

DIAGNÓSTICO EN VIROLOGÍA

SEGUNDA EDICIÓN

Germán R. Perez
Adriana A. Giri
EDITORES

 **UNR**
EDITORA

Diagnóstico en Virología

Material correspondiente a los trabajos prácticos
del Área Virología
Departamento Académico de Microbiología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FCByF)
Universidad Nacional de Rosario (UNR)

Germán R. **Perez**
Adriana A. **Giri**
EDITORES

Segunda edición

Perez, Germán R.

Diagnóstico en virología / Germán R. Perez ; Adriana A. Giri ; Editado por Germán R. Perez ; Adriana A. Giri. - 2ª ed. - Rosario: UNR Editora, 2025.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-702-722-8

1. Virología. I. Giri, Adriana A. II. Germán R. Perez, ed. III. Giri, Adriana A., ed. IV. Título.

La edición de este libro es producto de la labor mancomunada de quienes integran la UNR Editora

Universidad Nacional de Rosario, 2025.

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723.

Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida sin el permiso expreso del editor.



Universidad
Nacional
de Rosario



Asociedad de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



Red de Editoriales
de las Universidades Nacionales
de la Argentina



Libro
Universitario
Argentino



UNR
EDITORIA

UNR editora

Editorial de la Universidad Nacional de Rosario

Secretaría de Extensión Universitaria

Urquiza 2050 - S2000AOB / Rosario, República Argentina

www.unreditora.unr.edu.ar / editora@sede.unr.edu.ar

Índice

Prólogo	5
Agradecimientos	6
Autores por orden alfabético	7
Abreviaturas	9
<i>Capítulo I</i> Bioseguridad en el laboratorio de virología	14
Diego Chouhy , Agustina Cerri , Adriana A. Giri	
<i>Capítulo II</i> Cultivo celular	24
Ana Laura Cavatorta , Agustina Cerri , Daniela Gardiol	
<i>Capítulo III</i> Diagnóstico virológico	36
Diego Chouhy , Elisa M. Bolatti , Agustina Cerri , Germán R. Perez , Adriana A. Giri	
<i>Capítulo IV</i> Retrovirus	58
Germán R. Perez , Miguel A. Taborda , Nadia Gerhardt , Adriana A. Giri	
<i>Capítulo V</i> Hepatitis virales	76
Germán R. Perez , Ana Laura Cavatorta , Agustina Cerri , Elisa M. Bolatti , Miguel A. Taborda , Adriana A. Giri	
<i>Capítulo VI</i> Herpesvirus	107
María Alejandra Sánchez , Germán R. Perez	
<i>Capítulo VII</i> Eruptivas virales	129
Micaela Cámpora , María Alejandra Sánchez , Diego Chouhy , Germán R. Perez	

<i>Capítulo VIII</i> Virus respiratorios	149
Ana Laura Cavatorta , Silvia Marchiano , Micaela Cámpora , María Rosa Marano	
<i>Capítulo IX</i> Infecciones víricas gastrointestinales y enterovirus	162
Ana Laura Cavatorta , Elisa M. Bolatti , María Rosa Marano	
<i>Capítulo X</i> Virus de importancia regional	
Claudia Elena , María Rosa Marano , Germán R. Perez	169
<i>Capítulo XI</i> Oncogénesis viral	
Germán R. Perez , Diego Chouhy	188

Prólogo

Este libro tiene como propósito proveer los fundamentos necesarios para el estudio de las infecciones virales de mayor impacto en salud humana. Está destinado a los alumnos de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FBIOyF) de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), así como a estudiantes de otras carreras biomédicas y como material de consulta para los profesionales del área salud.

Esta segunda edición del libro “Diagnóstico en Virología” llega en coincidencia con el 25° aniversario de la creación del Área Virología en el Departamento de Microbiología de la FBIOyF. Haciendo un poco de historia, el Área Virología surge por la necesidad de incorporar a la currícula de la Carrera de Bioquímica un área disciplinar de vacancia en la FBIOyF como era la Virología. Su creación fue promovida por la Decana Dra Mónica Elías y el Vicedecano Dr. Néstor Carrillo de la FBIOyF (período 1998-2002) a través del Fondo para el Mejoramiento de la Calidad de la Enseñanza (programa FOMECEC N° 138). El programa FOMECEC preveía la incorporación de tres Profesores con dedicación exclusiva para llevar a cabo todas las tareas concernientes a la creación, organización y posterior desenvolvimiento de esta nueva área académica. Con ese objetivo, el Área Virología fue creada en el año 2000 por las Dras. Daniela Gardiol, Adriana A. Giri y María Rosa Marano para llevar adelante tareas de investigación y docencia en los diferentes aspectos de la Virología. En 2001, se incorporó al Bioq. Miguel Taborda con el propósito de llevar adelante un servicio asistencial para el diagnóstico virológico de los pacientes provenientes del Hospital Provincial del Centenario y de otros hospitales públicos de la ciudad de Rosario. Ese mismo año, comenzó el dictado de la asignatura Virología en la Carrera de Bioquímica y se desarrollaron distintas líneas de investigación que permitieron la formación de recursos humanos. La participación de los docentes formados en el Área Virología en este libro refleja el resultado del trabajo en equipo realizado durante estos 25 años para la capacitación de los futuros profesionales en esa temática.

Desde la primera edición del libro “Diagnóstico en Virología”, en formato impreso y publicado en 2012, hemos sido testigos de la emergencia de nuevos patógenos virales para el ser humano y de la incorporación de innovadoras tecnologías en el laboratorio de análisis clínicos. En esta segunda edición, en formato digital y de acceso abierto, se han adaptado los contenidos para ofrecer información actualizada sobre el diagnóstico, la fisiopatogenia y la prevención de las enfermedades virales de impacto en la salud pública.

Agradecimientos

Queremos agradecer especialmente a los profesionales integrantes de la Mesa Directiva del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Santa Fe 2° circunscripción (CBSF2) por haber colaborado para que esta edición del libro haya podido concretarse.

Autores por orden alfabético

Elisa M. **Bolatti**

Bióloga (FCEFYN, UNC), Doctora en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigadora Asistente CONICET

Micaela **Cámpora**

Bioquímica (FBIOyF, UNR)
Jefa de trabajos prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Ana Laura **Cavatorta**

Bioquímica (FBIOyF, UNR), Doctora en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Profesora Adjunta, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigadora Adjunta CONICET

Agustina **Cerri**

Licenciada en Biotecnología (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Becaria doctoral CONICET

Diego **Chouhy**

Licenciado en Biotecnología (FBIOyF, UNR),
Doctor en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Profesor Adjunto, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigador Adjunto CONICET

Claudia E. **Elena**

Bioquímica (FBIOyF, UNR), Doctora en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Daniela **Gardiol**

Bioquímica (FBIOyF, UNR), Doctora (FBIOyF, UNR)
Profesora Asociada, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigadora Independiente CONICET

Nadia **Gerhardt**

Bioquímica (FBIOyF, UNR), Doctora en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Adriana A. **Giri**
Bioquímica (FBIOyF, UNR)
Doctora en Ciencias Microbiológicas (Università degli studi di Genova, Italia)
Profesora Asociada, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigadora Principal CONICET

María Rosa **Marano**
Bioquímica (FBIOyF, UNR), Doctora (FBIOyF, UNR)
Profesora Adjunta, Área Virología, FBIOyF (UNR)
Investigadora Principal CONICET

Silvia **Marchiano**
Bioquímica (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Germán R. **Perez**
Bioquímico (FBIOyF, UNR), Doctor en Ciencias Biológicas (FBIOyF, UNR)
Profesor Adjunto, Área Virología, FBIOyF (UNR)

María Alejandra **Sánchez**
Bioquímica (FBIOyF, UNR)
Jefa de Trabajos Prácticos, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Miguel A. **Taborda**
Bioquímico (FBIOyF, UNR), Farmacéutico (FBIOyF, UNR)
Profesor Adjunto, Área Virología, FBIOyF (UNR)

Abreviaturas

AAD	Antivirales de acción directa
AAEEH	Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado
AASLD	Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas
Acs	Anticuerpos
ADV	Adenovirus
Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferasa
ANDV	Hantavirus Andes Sur
ANF	Aspirado nasofaríngeo
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANW	Arenavirus del nuevo mundo
AOW	Arenavirus del viejo mundo
ATL	Leucemia a Células T del Adulto
BAV	Virus Andes Buenos Aires
BCV	Bocavirus
BERV	Virus Andes Bermejo
BME	Medio basal de Eagle
BSL1	Nivel de Bioseguridad 1
BSL2	Nivel de Bioseguridad 2
BSL3	Nivel de Bioseguridad 3
BSL4	Nivel de Bioseguridad 4
CAT	Crisis aplásica transitoria
CCU	Carcinomas de células escamosas de cuello uterino
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
CE	Control endógeno
CHAPV	Virus Chapare
CHIKF	Fiebre chikungunya
CHIKV	Virus Chikungunya
CI	Control interno
CMV	Citomegalovirus
CN	Control negativo
CNV	Calendario Nacional de Vacunación
CO2	Dióxido de carbono
COI	Índice de punto de corte
CoV	Coronavirus
CP	Control positivo
CPV	Virus Andes Central Plata
CR	Control de reactivos
CSB	Cabina de seguridad biológica
CVP	Carga viral plasmática

DE	Desvío estándar
DENV	Virus del dengue
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
DOBV	Dobrava-Belgrado orthohantavirus
EBV	Virus Epstein-Barr
ECLIA	Electroquimioluminiscencia
ECP	Efecto citopático
EI	Eritema infeccioso
EIA	Enzimoinmunoanálisis
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ETI	Enfermedad tipo Influenza
ETMI	Eliminación de la transmisión materno infantil
EV	Enterovirus
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FHA	Fiebre hemorrágica argentina
FHD	Fiebre Hemorrágica del Dengue
FHF	Fallo hepático fulminante
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Flu-A	Virus Influenza tipo A
Flu-B	Virus Influenza tipo B
FRET	Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia
GGHI	Gammaglobulina-hiperinmune
GTOV	Virus Guanarito
HA	Hemaglutinina
HAM/TSP	Mielopatía Asociada al HTLV-1 o Paraparesia Espástica Tropical
HAV	Virus de la Hepatitis A
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCC	Hepatocarcinoma
HCPS	Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus
HCV	Virus de la Hepatitis C
HDV	Virus de la Hepatitis D
HEPA	High efficiency particle arresting
HEV	Virus de la Hepatitis E
HFRS	Síndrome Renal con Fiebre Hemorrágica
HHV-6	Herpesvirus Humano tipo 6
HHV-7	Herpesvirus Humano tipo 7
HHV-8	Herpesvirus Humano tipo 8
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia Humana
hMPV	Metapneumovirus humano
HNF	Hisopado nasofaríngeo
HNTV	Hantaan orthohantavirus
HPV	Virus papiloma humano

HPV-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo
HPV-BR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
HSIL	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
HSV-1	Herpesvirus Simplex tipo 1
HSV-2	Herpesvirus Simplex tipo 2
HTLV-1	Virus Linfotrópicos T Humanos tipo 1
HTLV-2	Virus Linfotrópicos T Humanos tipo 2
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Igs	Inmunoglobulinas totales
IL-2	Interleucina 2
INEVH	Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas
IO	Infecciones oportunistas
IRAG	Infección respiratoria aguda grave
IRAGI	Infección respiratoria aguda grave inusitada
IRAs	Infecciones respiratorias agudas
ITR	Repeticiones terminales invertidas
ITS	Infecciones de transmisión sexual
JUNV	Virus Junín
JUQV	Virus Andes Juquitiba
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LASV	Virus Lassa
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocitaria
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LECV	Virus Andes Lechiguanas
LIA	Inmunoensayo lineal
LLTA	Leucemia/linfoma de células T del adulto
LNV	Virus Laguna Negra
LOD	Límite de detección
LSIL	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
MACV	Virus Machupo
MAYV	Virus Mayaro
MCD	Enfermedad de Castleman
ME	Microscopía electrónica
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
MERS-CoV	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio de Oriente Medio
MI	Mononucleosis infecciosa
MPXV	Virus mpox o de la viruela símica

NA	Neuraminidasa
NAT	Prueba de ácidos nucleicos
NoV	Norovirus
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	Marcos abiertos de lectura
ORNV	Virus Andes Orán
OROV	Virus Oropouche
PaV	Virus de la parotiditis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEL	Linfoma primario de cavidades
PEP	Profilaxis post-exposición
PIV-1	Virus Parainfluenza tipo 1
PIV-2	Virus Parainfluenza tipo 2
PIV-3	Virus Parainfluenza tipo 3
PrEP	Profilaxis pre-exposición
PUUV	Puumala orthohantavirus
PV-B19	Parvovirus B19
qPCR	PCR en tiempo real
RAS	Sustituciones asociadas a resistencia antiviral
RbV	Virus de la Rubeola
RIBA	Ensayo de inmunotransferencia recombinante
RN	Recién nacidos
RNV	Rinovirus
RoV	Rotavirus
Rp	Relación de positividad
RSV	Virus sincicial respiratorio
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
RV	Rotavirus
RVS	Respuesta virológica sostenida
SABV	Virus Sabia
SARS-CoV	Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo
SaV	Saporovirus
SarV	Virus del sarampión
SEOV	Seoul orthohantavirus
SFTS	Síndrome de fiebre grave con trombocitopenia
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
SISA	Sistema integrado de información sanitaria argentina
SK	Sarcoma de Kaposi
SLEV	Virus de la encefalitis de San Luis
SNC	Sistema nervioso central
SNV	Sin Nombre orthohantavirus
TBC	Tuberculosis

TMA	Amplificación mediada por transcripción
UTR	Regiones no traducidas
VLP	Partículas pseudovirales
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VZV	Virus varicela zoster
WNV	Virus del Nilo Occidental
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika

Capítulo 1

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA

Diego **Chouhy**
Agustina **Cerri**
Adriana A. **Giri**

1.1. PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD

Riesgo implica la probabilidad de que ocurra un daño, lesión o enfermedad. En el contexto de los laboratorios microbiológicos y biomédicos, la evaluación del riesgo se concentra principalmente en la prevención de infecciones de laboratorio y ayuda a asignar los niveles de bioseguridad (instalaciones, equipo y prácticas) que reducen al mínimo el riesgo de exposición del trabajador o del ambiente a un agente.

