba, no la

negativizan por completo pero sí disminuyen su intensidad que fue ligera en nuestros casos. El espécimen con reactividad negativa para FA pero con histopatología e historia clínica de esta entidad mostró cambios importantes de autólisis a los cuales atribuimos este resultado.

De otro lado, el método contribuye a establecer el diagnóstico diferencial de la FA con otras hepatopatías, incluyendo hepatitis fulminante por coinfección con virus de hepatitis B y delta, entidad que coexiste con la FA en algunas regiones de nuestro país. Este método es un recurso útil para la confirmación del diagnóstico de FA en casos difíciles o de particular interés epidemiológico. En nuestro laboratorio lo utilizamos de rutina y pensamos que la prueba de su idoneidad definitiva resistirá las exigencias de la experiencia y los estudios multidisciplinarios, clínico-epidemiológicos, serológicos y de aislamiento viral.

SUMMARY

Diagnostic confirmation of fatal Yellow Fever (YF) is essential for epidemiological surveillance in YF endemic regions. An immunohistochemical method for Yellow Fever antigen detection in sections from formalin-fixed and paraffin-embedded liver tissues was evaluated. Sensitivity of procedure was 98.30%, it was determined in 59 cases with YF clinico-pathological and epidemiological criteria, that occurred in Colombia from 1934 until 1992 including typical, atypical and late YF cases: 58 cases were positive while 1 case with severe autolytic changes was negative. On the other hand, none of 10 cases with histopathological diagnosis different from YF, including 4 cases with fulminant hepatitis originated by hepatitis B and delta virus coinfection, showed immunoreactivity (specificity was 100%). The results suggest that this immunohistochemical method could be a useful tool for the accurate diagnosis of YF difficult cases in reference laboratories.

REFERENCIAS

1. **Gast-Galvis A.** Historia de la fiebre amarilla en Colombia. Bogotá, D.E: Imprenta del Instituto Nacional de Salud, 1982: 46.
2. **Rodriguez G, Martinez M, Morales A, et al.** Manual de viscerotomía, Fiebre Amarilla. Bogotá: Imprenta del Instituto Nacional de Salud; 1886. Serie de notas e informes técnicos No 10.
3. Ministerio de Salud. Plan de vigilancia y control para fiebre amarilla y dengue. Bogotá: Imprenta del Instituto Nacional de Salud; 1985. Boletín epidemiológico Nacional No 11.
4. Bulletin of the World Health Organization. Present status of yellow fever, No. 64, 1986: 511.
5. **Monath TP.** Yellow fever. In: Mahmoud AAF, eds. Tropical and Geographical Medicine. New Jersey: Mc Graw-Hill Inc; 1990: 661.
6. **Strano JA, Dooley JR, Ishak K.** Manual sobre la fiebre amarilla y su diagnóstico diferencial histopatológico. Washington DC: American Registry of Pathology, AFIP; 1974. Syllabus L15274, cinta fija No 65, OPS-OMS.
7. Organización Mundial de la Salud. Comité de expertos de la OMS en fiebre amarilla, tercer informe, 1971. No 479.
8. **Strano AJ.** Yellow Fever. In: Pathology of tropical and extraordinary diseases. Washington DC: Armed Forces Institute of pathology; 1976: 1.
9. **Villela E.** Histology of human yellow fever when death is delayed. Arch Pathol. 1941; 31: 665.
10. **Vidales H, Buitrago B, Sanín L, et al.** Estudio de un brote epidémico de fiebre amarilla selvática en el pie de monte de la Sierra Nevada de Santa Marta. Biomédica. 1981; 1: 171.
11. **Buitrago B, Hadler SC, Popper H, et al.** Epidemiologic aspects of Santa Marta hepatitis over a 40-year period. Hepatolo. 1986; 6: 1292.
12. **Buitrago B.** Historia natural de la hepatitis B y D en Colombia. Biomédica. 1991; 11: 5.
13. **Buitrago B, Popper H, Hadler SC, et al.** Specific histologic features of Santa Marta Hepatitis: a severe form of hepatitis delta virus infection in Northern South America. Hepatol. 1986; 6: 1285.
14. **Popper H, Buitrago B, Hadler SC, et al.** Pathology of hepatitis delta infection in the Amazon basin. In: Rizzeto M, Gerin JL, Purcell RH, eds. The hepatitis delta virus and its infection. New York: Alan R Liss inc; 1986:121.
15. **Barth OM, Majerowicz S, Menasce LP, et al.** Detection of viral infection by immunofluorescence in formalin fixed tissues, pretreated with trypsin. Mem Ins Oswaldo Cruz. 1988; 83: 207.
16. **Schatzmayr HG, Barth OM, De Alencar AA.** Demostracao for imunofluorescencia direta de antigenos do virus da febre amarela em tecido hepático pre-tratado com tripsina. Mem Ins Oswaldo Cruz. 1984; 79: 93.
17. **De la Monte SM, Linhares AL, Travassos da Rosa APA, et al.** Immunoperoxidase Detection of Yellow Fever virus after natural and experimental infections. Trop Geogr Med 1983;35: 235.
18. **Hall W, Crowell T, Watts D, et al.** Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. Am J Trop Med Hyg. 1991; 45: 408.
19. **Monath TP, Ballinger ME, Miller BL, et al.** Detection of yellow fever RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by immunocytochemistry in fixed human liver. Am J Trop Med Hyg. 1989; 40: 663.