El término *contención* se utiliza para describir métodos seguros para manejar materiales infecciosos en el medio ambiente del laboratorio donde son manipulados o conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición de quienes trabajan en laboratorios u otras personas, y del medio ambiente externo, a agentes potencialmente peligrosos.

La *contención primaria*, que incluye la protección del personal y del medio ambiente inmediato del laboratorio de la exposición a agentes infecciosos, es provista tanto mediante buenas técnicas microbiológicas como a través del uso de equipos de seguridad adecuados. El uso de vacunas puede brindar un mayor nivel de protección del personal.

La *contención secundaria*, que incluye la protección del medio ambiente externo al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos, se alcanza a través de una combinación del diseño de la instalación y de prácticas operativas.

Por lo tanto, los tres elementos de contención incluyen:

- *prácticas y técnicas de laboratorio*
- *equipos de seguridad*
- *diseño de la instalación.*

La evaluación del riesgo del trabajo a realizar con un agente específico determinará la combinación apropiada de estos elementos.

1.2. PRÁCTICAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO

El elemento más importante de la contención es el cumplimiento estricto de las prácticas y técnicas microbiológicas estándar.

Las infecciones han ocurrido en todo tipo de laboratorios. La gran mayoría de las infecciones reportadas ocurren en institutos de investigación que trabajan con cultivos para aislamiento viral, aunque una mayor proporción de personas están a riesgo en los laboratorios de diagnóstico de rutina.

Las rutas de infección reportadas son:

- **Oral:** comiendo, bebiendo, tomando mate y fumando en el laboratorio, pipeteo con la boca, transferencia de microorganismos a la boca por medio de dedos u objetos contaminados.
- **Piel:** lastimaduras por agujas, instrumentos cortantes, vidrio. Mordidas o rasguños de animales.
- **Conjuntiva:** salpicaduras de material infectado en los ojos, transferencia de microorganismos a los ojos por los dedos o manos.
- **Tracto respiratorio:** inhalación de aerosoles conteniendo microorganismos.

1.2.1. USO DE PIPETAS Y DISPOSITIVOS DE PIPETEO

- Debe utilizarse siempre un dispositivo de pipeteo. El pipeteo con la boca está prohibido.
- Nunca se insuflará aire en un líquido que contenga agentes infecciosos.
- No debe mezclarse el material infeccioso aspirando y soplando alternativamente a través de una pipeta.
- Las pipetas contaminadas deben sumergirse completamente en un desinfectante adecuado contenido en un recipiente irrompible y permanecer en él durante un tiempo suficiente antes de tirarlas.
- No deben utilizarse para pipetear jeringuillas provistas de aguja hipodérmica.
- Para evitar la dispersión del material infeccioso que caiga accidentalmente de una pipeta, se debe recubrir la superficie de trabajo con material absorbente, el cual debe ser desechado como residuo infeccioso una vez utilizado.

1.2.2. PREVENCIÓN EN LA INGESTA DE MATERIAL INFECCIOSO Y SU CONTACTO CON LA PIEL Y LOS OJOS

- Las partículas y gotas de mayor tamaño (>5mm) que se desprenden durante las manipulaciones microbiológicas se depositan rápidamente en la superficie de las mesas y en las manos del trabajador. SIEMPRE utilizar guantes descartables y evitar tocarse la boca, los ojos y el rostro.
- En el laboratorio no se deben conservar ni consumir alimentos o bebidas.
- En el laboratorio no se colocarán objetos en la boca (lápices, goma de mascar).
- En el laboratorio no se aplicarán cosméticos.
- La cara, los ojos y la boca deben estar protegidos con una pantalla o de algún otro modo durante cualquier operación que pueda provocar salpicaduras de material potencialmente infeccioso.

1.2.3. PREVENCIÓN DE LA INYECCIÓN DE MATERIAL INFECCIOSO

- La inoculación accidental debida a heridas por objetos de vidrio roto o astillado puede evitarse mediante prácticas y procedimientos cuidadosos. El material de vidrio debe ser reemplazado por material de plástico siempre que sea posible.
- La inoculación accidental puede producirse como consecuencia de heridas con agujas hipodérmicas, pipetas Pasteur de vidrio o vidrios rotos.

- El número de accidentes causados por agujas hipodérmicas puede reducirse restringiendo al mínimo el uso de jeringas y agujas (por ejemplo, existen dispositivos sencillos para abrir los frascos con tapón de diafragma de modo que puedan usarse pipetas en lugar de jeringuillas y agujas), o utilizando dispositivos especiales de seguridad para objetos cortantes y punzantes cuando se hace imprescindible utilizar jeringas y agujas.
- NUNCA deben volver a cubrirse las agujas. Los artículos desechables deberán colocarse en recipientes resistentes a la perforación que tengan tapa.
- Las pipetas Pasteur de vidrio deben sustituirse por otras de plástico.

1.2.4. SEPARACIÓN DE SUERO

- Sólo realizará este trabajo personal de laboratorio debidamente capacitado.
- El personal debe llevar guantes y equipo protector de ojos y mucosas.
- Sólo una buena técnica permite evitar o reducir al mínimo las salpicaduras y los aerosoles. La sangre y el suero se deben pipetear con cuidado en lugar de verterlos. El pipeteo con la boca está prohibido.
- Una vez usadas, las pipetas se sumergirán por completo en un desinfectante apropiado y permanecerán en él durante un tiempo suficiente, hasta que se eliminen o se laven y esterilicen para volverlas a utilizar. Se aconseja el uso de pipetas descartables.
- Los tubos de ensayo que se desea eliminar y que contienen coágulos de sangre u otros materiales se colocarán, nuevamente con sus tapas, en recipientes impermeables apropiados que se tratarán y esterilizarán en la autoclave o se incinerarán.
- Habrá que disponer de desinfectantes apropiados para limpiar las salpicaduras y los derrames de material.
- Actualmente hay tubos que están provistos de un polímero el cual, luego de la centrifugación, separa el suero del paquete celular. Esto disminuye de manera significativa el riesgo de infección accidental.

1.2.5. USO DE LAS CENTRÍFUGAS

- El funcionamiento mecánico satisfactorio es un requisito de la seguridad microbiológica del empleo de centrífugas en el laboratorio.
- Los tubos de la centrífuga y los recipientes de muestras destinados al uso en la centrífuga deben estar fabricados de plástico, y deben inspeccionarse para detectar defectos antes de usarlos.
- Los tubos y los recipientes para muestras deben estar siempre bien cerrados (con tapón de rosca si es posible) para la centrifugación.
- El espacio que debe dejarse entre el nivel del líquido y el borde de cada tubo de centrífuga debe ser especificado en las instrucciones del fabricante.
- Al utilizar las centrífugas, pueden expulsar partículas infecciosas transportadas por el aire. No obstante, el empleo de una buena técnica de centrifugación y de tubos tapados correctamente ofrece protección suficiente contra los aerosoles infecciosos y la dispersión de partículas.

- En caso de rotura de un tubo dentro de la centrífuga mientras la misma está en funcionamiento, NUNCA se debe abrir inmediatamente. Se debe dejar que los aerosoles se depositen dentro de la misma (30 minutos aproximadamente). Luego se debe abrir la centrífuga y descontaminar con un desinfectante adecuado.

1.2.6. DESINFECCIÓN

Para la bioseguridad en el laboratorio es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización. Los tiempos de contacto con los desinfectantes son distintos para cada material y cada fabricante. Así, todas las recomendaciones para el uso de desinfectantes deben seguir las especificaciones del fabricante.

En la esfera de la desinfección y la esterilización se utilizan muchos términos diferentes:

- **Antimicrobiano:** Agente que mata los microorganismos o suprime su crecimiento y proliferación.
- **Antiséptico:** Sustancia que inhibe el crecimiento y el desarrollo de microorganismos pero no necesariamente los mata. Los antisépticos suelen aplicarse a las superficies corporales.
- **Descontaminación:** Cualquier proceso utilizado para eliminar o matar microorganismos. También se utiliza para referirse a la eliminación o neutralización de sustancias químicas peligrosas y materiales radioactivos.
- **Desinfección:** Medio físico o químico para matar microorganismos, pero no necesariamente elimina esporas.
- **Desinfectante:** Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos, pero no necesariamente elimina esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.
- **Esporicida:** Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizadas para matar microorganismos y esporas.
- **Esterilización:** Proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos y esporas.
- **Germicida químico:** Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para matar microorganismos.
- **Microbicida:** Sustancia o mezcla de sustancias químicas que mata microorganismos. Este término se utiliza a menudo en lugar de «germicida químico» o «antimicrobiano».

HIPOCLORITO SÓDICO (CLORO)

El cloro, oxidante de acción rápida, es un **germicida** químico de uso muy extendido y de amplio espectro. Normalmente se vende en forma de una solución acuosa de hipoclorito sódico (NaOCl) que puede diluirse en agua para conseguir distintas concentraciones de cloro libre.

Su actividad se ve considerablemente reducida por la materia orgánica (proteínas). Las soluciones madre o de trabajo de lejía almacenadas en recipientes abiertos, particularmente a temperaturas elevadas, liberan cloro gaseoso con lo que se debilita su potencial germicida. La frecuencia con la que deben prepararse nuevas soluciones de trabajo de lejía depende de su potencia inicial, del tamaño y el tipo de los recipientes (por ejemplo, con o sin tapa), de la frecuencia y el tipo de uso, y de las condiciones ambientales. A título de orientación general, las soluciones que reciban materiales con gran cantidad de materia orgánica varias veces al día deben cambiarse al menos diariamente, mientras que aquellas que se usan con menos frecuencia pueden durar hasta una semana.

Como solución desinfectante general para toda clase de trabajos de laboratorio se utilizará una concentración de 1 g/l de cloro libre. En caso de derrame que conlleve un peligro biológico y en presencia de grandes cantidades de materia orgánica, se recomienda utilizar una solución más concentrada, que contenga 5 g/l de cloro libre. Las soluciones de NaOCl, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por tanto deben diluirse a razón de 1:50 o 1:10 para obtener concentraciones finales de 1 g/l y 5 g/l, respectivamente. *La lejía no se recomienda como antiséptico*, pero puede utilizarse como desinfectante de uso general y para sumergir materiales no metálicos contaminados.

1.3. EQUIPOS DE SEGURIDAD

Los equipos de seguridad incluyen *cabina de seguridad biológica* (CSB), recipientes cerrados, y otros sistemas destinados a eliminar o minimizar las exposiciones a materiales biológicos peligrosos. La CSB es el dispositivo principal utilizado para proporcionar contención de salpicaduras o aerosoles infecciosos generados por diversos procedimientos microbiológicos. Los equipos de seguridad pueden también incluir elementos de protección personal, tales como guantes, ambos, delantales, cobertores de zapatos, botas, respiradores, máscaras faciales, anteojos de seguridad o antiparras. Los equipos de protección personal se utilizan en general en combinación con gabinetes de seguridad biológica y otros dispositivos que contienen los agentes, animales o materiales que se manipulan. En algunas situaciones en las cuales resulta poco práctico trabajar en CSB, los equipos de protección personal pueden formar la barrera primaria entre el personal y los materiales infecciosos. Las CSB están diseñadas para proteger al trabajador, la atmósfera del laboratorio y los materiales de trabajo de la exposición a las salpicaduras y a los aerosoles infecciosos que pueden generarse al manipular el material que contiene agentes infecciosos, como cultivos primarios, soluciones madre y muestras clínicas. Los *aerosoles* se producen en cualquier actividad que transmita energía a un material líquido o semilíquido, por ejemplo, al agitar-

lo, verterlo a otro recipiente, removerlo o verterlo sobre una superficie o sobre otro líquido. Las actividades como la siembra de placas de agar, la inoculación de frascos de cultivo celular con pipeta, el uso de pipetas múltiples para dispensar suspensiones líquidas de agentes infecciosos en placas de cultivo, la homogeneización y la agitación en vórtex de material infeccioso, la centrifugación de líquidos infecciosos o el trabajo con animales, pueden generar aerosoles infecciosos. Las partículas de aerosol de menos de 5 mm de diámetro y las pequeñas gotas de 5 a 100 mm de diámetro no son visibles a simple vista. El trabajador no suele darse cuenta de que se están produciendo esas partículas, que pueden ser inhaladas o provocar la contaminación cruzada de los materiales que se encuentran sobre las superficies de trabajo. Las CSB, cuando se utilizan debidamente, han demostrado ser sumamente eficaces para reducir las infecciones adquiridas en el laboratorio y la contaminación cruzada de cultivos por exposición a aerosoles. *Las cabinas de flujo de aire horizontal y vertical («bancos de trabajo de aire limpio») no son CSB y no deben emplearse como tal.*

1.3.1. CSB CLASE I

Es un gabinete ventilado de presión negativa que, por lo general, funciona con un frente abierto. La totalidad del aire del gabinete se libera a través del filtro HEPA (HEPA: *High Efficiency Particle Arresting*) hacia el laboratorio o hacia el exterior. Las CSB de Clase I están diseñadas para la investigación microbiológica con agentes de riesgo bajo y moderado y se utilizan para la contención de mezcladoras, licuadoras y otros equipos. Estos gabinetes resultan inadecuados para la manipulación de material de investigación vulnerable a la contaminación del aire dado que el flujo de aire no filtrado proveniente del laboratorio puede transportar sustancias contaminantes al gabinete (Figura 1).

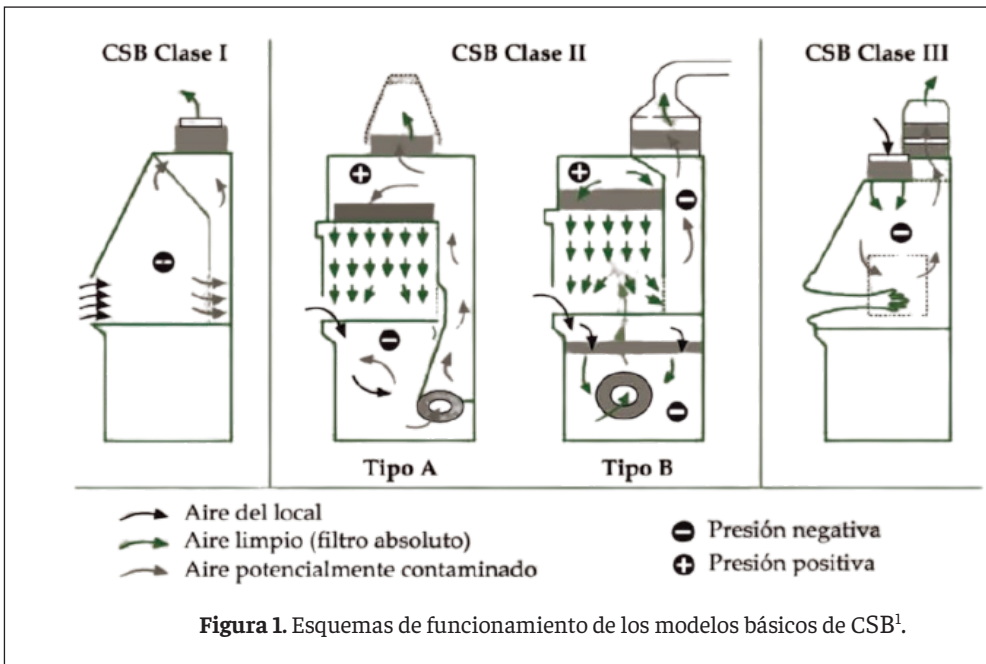
1.3.2. CSB CLASE II

Está diseñada con flujo de aire de entrada a una velocidad que permita proteger al personal, flujo laminar vertical hacia abajo filtrado con HEPA para la protección del producto y flujo de escape filtrado con HEPA para la protección ambiental. Las CSB de Clase II se clasifican en dos tipos (A y B), según la construcción, las velocidades y los patrones del flujo del aire y los sistemas de escape. Básicamente, las *cabinas de tipo A* son aptas para investigación microbiológica *en ausencia de* productos químicos volátiles o tóxicos y radionucleídos (formas inestables de elementos que liberan radiación a medida que se descomponen y se vuelven más estables), ya que el aire vuelve a circular dentro del gabinete. Las cabinas de tipo A pueden tener el escape orientado hacia el laboratorio o hacia el exterior a través de una conexión al sistema de escape de la construcción. Por su parte, las *cabinas de tipo B* se conectan al sistema de escape de la construcción y contienen plena presión negativa. Tales características permiten que el trabajo se realice con productos químicos o radionucleídos (Figura 1).

1.3.3. CSB CLASE III

Es un gabinete herméticamente cerrado y ventilado a prueba de gases. Ofrece el grado más elevado de protección de personal y del ambiente contra los aerosoles infecciosos, así como también la protección de materiales de investigación contra los contaminantes microbiológicos. Son los más aptos para trabajar con agentes peligrosos que requieren contención de *Bioseguridad de Nivel 3 o 4*.

Todas las operaciones en el área de trabajo del gabinete se realizan con guantes de goma o trajes protectores. El CSB de Clase III funciona bajo presión negativa. El suministro de aire se realiza a través del filtrado HEPA y el gas de escape del gabinete se filtra a través de dos filtros HEPA en serie o una filtración HEPA seguida por una incineración antes de la descarga fuera del recinto. Todas las partes del equipo requeridas por la actividad del laboratorio, tales como las incubadoras, los refrigeradores y los centrifugadores, deben constituir una parte integral del sistema del gabinete. La CSB Clase III debe ser conectada a autoclaves de doble extremo y/o a un tanque de productos químicos utilizado para esterilizar o desinfectar los materiales que salen del gabinete y para permitir que nuevos materiales ingresen al mismo. En consecuencia, muchas CSB de Clase III se conforman como sistemas interconectados (Figura 1).



1. Organización Panamericana de la Salud (2002). Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. (1° ed) ISBN 92-75-32416-6 (versión electrónica) [consultado el 28/01/2025] Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/42705>.

1.4. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE INSTALACIONES

El diseño y la construcción de la instalación contribuyen a la protección de quienes trabajan en el laboratorio, proporcionan una barrera para proteger a las personas que se encuentran fuera del laboratorio, y protegen a las personas o animales de la comunidad de agentes infecciosos que pueden ser liberados accidentalmente desde el laboratorio.

La barrera o barreras recomendadas dependen del riesgo de transmisión de los agentes específicos. Por ejemplo, los riesgos de exposición de la mayor parte del trabajo en instalaciones del Nivel de Bioseguridad 1 y 2 serán el contacto directo con los agentes o exposiciones a contactos inadvertidos a través del medio ambiente de trabajo contaminado. Las barreras secundarias en estos laboratorios pueden incluir la separación del área de trabajo del laboratorio del acceso al público, la disponibilidad de un sistema de descontaminación (por ejemplo, autoclave) e instalaciones para el lavado de manos.

Cuando el riesgo de infección por exposición a un aerosol infeccioso está presente, quizás sea necesario implementar un mayor nivel de contención y barreras secundarias múltiples para evitar que los agentes infecciosos se escapen hacia el medio ambiente. Dichas características de diseño incluyen sistemas de ventilación especializados para asegurar el flujo de aire direccional, sistemas de tratamiento de aire para descontaminar o eliminar agentes del aire de escape, zonas de acceso controladas, esclusas de aire en las puertas de acceso al laboratorio o edificios o módulos separados para aislar al laboratorio.

Se describen 4 *niveles de bioseguridad*, que constan de combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio. Cada combinación es específicamente apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas o sospechadas de los agentes infecciosos, y la función o la actividad del laboratorio.

En general, el trabajo con agentes conocidos debe realizarse en el nivel de bioseguridad recomendado y se toma en cuenta la información específica sobre la virulencia, la patogenicidad, los patrones de resistencia a antibióticos, la disponibilidad de vacunas o tratamientos.

- **Nivel de Bioseguridad 1 (BSL1):** Las prácticas, los equipos de seguridad, el diseño y la construcción de la instalación del BSL1 son adecuados para laboratorios destinados a la educación o capacitación secundaria o universitaria, y para otros laboratorios en los cuales se trabaja con cepas definidas y caracterizadas de microorganismos viables que no se conocen como generadores sistemáticos de enfermedades en humanos adultos sanos. El BSL1 representa un nivel básico de contención que se basa en prácticas microbiológicas estándar sin ninguna barrera primaria o secundaria especialmente recomendada, salvo una piletta para lavado de manos.
- **Nivel de Bioseguridad 2 (BSL2):** Las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del BSL2 son aplicables a *laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad* y que están asociados con enfermedades humanas de variada gravedad. Con buenas técnicas microbiológicas, estos agentes se pueden manipular en forma segura en actividades realizadas en una mesa de trabajo, siempre que el riesgo potencial

de que se produzcan salpicaduras o aerosoles sea bajo. El Virus de la Hepatitis B (HBV), el Virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV-1), *Salmonella spp*, y *Toxoplasma spp* son representativos de los microorganismos asignados a este nivel de contención. El BSL2 es adecuado cuando se trabaja con sangre derivada de humanos, fluidos corporales, tejidos o líneas de células primarias humanas donde puede desconocerse la presencia de un agente infeccioso. Los riesgos primarios del personal que trabaja con estos agentes están relacionados con exposiciones accidentales de membranas mucosas o percutáneas, o ingestión de materiales infecciosos. Debe tenerse especial precaución con agujas o instrumentos cortantes contaminados. Si bien no se ha demostrado que los organismos que se manipulan de rutina en el BSL2 sean transmisibles a través de la vía de aerosoles, los procedimientos con potencial de producir aerosoles o grandes salpicaduras, que pueden incrementar el riesgo de exposición de dicho personal, deben llevarse a cabo en equipos de contención primaria o en dispositivos tales como una CSB. Se deben utilizar las demás barreras primarias que correspondan, tales como máscaras contra salpicaduras, gafas protectoras, máscaras, delantales y guantes. Se debe disponer de barreras secundarias, tales como piletas para lavado de manos y oculares, e instalaciones de descontaminación de desechos a fin de reducir la contaminación potencial del medio ambiente.

- **Nivel de Bioseguridad 3 (BSL 3):** Las prácticas, equipos de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del BSL3 pueden aplicarse a instalaciones clínicas, de producción, investigación, educación o diagnóstico, donde se trabaja con agentes exóticos o regionales con riesgo potencial de transmisión respiratoria, y que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal. La *Mycobacterium tuberculosis*, el SLEV, y la *Coxiella burnetii* son representativos de los microorganismos asignados a este nivel. Los riesgos primarios del personal que trabaja con estos agentes están asociados a la auto inoculación, ingestión y exposición a aerosoles infecciosos. Al manipular agentes del BSL3 se pone mayor énfasis en las barreras primarias y secundarias para proteger al personal en áreas contiguas, a la comunidad y al medio ambiente de la exposición a aerosoles potencialmente infecciosos. Por ejemplo, todas las manipulaciones de laboratorio se deben llevar a cabo en una CSB u otros equipos cerrados, tales como cámaras de generación de aerosoles estancas al gas. Las barreras secundarias para este nivel incluyen el acceso controlado al laboratorio y requisitos de ventilación que minimicen la liberación de aerosoles infecciosos desde el laboratorio.
- **Nivel de Bioseguridad 4 (BSL4):** Las prácticas y los equipos de seguridad, así como el diseño y la construcción de instalaciones del BSL4 son aplicables al trabajo con agentes peligrosos o tóxicos que representan un alto riesgo individual de enfermedades que ponen en peligro la vida, que pueden transmitirse a través de aerosoles y para las cuales no existen vacunas o terapias disponibles. Los agentes con una relación antigénica cercana o idéntica a los agentes de los BSL4 deben manejarse conforme a las recomendaciones de este nivel. Los virus como Marburg o los que causan fiebres hemorrágicas se manipulan en el BSL4. Los riesgos principales para el personal que trabaja con agentes del BSL4 son

la exposición respiratoria a aerosoles infecciosos, la exposición de membranas mucosas o piel lastimada a gotitas infecciosas y la autoinoculación. Todas las manipulaciones de materiales de diagnóstico potencialmente infecciosos, cepas puras y animales infectados en forma natural o experimental, implican un alto riesgo de exposición e infección para el personal de laboratorio, la comunidad y el medio ambiente. El aislamiento completo del personal de laboratorio de los materiales infecciosos en aerosol se logra principalmente trabajando en una CSB Clase III y en un traje de cuerpo entero, con provisión de aire y presión positiva. Por lo general, la instalación del BSL4 es un edificio separado o una zona totalmente aislada con sistemas de gestión de desechos y requisitos de ventilación especializados y complejos para prevenir la liberación de agentes viables al medio ambiente.

Bibliografía

- Organización Panamericana de la Salud (2002). Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. (1° ed) ISBN 92-75-32416-6 (versión electrónica) [consultado el 28/01/2025] Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/42705>.
- Richmond JY, McKinney RW (2002). Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina (4° ed) [consultado el 30/9/2024]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/50285>
- Organización Mundial de la Salud (2023). Manual de bioseguridad en el laboratorio (4° ed). ISBN 978-92-4-005930-6 (versión electrónica). [consultado el 28/01/2025]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/365600/9789240059306-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kuszniarz G., Imaz S., Chiani Y. (2019). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio (2° revisión). [consultado el 28/01/2025]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/iner_1_-_manual-de-bioseguridad-en-el-laboratorio-version-final.pdf
- Ministerio de Salud de Argentina (2023). DOCUMENTO MARCO: Recomendaciones Paso a Paso para el Desarrollo de Buenas Prácticas en el Laboratorio de Análisis Clínicos. [consultado el 28/01/2025]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/infoleg/res594-381466.pdf>.

Capítulo 2

CULTIVO CELULAR

Ana Laura **Cavatorta**
Agustina **Cerri**
Daniela **Gardiol**

2.1. INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR

Se entiende por cultivo celular al **conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.**

Los **experimentos** que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas. Se aplican, entre otros, al análisis de la actividad y el flujo intracelulares, la genética, las interacciones célula-medio y célula-célula.

Como ejemplo de **áreas de investigación** fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular se pueden mencionar:

- *Virología*: establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y producción de vacunas y antivirales.
- *Investigación del Cáncer*
- *Inmunología*: producción de anticuerpos monoclonales.
- *Ingeniería de proteínas*: producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento, etc.
- *Estudios de interacción y señalización celular, diferenciación y desarrollo*: comprende el estudio de los receptores y de las vías de transducción de la señal.
- *Aplicaciones diagnósticas*: análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad, etc.
- *Aplicaciones médicas*: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.

2.1.1. VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

- **Permiten un control preciso y fino del medio ambiente**: En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: fisicoquímicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O_2 , CO_2 , tensión superficial), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular).
- **Caracterización y homogeneidad de la muestra**: Las células en cultivo son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.

- **Economía:** Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos y con un acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en un animal completo.
- **Motivaciones éticas:** La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo '*in vivo*' pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que podrían suponer, si el estudio se hiciera con animales de experimentación, el sacrificio de decenas o cientos.

2.1.2. DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

- **Técnica sensible:** El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas).
- **Cantidad y costo:** El costo de producción de 1g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido a partir de un animal.
- **Inestabilidad:** Muchas de las líneas celulares continuas son inestables desde un punto de vista genético, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide.
- **Validez del modelo '*in vitro*':** Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:
 - se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
 - se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular, lo que *in vivo* favorece la diferenciación celular.
 - carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis '*in vivo*', especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

Para subsanar esta desventaja se han desarrollado cultivos que permiten recrear más fehacientemente las condiciones naturales en las que se encuentra una célula, como son el **cultivo histotípico** (las células se reagrupan de manera de recrear una estructura tridimensional similar a la del tejido, como por ejemplo la infiltración en una matriz tridimensional de gel de colágeno) y el **cultivo organotípico**: (similar al histotípico pero combinando células de distintos linajes, como por ejemplo, queratinocitos en cultivo combinado con fibroblastos).

2.2. TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS

- **Cultivo de órganos:** Implica que la arquitectura característica del tejido '*in vivo*' se mantiene al menos en parte. Para ello, el órgano se mantiene en un medio del que obtie-

ne los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva a una elevada heterogeneidad.

– **Explantos primarios:** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

– **Cultivo celular:** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

2.3. BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EN CULTIVO

Un **cultivo primario** es establecido directamente desde tejido tomado de un organismo. Los **cultivos secundarios** son obtenidos por subcultivo de los cultivos primarios. Los cultivos celulares obtenidos por el proceso de subcultivar repetitivamente se denominan **líneas celulares**.

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así, sólo formarán el cultivo aquellas células que sean:

1- capaces de superar el proceso de disgregación

2- capaces de proliferar en forma de monocapa o en suspensión. (1º SELECCIÓN)

Aquí se distinguen dos tipos de cultivos de células:

- **Cultivos en monocapa:** característicos de células anclaje-dependiente, es decir, las células necesitan adherirse al sustrato o soporte para iniciar la proliferación.

- **Cultivos en suspensión:** característicos de células anclaje-independiente, siendo el modo de proliferar de células sanguíneas. Asimismo, las células transformadas (ver más adelante) tienen la capacidad de proliferar en estas condiciones.

Cuando se establece el cultivo se realiza una nueva selección (2º SELECCIÓN): aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. Así pues, se puede considerar el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

2.4. EVOLUCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ANCLAJE-DEPENDIENTE (Figura 2)

Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades de células diferenciadas, entre ellas la incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan sólo algunas de las propiedades que las caracterizaban. Esta pérdida de propiedades puede ser debida a:

- **desdiferenciación:** implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular (por ejemplo, un hepatocito en cultivo pierde sus enzimas carac-

- terísticas, no puede almacenar glucógeno, ni sintetizar las proteínas del suero).
- **desadaptación:** implica que la característica especializada perdida no es irreversible sino como consecuencia de la pérdida de la señal (por ejemplo, externa, hormonal, nerviosa) y que basta con recuperar la señal para que se re-exprese tal característica (por ejemplo, los hepatocitos de rata pueden re-exresar tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas, como insulina e hidrocortisona, cuando crecen sobre una matriz de colágeno).

En el momento en que las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa. Una vez que se alcanza la **confluencia** (las células ocupan todo el espacio de la superficie disponible) las células expresan sus aspectos más característicos, y es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario tomar algunas de estas células y resembrar en una nueva placa o frasco. Para esto se realiza un tratamiento con **Tripsina-EDTA**, proteasa más quelante de calcio, que permite romper y alterar las uniones intercelulares y con la matriz extracelular.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones (pases, subcultivos o resiembra), cuyo número es característico de cada tipo celular y condiciones del cultivo. De esta forma, los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario (no admite pases o subcultivos), mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases, y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases.

Es una observación generalizada que después de la tercera resiembra, el cultivo se estabiliza y homogeneiza: *el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo desplazando a los otros tipos celulares*. En general, si no se establecen condiciones selectivas las células del tejido conjuntivo, especialmente fibroblastos, serán las seleccionadas finalmente. Para evitar que las células más especializadas del cultivo se vean desplazadas de éste por los fibroblastos y otras células de rápido crecimiento, se han establecido protocolos detallados de medios selectivos específicos.

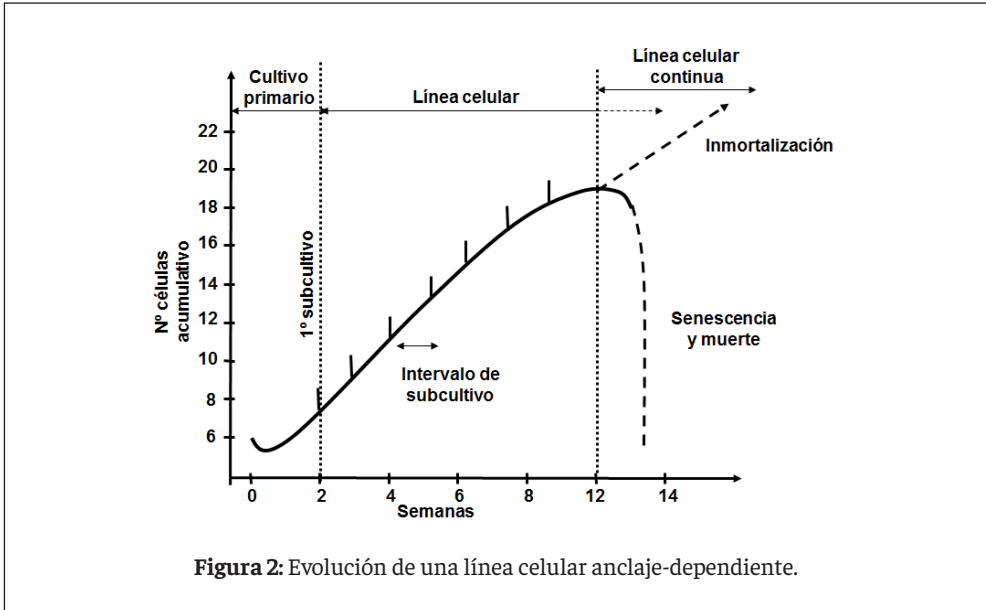
Independientemente del número de resiembra que soporte el cultivo primario, al final entrará en una **fase de senescencia**, con acumulación de numerosas anomalías y pérdida de funciones especializadas que conducen a la muerte del cultivo.

Sólo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas, debido a la aparición en el cultivo de **células inmortales**. Estas células forman **líneas continuas**. La razón de la inmortalización de estas células es en la mayor parte de los casos desconocida, pero se incrementa la frecuencia de inmortalización mediante la introducción de genes virales oncogénicos o tratamientos con mutágenos, por lo que debe estar relacionada con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular relacionadas con la senescencia. En el **fenómeno de inmortalización** se observa:

- tasa de crecimiento ilimitado (células inmortales).
- pérdida de los controles de senescencia.
- persistencia de algunos controles de la proliferación celular.
- proliferación anclaje dependiente.
- crecimiento en monocapa.

Alteraciones posteriores de la regulación de la proliferación celular en las líneas continuas, puede dar lugar a **células transformadas**. En el **fenómeno de transformación** observa:

- tasa de crecimiento ilimitado (células inmortales).
- alteración del control de proliferación celular.
- pérdida de la inhibición por contacto o densidad (crecimiento en multicapas).
- proliferación anclaje independiente.
- células pueden asociarse con malignidad.



2.5. EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

La característica principal que define al laboratorio de cultivo celular es el mantenimiento de la asepsia. La tasa de crecimiento de las células en cultivo es inferior al de los contaminantes habituales (hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas), y por ello, para el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo indeseado.

El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una parte del laboratorio tranquila, alejada de las vías de paso y a ser posible dedicada exclusivamente al cultivo de células. La solución ideal es disponer de una habitación aislada.

La aparición de cabinas de flujo laminar redujo las necesidades de aislamiento del área de trabajo, pero aun así es recomendable mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior o laboratorio general al interior de las cabinas de flujo donde se manipularán los cultivos y de la estufa donde se mantendrán.

2.5.1. INSTRUMENTACIÓN DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

- **Cabinas de seguridad biológica (CSB).** (ver capítulo 1 ítem 3)
- **Incubadoras.** Este equipamiento permite controlar 3 parámetros de gran importancia:
 - **Control de la Temperatura:** Las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura, siempre que estén por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden. Así, las células humanas soportan incubaciones a 4°C durante días y pueden ser congeladas en nitrógeno líquido a -196°C durante años (con sustancias preservantes). Sin embargo, no sobreviven más de unas pocas horas a variaciones de 2°C por encima de 37°C.
 - **Control del CO₂:** Las estufas contienen un dispositivo de inyección de una mezcla de aire y CO₂, en la proporción deseada, entre el 4 y el 7%.
 - **Control de la humedad ambiente:** Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo. En las incubadoras menos sofisticadas esto se consigue mediante bandejas de agua en el fondo de la incubadora.
 - **Control de la recircularización de aire:** Es importante una recirculación del aire en el interior de la incubadora, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior.
- **Instrumentos ópticos de observación.** El control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio. El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor hace que un microscopio convencional no sea adecuado (por su pequeña distancia frontal), por lo que se han desarrollado microscopios de diseño original, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.
- **Congeladores e instalación de criogenia.** Es preciso el almacenamiento de soluciones y células a diferentes temperaturas, para lo que se requiere: heladeras (4°C), congeladores (-20°C y -80°C) y unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C).

2.5.2. EL MEDIO DE CULTIVO

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones fisicoquímicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello, consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos:

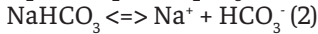
2.5.2.1. EL SOPORTE O SUSTRATO DE CULTIVO. La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente las células hematopoyéticas.

– **Materiales usados como sustrato:**

- *Vidrio*: escaso costo y fácil de limpiar y esterilizar, pero ha sido desplazado por el material desechable.
 - *Plástico desechable*: muy empleado en la actualidad como material desechable estéril por irradiación. El plástico más empleado es el poliestireno, de buena calidad óptica. Debido a que este plástico es hidrofóbico requiere un tratamiento mediante irradiación-gamma, químico, o mediante descargas eléctricas.
 - *Microsoportes*: se trata de soportes plásticos en forma de pequeñas esferas (“beads”) a las que se unen las células dependientes de anclaje. Estas esferas con las células adheridas se mantienen en suspensión.
 - *Superficies tratadas*: la adherencia y crecimiento de las células en un frasco mejora en muchos casos si la superficie ha sido tratada con el medio de crecimiento de otro cultivo (debido a la presencia de colágeno o fibronectina liberada por las células), o bien sobre superficies recubiertas de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, colágeno, vitronectina, etc.) o sobre capas *feeders*.
 - *Matrices tridimensionales*: Son sustratos en los que las células penetran, estableciendo una distribución tridimensional: geles de colágeno, esponja de celulosa sola, o recubierta de colágeno. En estas matrices muchos tipos celulares crecen y se establecen de una manera análoga al tejido de origen: células epiteliales de mama se organizan en disposición tubular, mientras que las células del carcinoma de mama lo hacen de una forma mucho más desordenada.
 - *Sustratos no adherentes* (agar, agarosa, o *methocell*), las células anclaje-dependiente no pueden adherirse y por ello, sirven para la selección de células transformadas.
- **Recipientes de cultivo**. El material más utilizado como sustrato es el **plástico desechable**, en forma de diferentes tipos de recipientes. Los más comunes son:
- *placas de Petri*: Disponibles en distintos tamaños, son las más empleadas cuando se trata de crecer las células para usar directamente en experimentos.
 - *multiplacas*: variante de las placas de Petri. Placas de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos.
 - *frascos de Roux*: Disponibles en diferentes tamaños, son recomendables para el mantenimiento de las líneas y la producción de células, o bien para el crecimiento de células en suspensión
 - *“roller bottles”*: Se trata de tubos, con una cara plana sobre la que se fija el cultivo, y que se incuban en estufas dotadas de “roller”, se destinan a la producción de gran número de células para la producción.

2.5.2.2. LA FASE GASEOSA. Mientras que las necesidades de oxígeno para la mayor parte de los cultivos celulares son cubiertas con la tensión atmosférica, el **dióxido**

de carbono (CO_2) juega un complejo papel en el medio debido a que influye sobre la cantidad de CO_2 disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO_3^- . Las reacciones que tienen lugar en el medio son:



El incremento de la concentración de ión bicarbonato desplaza la ecuación (1) hacia la izquierda, de modo que el pH se establezca en 7.4.

De modo que para establecer un pH determinado se debe tener en cuenta especialmente los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO_2 . Sin embargo, en la actualidad, se emplean otras sustancias tampones (ej. HEPES) en la formulación de muchos medios, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio, así como una mayor capacidad buffer.

2.5.2.3. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL MEDIO DE CULTIVO. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo, para muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se usan medios complejos que son medios suplementados con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos, imprescindibles para el mantenimiento del cultivo, pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.

La principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio "natural". Después de años de investigación en la composición de los medios, la elección de éstos sigue siendo empírica. Los principales medios empleados son:

- **Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM).** Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).
- **R.P.M.I. 1640.** Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión.
- **Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM).** Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el medio basal de Eagle (BME). Se usa para la selección de hibridomas.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

- **Soluciones salinas equilibradas:** Mezcla de sales inorgánicas, incluyendo usualmente bicarbonato sódico y suplementada con glucosa.
- **Aminoácidos:** Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. Asimismo, se suplementa con otros aminoácidos, pues los requerimientos pueden variar de una célula a otra. Un suplemento común es el de **glutamina 2 mM**, aunque hay algunas líneas celulares que pueden usar el glutamato.
- **Vitaminas:** El medio MEM sólo se suplementa con vitaminas del grupo B, siendo los demás grupos aportado por el suplemento de suero. En medios más de-

finidos se suplementan todas las vitaminas. Una concentración de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular.

- **Glucosa:** Es la fuente de energía en muchos medios.
- **Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular:** nucleósidos, intermedarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos, etc.
- **Hormonas y factores de crecimiento:** En los medios no definidos, son aportados por el **suero** que aporta proteínas (albúmina, fibronectina, globulinas, transferrina, fetuina), factores de crecimiento, hormonas (insulina), nutrientes y metabolitos (aminoácidos, glucosa, lípidos), y minerales (Fe, Cu, Zn). Los tipos de suero empleados son suero de ternera, suero bovino fetal, suero de caballo y suero humano. La utilización de suero, sin embargo, es problemática pues:
 - a pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el cultivo.
 - el suero varía de lote a lote, y cada uno se puede emplear como máximo 1 año.
 - cada cambio de lote de suero requiere realizar controles tediosos y costosos.
 - si se cultivan varios tipos celulares cada uno puede requerir un lote diferente.
 - si se han de purificar productos del medio de cultivo la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos.
 - algunos factores séricos como el factor de crecimiento plaquetario estimula la proliferación de fibroblastos, lo que puede ser un problema en el establecimiento de cultivos primarios especializados.
- **Antibióticos y antifúngicos:** A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo. Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Las mezclas de uso más común son:
 - Penicilina /Streptomycin: Combinación antimicrobiana.
 - Penicilina/Streptomycin/Fungizona: Combinación antimicrobiana y antifúngica.
 - Gentamicina: Antimicrobiano, conviene ir alternándose con la penicilina/streptomycin.
 - Amphotericin-B: Antifúngico.

2.5.2.4. PROPIEDADES FÍSICAS DEL MEDIO DE CULTIVO

- **Capacidad buffer y pH.** El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de los tipos celulares es de 7,4, aunque existen pequeñas variaciones. Algunas líneas normales de fibroblastos crecen mejor entre pH 7,4 - 7,7, y células transformadas lo hacen en el margen de pH de 7,0 - 7,4. El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0, amarillo a pH 6,5, azul-rojo a pH 7,6 y púrpura a pH 7,8.

- **Osmolaridad.** Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolaridad del medio, creciendo bien en el rango de 260-320 mOsm/kg, con pequeñas variaciones dependiendo de la especie considerada. Es recomendable emplear medios ligeramente hipotónicos para compensar la evaporación durante el periodo de incubación, especialmente en incubadoras sin control de la humedad ambiente.
- **Temperatura.** La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación.
- **Viscosidad.** La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y en la tripsinización.
- **Tensión superficial.** La tensión superficial se ha de mantener baja, y en general sólo se ve alterada por la aparición de espumas en los cultivos en suspensión donde se burbujea CO₂, el riesgo de contaminación aumenta si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo.

2.6. CONTAMINACIONES

Un problema frecuente en el cultivo de tejidos en general es el de las contaminaciones. Las células eucariotas en cultivo crecen lentamente, con tiempos de duplicación superiores en muchos casos a las 24 horas. Sin embargo, tanto las bacterias como las levaduras tienen una tasa de crecimiento superior. Si se produce una contaminación por estos organismos pueden provocar la muerte del cultivo en poco tiempo. Para evitarlo se utilizan una serie de técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, así como la esterilización del material y el trabajo en ambientes estériles. Asimismo, se utilizan cócteles de sustancias antimicrobianas y antifúngicas en el medio aunque en multitud de ocasiones no es posible usarlas o bien no son suficientes para prevenir la aparición de microorganismos.

Los medios de cultivo proporcionan un medio ideal para el crecimiento de los contaminantes microbianos, y los procedimientos habituales de manipulación (apertura de recipientes, pipeteado, etc) son susceptibles de provocar contaminación por bacterias, levaduras, hongos filamentosos. Para evitar las contaminaciones por bacterias es necesario extremar las condiciones de esterilidad y realizar una serie de controles sobre las soluciones y recipientes a usar. Así, es recomendable comprobar el estado de contaminación de cualquier tipo celular antes de introducirlo en las salas donde se trabaja con otros tipos celulares.

La fuente más frecuente de contaminación es la atmósfera. Las precauciones por tomar serán:

- trabajo en ambiente estéril, en una cabina de flujo laminar o en el área de influencia de un mechero bunsen.
- usar pipeteadores y pipetas automáticos.
- mantener los recipientes abiertos tan poco tiempo como sea posible.
- todas las botellas de medio y de soluciones atemperadas en un baño deben secarse cuidadosamente antes de usarlas.
- ante cualquier duda limpiar con alcohol 70%
- si se descubre un recipiente contaminado no se debe abrir. Si se han de tomar

muestras para su análisis conviene hacerlo en ambiente estéril y después limpiar cuidadosamente el área de trabajo y conectar la iluminación UV.

De todas formas, no es fácil reducir a una lista las precauciones a tomar y la única forma de aprender es practicar bajo supervisión.

2.7. CULTIVOS CELULARES DE MAYOR COMPLEJIDAD

Las células cultivadas en 3D se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen, por ello la información que se obtiene en los diferentes ensayos es superior comparado con los cultivos en 2D o cultivo tradicional.

Actualmente se dispone de una amplia gama de matrices naturales o artificiales que facilitan el desarrollo de técnicas de cultivos 3D, las que permiten recrear la estructura del tejido. Ver Matrices tridimensionales. Dentro de estos cultivos, y como señalado al inicio de este capítulo, se distinguen:

- **Cultivo histotípico.** Estos cultivos están formados por un solo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular, donde las células se reagrupan para recrear una estructura tridimensional parecida al tejido original. Los más utilizados implican el uso de matrices como gel de colágeno (*matrigel*).
- **Cultivo organotípico.** Estos cultivos se caracterizan porque constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí de una forma que intenta ser lo más similar posible a la original. Este tipo de cultivos permiten el desarrollo “*in vitro*” de tejidos completamente funcionales que podrían ser utilizados en injertos o en trasplantes.

Dentro de los más utilizados en virología se encuentra los cultivos epiteliales tipo *raft* (en balsa), los que representan un abordaje novedoso para el estudio de los virus capaces de infectar células epiteliales, dado que reproducen fielmente el proceso de diferenciación epitelial *in vitro*. Dichos cultivos pueden ser desarrollados a partir de queratinocitos primarios normales, explantes de tejido epitelial o líneas celulares estables, permitiendo que las células proliferen y se diferencian completamente en la interfase aire-líquido (grilla) sobre un soporte que equivale a la dermis (componente dérmico). Los queratinocitos humanos primarios normales se ordenan en forma estratificada y se diferencian totalmente en una forma similar a los tejidos epiteliales escamosos, mientras que las líneas celulares transformadas generan epitelios que presentan morfologías displásicas similares a las lesiones neoplásicas que se observan *in vivo* (Figura 3).

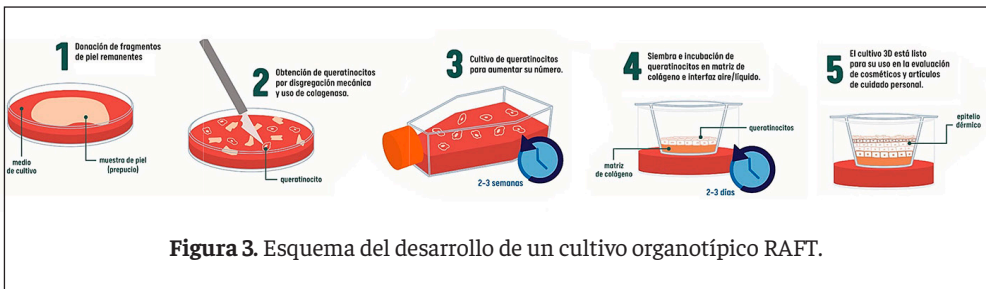


Figura 3. Esquema del desarrollo de un cultivo organotípico RAFT.

Bibliografía

- Capes-Davis, A. *et al.* (2021). *Freshney's culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. 8th edn. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.
- Čater M, Majdič G. In Vitro Culturing of Adult Stem Cells: The Importance of Serum and Atmospheric Oxygen. *Adv Exp Med Biol* 2022;1376:101-118.
- Andrei G, Duraffour S, Van den Oord J, Snoeck R. Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents. *Antiviral Res* 2010;85(3):431-49.
- Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12(4):207-18.
- Nims RW, Price PJ. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2017;53(10):872-879.

Capítulo 3

DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Diego **Chouhy**
Agustina **Cerri**
Germán R. **Perez**
Adriana A. **Giri**

3.1. ETAPA PREANALÍTICA

La calidad analítica se inicia con la integridad de los componentes o propiedades de la muestra biológica en el momento de su análisis. Aunque el proceso posterior, la fase analítica, se realice de la manera más correcta y controlada, sería absurdo presumir su calidad cuando no se controla correctamente y en su totalidad en el proceso pre-analítico. Cuando las muestras se envíen a otros laboratorios para su análisis, se deberá respetar las condiciones de envío, fechas de procesamiento, envíos de resultados, valores de referencia, etc. Corresponde establecer un acuerdo de colaboración con dicho laboratorio en el que figuren los conceptos antes mencionados, las responsabilidades de cada parte, los datos de identificación, la información clínica que proceda, los modos y tiempos máximos de envío y transporte.

3.1.1. MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO Y SU MONITOREO

Se deben tener en cuenta algunas consideraciones sobre las muestras a analizar:

- *Muestra adecuada.* Para obtener la muestra adecuada que será utilizada en el análisis virológico, es necesario conocer la patogenia de cada enfermedad para determinar en qué tipo de muestra biológica encontraremos una infección viral activa o una respuesta inmunológica (serológica).
- *Momento oportuno.* Si bien existen variaciones, el período de incubación de la mayoría de las infecciones virales es de 7 días. Luego de este período comienza la replicación activa del virus, que en general coincide con la aparición de los síntomas clínicos. Durante la última etapa de los síntomas clínicos aparecen los anticuerpos (Acs) específicos antivirales. Por ello, dependiendo del momento en que la muestra clínica pueda ser recolectada, se podrá realizar el diagnóstico virológico mediante la búsqueda del virus o de los Acs producidos por la respuesta inmune.
- *Correcta conservación y envío en caso de no ser analizada en el lugar de la toma.*
- *Adecuada realización de los procedimientos diagnósticos.*

Algunos ejemplos de muestras de elección para el estudio de infecciones virales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: MUESTRAS DE ELECCIÓN PARA EL ESTUDIO DE INFECCIONES VIRALES

MUESTRAS	AGENTES VIRALES
<i>Suero o plasma</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), Virus de la hepatitis B (HBV), Virus de la Hepatitis C (HCV).
<i>Aspirado nasofaríngeo (ANF)</i>	Virus Influenza tipo A (Flu-A), Virus Influenza tipo B (Flu-B), Virus Parainfluenza tipo 1 (PIV1), Virus Parainfluenza tipo 2 (PIV2), Virus Parainfluenza tipo 3 (PIV3), Virus Sincicial Respiratorio (RSV), Adenovirus (ADV), SARS-CoV-2.
<i>Hisopado nasofaríngeo (HNF)</i>	
<i>Lavados bronquioalveolares</i>	Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus Simplex tipo 1 (HSV-1), Virus Varicela Zoster (VZV).
<i>Raspado, hisopado o líquido vesicular de lesiones cutáneas</i>	HSV1, Herpesvirus Simplex tipo 2 (HSV-2), VZV.
<i>Hisopado o cepillado de lesiones genitales</i>	HSV-2, Virus Papiloma Humano (HPV).
<i>Células mononucleares de la sangre</i>	CMV, HIV-1.
<i>Materia fecal e hisopados rectales</i>	Rotavirus (RV), ADV grupo F.
<i>Orina</i>	CMV.
<i>Líquido cefalorraquídeo</i>	HSV-1, HSV-2, CMV, Virus Epstein-Barr (EBV), Enterovirus (EV), virus Zika (ZIKV).
<i>Muestras oculares</i>	HSV-1, ADV.
<i>Tejidos obtenidos en biopsias o autopsias</i>	CMV, EBV, Herpesvirus Humano tipo 8 (HHV-8).
<i>Médula ósea</i>	Parvovirus B19 (PV-B19).

3.1.2. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y CONFIABILIDAD

- *Anamnesis*: motivos del análisis solicitado, antecedentes del paciente.
- *Toma de muestra*: esterilidad del material, tipo de muestra, condiciones de conservación de la muestra, correcto rotulado, fecha de obtención.
- *Muestreo*: Es el proceso de fraccionamiento de una muestra clínica en dos o más tubos para enviar una misma muestra a diferentes laboratorios. Si este paso no se realiza con cuidado se puede contaminar la muestra o cometer errores de ro-

tulación, sobre todo cuando se realiza el muestreo de varias muestras clínicas al mismo tiempo.

- Almacenamiento
- Transporte

3.1.3. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

- *Para cultivo viral*: enviar en el medio de transporte adecuado, refrigerado a 4°C.
- *Para estudios serológicos*: pueden enviarse suero o plasma a temperatura ambiente si el envío es inmediato, a 4°C a los 1-2 días, a -20°C a los meses, o a -70°C a los años.
- *Para estudios de biología molecular*: generalmente se transportan a 4°C. No se debe usar heparina en la obtención de plasma porque inhibe la enzima *Thermus aquaticus* (Taq) ADN- polimerasa utilizada en la mayoría de los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cargas virales plasmáticas (CVP), se debe separar rápidamente el plasma y conservar a 4°C si se envía durante el día o congelar a -20°C (virus con genoma de ADN) o a -70°C (virus con genoma de ARN). Remitir la muestra congelada y transportarla con hielo seco al laboratorio donde se realizará el diagnóstico.

3.2. MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

3.2.1. CLASIFICACIÓN

El diagnóstico virológico, dependiendo del caso particular, puede determinar una intervención terapéutica, definir el pronóstico en la evolución de un paciente o indicar la necesidad de una vacunación. Desde un punto de vista epidemiológico, sirve para adoptar medidas de salud pública en una comunidad.

Los métodos de diagnóstico virológico se clasifican en 2 grandes grupos (Tabla 2):

- **métodos directos**: detectan la presencia del virus o sus componentes en muestras clínicas:
 - como agente infeccioso (aislamiento viral - **sólo en laboratorios de referencia**).
 - como partícula viral (microscopía electrónica - **sólo en laboratorios de referencia**).
 - detectando antígenos virales (técnicas de inmunomarcación)
 - detectando ácidos nucleicos virales (métodos de hibridación y de amplificación)
- **métodos indirectos**: investigan la respuesta humoral (Acs) específica del hospedero:
 - detectando la presencia de Inmunoglobulina M (IgM) específica
 - detectando la presencia de Inmunoglobulina G (IgG) específica
 - detectando la presencia de Inmunoglobulinas Totales (Igs) específicas
 - detectando la avidéz de las IgG específica
 - determinando conversión serológica (seroconversión) con muestras pareadas.

3.3. INDICADORES DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS

Es evidente que una prueba diagnóstica es ideal cuando arroja resultados positivos en individuos enfermos y negativos en sanos. La validez de un ensayo indica el grado en que un

ensayo diagnóstico mide lo que se supone que debe medir de un ensayo y se cuantifica con las proporciones clásicas de:

- **Sensibilidad:** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo (o infectado), es decir, la probabilidad de que en un sujeto enfermo la prueba arroje un resultado positivo. Por lo tanto, *es la capacidad del método para detectar la enfermedad (o infección).*
- **Especificidad:** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano (o no infectado), es decir, la probabilidad de que en un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, *es la capacidad para detectar a los individuos sanos.*

Tabla 2: CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

MÉTODOS DIRECTOS	
Aislamiento viral^(*)	- Cultivos celulares: Identificación por Efecto Citopático (ECP), por métodos de inmunomarcación, neutralización, fijación del complemento, etc.
Detección de partículas virales^(*)	- Microscopía electrónica
Detección de antígenos virales	- Métodos de inmunomarcación
Detección de genomas virales	- Métodos de hibridación - Métodos de amplificación: PCR, RT-PCR, qPCR, LAMP, RT-LAMP, RT-qLAMP, etc.
MÉTODOS INDIRECTOS	
Detección de Igs (anticuerpos)	- Conversión serológica: en muestras pareadas de suero (período agudo y de convalecencia). - IgM específica: en muestra obtenida en período agudo o convalecencia temprana. - IgG específica: en muestra obtenida en período de convalecencia.
^(*) solo en laboratorios de referencia	

Las pruebas orientadas al cribado o tamizaje (*screening*) deben tener una sensibilidad alta de forma de asegurar la detección de todos los enfermos, a pesar de la presencia de algunos falsos positivos, ya que no diagnosticar la enfermedad resulta peligroso para el paciente. Por otro lado, si diagnosticar a un paciente equivocadamente (falso positivo) provoca graves consecuencias, o es importante descartar o confirmar la enfermedad antes del inicio de un tratamiento se requerirá el uso de una prueba con alta especificidad.

Si bien, los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten valorar la validez de una prueba diagnóstica, carecen de utilidad en la práctica clínica. Esto es porque proporcionan información acerca de cuál es la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del individuo con respecto a la enfermedad, pero ya conociendo la condición de enfermo o sano. Cuando a un paciente se le realiza alguna prueba diagnóstica, el médico carece de la información a priori sobre su verdadero diagnóstico. La pregunta que se plantea sería: “ante un resultado positivo (o negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (o sano)?” Los indicadores de seguridad de un ensayo responden a estos interrogantes y son:

- **valor predictivo positivo (VPP):** probabilidad de padecer la enfermedad si se obtuvo un resultado positivo en la prueba diagnóstica.
- **valor predictivo negativo (VPN):** probabilidad de que un individuo con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano.

Estos indicadores son de gran utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico. No obstante, presentan la limitación de que dependen en gran medida de la prevalencia de la enfermedad a diagnosticar en la población objeto de estudio. De esta manera, cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad (VPN alto), mientras que un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico (VPP bajo). La *repetibilidad (fiabilidad)* evalúa la variación que se observa cuando el mismo operador mide lo mismo muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones (variación causada por el dispositivo de medición). Por otro lado, la *reproducibilidad* es la variación que se observa cuando diferentes operadores miden lo mismo muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones (variación causada por el sistema de medición).

Supongamos que quiere evaluar si dos ensayos de similares características (resultados dicotómicos: positivo / negativo) presentan discrepancias en los resultados. Entonces, para evaluar sin las medidas obtenidas por el método cuya calidad se desea valorar concuerdan con las obtenidas por otro método se realizan *estudios de concordancia*. Uno de los estadísticos más utilizado es *kappa de Cohen*.

3.4. INDICADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS MÉTODOS

Estos indicadores se utilizan para estimar la magnitud y trascendencia de una situación determinada. Siempre deben estar referidos a la población a partir de la cual se calculan, el periodo de tiempo que representan, y el lugar geográfico del cual proviene la información. Por ejemplo, se puede medir el impacto o los efectos de los programas de salud comparando un mismo indicador epidemiológico antes y después de la ejecución de las actividades de un programa determinado. Son ejemplos de indicadores epidemiológicos:

- **Incidencia:** refleja el número de “nuevos casos” en un periodo de tiempo. Es un índice dinámico que requiere del seguimiento en el tiempo de la población de interés. Cuando la enfermedad es recurrente se suele referir a la primera aparición. Se puede medir con dos índices: incidencia acumulada y densidad (o tasa) de incidencia.
- **Prevalencia:** Es la proporción de individuos de una población que presentan el evento en un dado momento o periodo de tiempo determinado. Por ejemplo, la preva-

lencia de diabetes en Rosario en el año 2001 es la proporción de individuos de esa ciudad que en el año 2001 padecían la enfermedad.

3.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS INDIRECTOS

3.5.1. ENSAYO DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS (EIA)

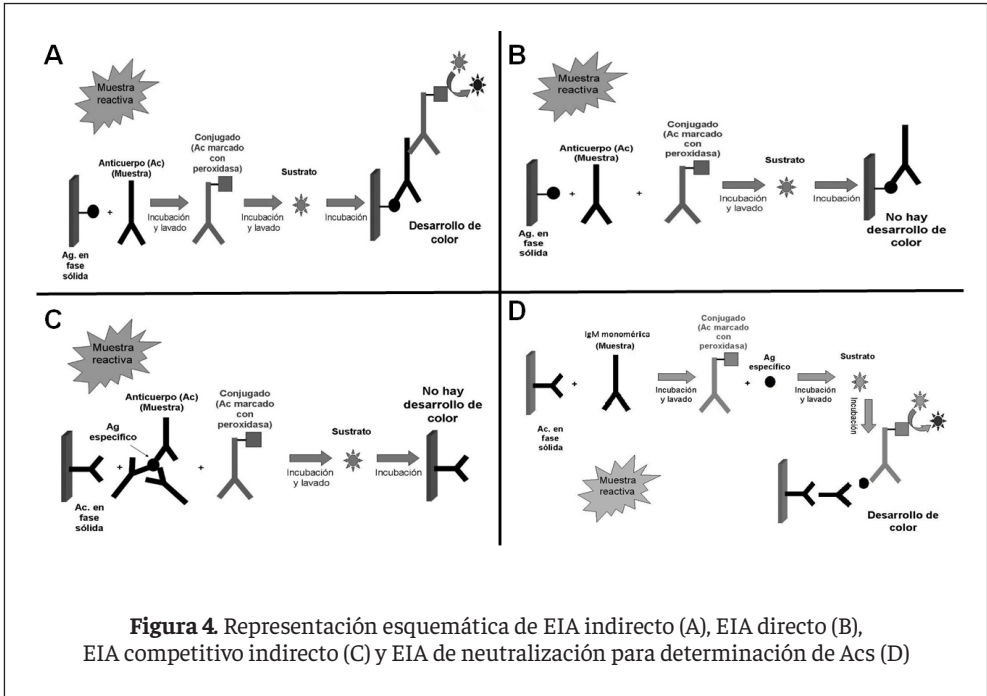
Utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones (*formatos*) de EIA para detectar y cuantificar antígenos o Acs, donde el marcador enzimático utilizado se conjuga con un ligando (Acs específicos contra el antígeno de interés o Acs secundarios contra los Acs primarios). Casi todos los EIA son *ensayos en fase sólida* en los cuales se adsorbe un Ac sobre un soporte sólido. Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todos los EIA se requiere de un paso de lavado para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para la determinación, se añade un sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato.

Los Acs utilizados pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser utilizados como Acs primarios o secundarios. Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante o de péptidos sintéticos, y al igual que los Acs, se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos.

Los EIA varían en los soportes utilizados, los agentes reveladores y el equipamiento para detectar la señal (quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, etc).

- **EIA INDIRECTO** (Figura 4A): para la determinación de Acs se recubre el pocillo con el antígeno, y se aplica la muestra problema en la que se buscan los Acs. Luego del lavado para eliminar el excedente no unido se agrega un Ac secundario anti-Ac humano marcado (anti-IgG, anti-IgM, anti-Igs totales, etc.). Se realiza un segundo lavado y se agrega el sustrato para observar el desarrollo de color.
- **EIA COMPETITIVO INDIRECTO** (Figura 4B): se recubre el pocillo con el antígeno de interés; se aplica la muestra (en la que se buscan los Acs) y un Ac anti-antígeno marcado (en defecto y de menor especificidad). Ambos Acs competirán por el antígeno inmovilizado y después de un lavado que elimina el material no retenido se aplica el sustrato. La ausencia de color indica la presencia del Ac específico en la muestra.
- **EIA DE NEUTRALIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE Acs** (Figura 4C): se recubre el pocillo con un primer Ac anti-antígeno. Se incuba la muestra problema junto al antígeno sintético y a un Ac anti-antígeno marcado. Después de un lavado que elimina el material no retenido se agrega el sustrato. En caso de que la muestra problema contenga los Acs específicos, éstos neutralizarán al antígeno, impidiendo que sea capturado por los Acs de la fase sólida y como consecuencia no dejarán que el Ac marcado reconozca el antígeno. Por lo tanto, la ausencia de color indica que la muestra es reactiva para el Ac estudiado.
- **ENSAYOS DE EIA DE CAPTURA DE IgM** (Figura 4D): Los pocillos de la microplaca se recubren con un Ac anti-IgM (específico contra la porción Fc de las IgM monoméricas, del pool de las IgM totales). En la primera incubación se capturan

todas las IgM presentes en la muestra. Luego del lavado se agrega el antígeno específico y un Ac secundario anti-antígeno marcado. Se realiza un segundo lavado para eliminar todos los excedentes y se agrega el sustrato para observar el desarrollo de color.



3.5.2. INMUNOCROMATOGRAFÍA O ENSAYO DE FLUJO LATERAL

Es una técnica ampliamente utilizada por su simplicidad y rapidez. Está conformada por una tira de nitrocelulosa y distintas almohadillas porosas ensambladas en un *cassette* plástico (Figura 5). La muestra a determinar se agrega en la zona de conjugado, que posee Ac específicos contra el antígeno viral y un reactivo de detección. En presencia del antígeno en la muestra, el complejo Ag-Ac migrará por la membrana de nitrocelulosa. En la zona de captura se encuentra la “línea de prueba”. Allí un segundo Ac específico se une a un epítipo diferente del antígeno viral, captura el complejo quedando retenido y formando un precipitado coloreado. La “línea control” contiene otro tipo de Ac inmovilizado que reconoce al primer Ac y forma un precipitado coloreado, esté o no unido al antígeno viral. Esta línea asegura que haya ocurrido la correcta migración de la muestra por la membrana. La implementación de esta tecnología está pensada para el diagnóstico en el punto de atención (*Point-of-Care Testing*) o para laboratorios de baja complejidad, debido a que, si bien requiere personal profesional, el grado de especialización es mínimo.

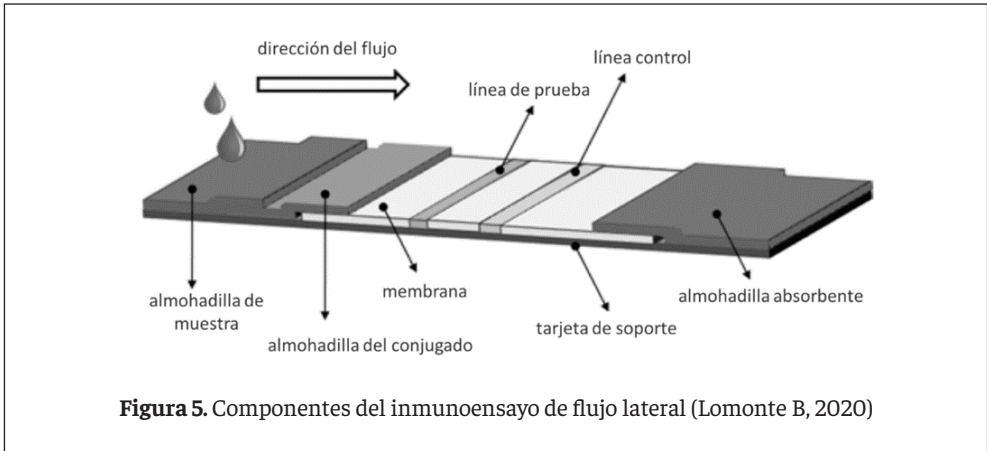


Figura 5. Componentes del inmunoensayo de flujo lateral (Lomonte B, 2020)

3.5.3. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Estos ensayos presentan un fundamento similar al EIA, pero los Acs policlonales o monoclonales están conjugados con una molécula fluorescente (fluorocromo). Los fluorocromos emiten luz de una determinada longitud de onda luego de ser excitados por un haz de luz de longitud de onda menor. Cada fluorocromo es capaz de emitir luz dentro de un determinado espectro de longitud de onda. El fluorocromo más utilizado es el *Isotiocianato de Fluoresceína* (FITC) que emite en la gama del verde.

La **INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)** permite la detección de Acs específicos (IgG, IgA e IgM, totales) presentes en el suero del paciente mediante la incubación del suero del paciente con células infectadas o transfectadas que expresan el/los antígenos virales y que se encuentran fijadas a un portaobjetos. El revelado se realiza mediante la incubación con un Ac anti-Fc de las Igs humanas conjugado con un fluorocromo. Luego se realiza la observación de las células al microscopio de fluorescencia (Figura 6).

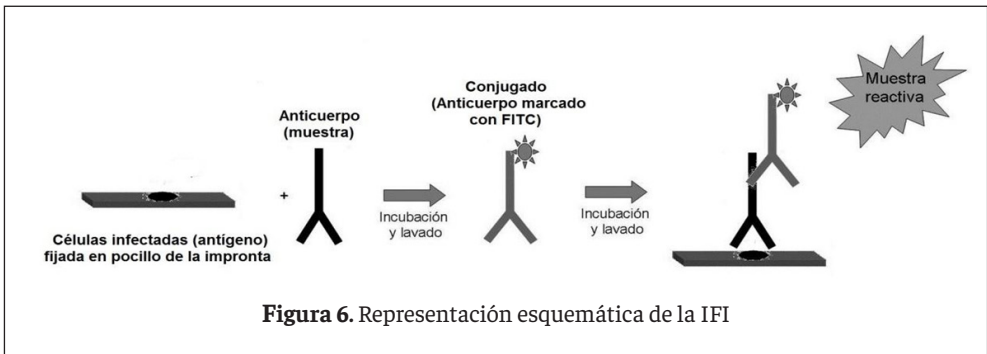


Figura 6. Representación esquemática de la IFI

3.5.4. ENSAYOS DE WESTERN BLOT E INMUNOBLOT

Son técnicas suplementarias que se utilizan habitualmente para el diagnóstico de una infección viral. Estos métodos se comercializan como tiras de nitrocelulosa o nylon que contienen las proteínas virales fijadas que se incuban con el suero del paciente en busca de Acs específicos.

- **WESTERN BLOT:** se emplea como prueba suplementaria para la detección de Acs para el diagnóstico del HIV en el suero de pacientes con serología positiva determinada por técnicas de tamizaje (EIA por ejemplo). Las tiras poseen antígenos de HIV, separados por peso molecular, *obtenidos de cultivo viral*. Luego de su incubación con el suero del paciente, los Acs específicos contra las proteínas virales quedarán fijados en las mismas. El revelado se realiza mediante la incubación posterior de las tiras con Acs anti-IgG humano conjugados a fosfatasa alcalina. En este caso se utiliza como revelador un reactivo que precipita sobre las tiras observándose una banda en el sitio de reacción.
- **INMUNOBLOT:** conocidas con las siglas LIA (por sus siglas en inglés *Linear Immune Assay*) o RIBA (por sus siglas en inglés *Recombinant Immuno Blotting Assay*), son comúnmente utilizadas, al igual que el Western Blot, en la detección de Acs específicos. En este caso, las proteínas virales fijadas sobre tiras de nitrocelulosa son recombinantes o sintéticas, siendo dispensadas de forma individual en la tira en diferentes posiciones.

3.6. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DIRECTOS

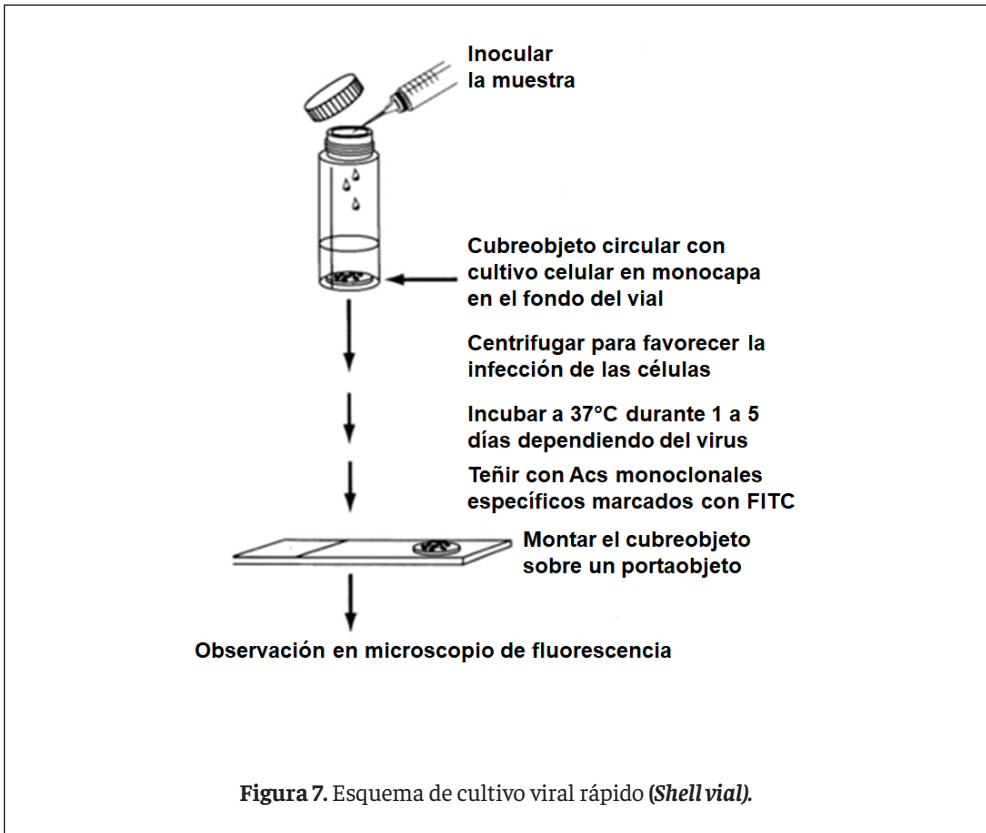
3.6.1. AISLAMIENTO VIRAL

El aislamiento e identificación por cultivo celular es la metodología “*gold standard*” para la detección de virus. Estas técnicas dependen de la selección de distintos parámetros:

- **Selección de la línea celular:** una variedad de líneas celulares puede ser usadas para los aislamientos virales y la elección de la línea celular depende de la sensibilidad de las células a la partícula viral (susceptibilidad), distinción del efecto citopático producido en esas células, características del crecimiento celular y mantenimiento del cultivo. Cuando los especímenes son inoculados, el cultivo celular debería estar en fase exponencial de crecimiento, y libre de contaminantes.
- **Inoculación de la línea celular:** las muestras que llegan al laboratorio para aislamiento deben ser previamente procesadas antes de ser inoculadas al cultivo. En general esto incluye pasos de agitación o filtración. Para su inoculación, se debe retirar el medio de cultivo del frasco a utilizar y entonces se adiciona la muestra diluida en medio de cultivo sin suero. El frasco con el cultivo inoculado se incuba 1-2 horas a 35-37°C en agitación suave para promover la adsorción del virus a la célula. Posteriormente, se agrega medio de cultivo suplementado y se incuba en estufa gaseada a 37°C durante un periodo variable según el virus en estudio de 7 a 30 días. Durante este tiempo, el medio de cultivo debe ser reemplazado si se observan cambios drásticos de pH.

- **Detección de la infección viral:** se puede realizar por distintos métodos:
 - **Efecto citopático (ECP):** muchos virus producen cambios degenerativos en las células cuando replican en un cultivo de células susceptibles y permisivas, produciendo alteraciones morfológicas que en su conjunto se denominan “Efecto citopático”. La mayoría de los virus comúnmente aislados en el laboratorio producen ECP visible microscópicamente, siendo ésta la técnica de elección para el reconocimiento de infección viral de las células. Sin embargo, el desarrollo de ECP permite reconocer que se ha aislado un virus, sin poder afirmar de qué virus se trata. El ECP sirve solamente para orientar debido a que distintos virus pueden desarrollar ECP de características similares. La identificación del virus aislado generalmente se realiza por procedimientos inmunoquímicos. Algunos de los términos usados para describir distintos ECP incluyen **citoplasma vacuolado** (presencia de regiones tipo burbuja en el citoplasma celular), **sincicio** (fusión de células en una masa multinucleada denominada célula gigante, conteniendo entre 2-100 núcleos, ej: RSV) y **degeneración granular** (el citoplasma se vuelve algo retráctil y adquiere la apariencia de suciedad).
 - **Hemaglutinación:** durante la replicación, virus respiratorios como virus influenza o virus parainfluenza producen hemaglutininas que se insertan en la membrana plasmática de la célula infectada. Como estas proteínas se unen a eritrocitos, las células infectadas pueden identificarse usando esta propiedad, mediante la observación de cadenas, rosetas o agrupaciones de eritrocitos.
 - **Recuento de placas:** El ECP para virus líticos puede ser detectado macroscópicamente mediante el ensayo de formación de placas en cultivos de monocapas bajo un medio semi-sólido (por ejemplo, agarosa). Cada virión se replica y produce un foco, placa o clon de células infectadas. Dicha placa presenta diferente tinción con respecto a las células no infectadas. Por ejemplo, las placas no toman el colorante Rojo Neutro, y entonces aparecen como manchas claras contra un fondo rojo oscuro. Las placas se cuentan visualmente y se puede conocer así, el título viral del inóculo. Este método se conoce como el método de cuantificación viral mediante el recuento de las unidades formadoras de placas (UFP).
 - **Detección de Antígenos virales mediante inmunofluorescencia directa:** En el caso de detección de antígenos virales, se utiliza un anticuerpo específico antiviral (por lo general IgG) a cuya fracción Fc se ha conjugado una molécula marcada (por lo general, FITC), para visualizar la reacción, utilizando un microscopio de fluorescencia. Esta técnica, además de utilizarse para una identificación rápida del virus directamente sobre la muestra (por ejemplo: células eluidas de un lavado nasal, o de un aspirado nasofaríngeo), se la puede emplear para la confirmación del ECP observado en cultivos celulares. Con el progreso del uso de cultivo celular para el aislamiento de virus (cultivo viral) se desarrollaron técnicas que pudiesen disminuir los largos periodos

de incubación necesarios para el desarrollo de efecto visible en el cultivo por parte del virus (por ejemplo, ECP). De esta manera se idearon cultivos mejorados por medio de centrifugación denominados **cultivo rápido** o **Shell Vial**. Estos tipos de cultivos son tubos de vidrio cortos de base plana en cuya base interna se coloca un cubreobjeto circular de 12 mm de diámetro sobre el cual se crece un cultivo celular. La monocapa desarrollada en el cubreobjeto es inoculada por la muestra y se centrifuga a alta velocidad durante 30 minutos con el fin de favorecer la infección viral de las células. Se adiciona medio de cultivo y se incuba a 35 - 37°C durante 1 - 5 días (dependiendo del tipo de virus a aislar). Posteriormente, se retira el cubreobjeto, se coloca sobre un portaobjeto y las células son fijadas con acetona en frío. Sobre las células fijadas se realiza una tinción con anticuerpos específicos del virus que se quiera identificar, conjugados con FITC, y se observa al microscopio de fluorescencia (Figura 7).



3.6.2. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

La microscopía electrónica (ME) diagnóstica de virus se utiliza en enfermedades infecciosas humanas después de que otros métodos hayan fallado. Proporciona una “visión abierta” de la muestra sin la necesidad de sondas específicas, como anticuerpos o ácidos nucleicos. En los últimos años, el papel de la ME en el diagnóstico de infecciones virales ha pasado a ser una prueba de detección inicial para la identificación de agentes infecciosos desconocidos en brotes particulares o grupos de transmisión viral. Además, tiene la ventaja de poder identificar potencialmente infecciones múltiples causadas por más de un virus, que podrían pasar desapercibidas con las pruebas moleculares o de antígenos. Además, la naturaleza de las muestras a analizar puede ser diversa, desde fluidos corporales o biopsias analizadas directamente o después del cultivo celular.

3.6.3. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

Se realiza a través de múltiples técnicas de inmunoanálisis, las cuales se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. En todas estas técnicas es necesario conocer el antígeno a detectar, de manera de definir el anticuerpo específico para dicho fin. La denominación de las técnicas de inmunoanálisis se basa en el tipo de marcador utilizado para evidenciar la unión del anticuerpo con el antígeno.

En la **inmunofluorescencia Directa (IFD)** se realiza la inmunotinción de los antígenos virales presentes en el citoplasma, núcleo o membrana celular de células infectadas provenientes del paciente (por ejemplo, células provenientes de un aspirado nasofaríngeo). El revelado se realiza mediante la incubación de Acs específicos contra el virus conjugado con un fluorocromo. Luego se realiza la observación de las células al microscopio de fluorescencia (Figura 8A).

En el **EIA de captura de antígeno** o **EIA directo** el soporte sólido se recubre con un primer anticuerpo anti-antígeno y se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el soporte al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno conjugado a una enzima que al reaccionar con un sustrato produce un producto coloreado visible. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Figura 8B).

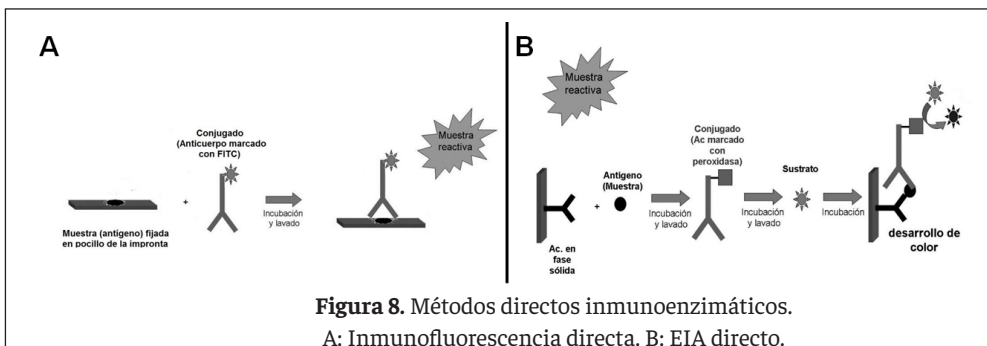


Figura 8. Métodos directos inmunoenzimáticos.

A: Inmunofluorescencia directa. B: EIA directo.

Otras técnicas de inmunoanálisis se basan en la simple aglutinación que ocurre al unirse el antígeno con el anticuerpo, formándose grandes complejos que sedimentan. Esta sedimentación es fácilmente visible, por lo que la técnica es rápida y sencilla. Por otro lado, la **inmunocromatografía** se basa en la detección del complejo antígeno-anticuerpo sobre una membrana de nitrocelulosa. La muestra se hace migrar por capilaridad sobre esta membrana, la que tiene los anticuerpos antivirales específicos fijados y que evidenciarán la unión del antígeno mediante una banda de color oscuro. Ambas pruebas requieren mínima infraestructura y pueden estar disponibles en cualquier centro de salud.

3.6.4. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES (MÉTODOS MOLECULARES)

Durante las últimas décadas la tecnología para la detección de ácidos nucleicos virales ha experimentado un enorme impulso, con el desarrollo de reactivos estandarizados y la disponibilidad de métodos comerciales de elevada sensibilidad y especificidad. Los métodos moleculares de diagnóstico amplifican segmentos específicos de ácidos nucleicos virales (ADNv o ARNv). Es por ello, que son susceptibles a contaminaciones con secuencias previamente amplificadas (*carry-over*). Cada ciclo de amplificación genera un gran número de copias de ADN/ARN, donde muchas veces se pueden llegar a producir aerosoles que contienen hasta 20.000 copias en una única gota. De esta forma, el diseño y equipamiento del laboratorio sirve para minimizar el riesgo de contaminación, siendo necesario separar físicamente las diferentes partes del proceso y disponer los espacios de manera que haya un flujo de trabajo unidireccional. Esta separación consta idealmente de 3 espacios diferentes que son:

- la sala de preparación de reactivos (pre-PCR)
- la sala de preparación de muestras
- la sala de amplificación y detección (post-PCR).

Es importante considerar que el flujo de trabajo debe ser siempre unidireccional (Pre PCR → Preparación de la muestra → Post PCR) y nunca se debe llevar ningún material o equipamiento en forma inversa. Es sumamente importante que cada área tenga su propio equipamiento y consumibles.

En los **métodos moleculares de hibridación** se emplean sondas de ADN o ARN para la detección de secuencias virales. Para ello, es primeramente se separan las 2 cadenas de ácidos nucleicos mediante elevación de la temperatura por encima de la temperatura de fusión (T_m) o con tratamiento alcalino. Posteriormente, mediante la disminución de la temperatura se logra la hibridación de las hebras complementarias. La estabilidad de los dúplex formados depende de las interacciones hidrofóbicas entre las bases apiladas y de los puentes de hidrógeno entre las purinas y pirimidinas complementarias de las dos cadenas (3 puentes de hidrógeno entre C:G, y dos entre A:T y A:U). La detección habitual de este híbrido es mediante el uso de una de las cadenas (o sonda) marcada (molécula fluorescente, enzima, biotina, etc). Los ejemplos más comunes son:

- **DOT BLOT:** el ADN o ARN proveniente de la muestra es sembrado sobre un filtro de nitrocelulosa o nylon y fijado mediante calor o radiación ultravioleta de forma que quede un punto de unos 5 mm². El ADN (**SOUTHERN BLOT**) o ARN (**NORTHERN BLOT**) de una muestra puede ser también separado mediante la técnica de electroforesis en gel. Estos fragmentos se transfieren y se fijan posteriormente a membranas de nitrocelulosa o nylon. Las sondas se fabrican mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten la incorporación de nucleótidos radiactivos (sonda radiactiva) o nucleótidos con marcas como biotina o fluoresceína (sondas no radiactivas). También se utilizan oligonucleótidos sintéticos marcados para la detección de genomas virales.
- **CAPTURA HÍBRIDA:** técnica cualitativa utilizada comúnmente para el diagnóstico del HPV. En este ensayo la muestra clínica es sometida a desnaturalización y posterior hibridación con una mezcla de sondas de ARN. Si la muestra contenía HPV se formarán moléculas híbridas ADN-ARN las cuales son capturadas en los pocillos de una microplaca por un Ac que reconoce estos dúplex. Luego son detectados por un segundo Ac que produce una reacción quimioluminiscente.

En los **métodos moleculares de amplificación** se emplean oligonucleótidos (cebadores) y enzimas específicas para la creación o formación de múltiples copias de un segmento génico. Las principales ventajas de estos métodos son su rapidez (posibilidad de obtener resultados en pocas horas), sensibilidad (pueden detectar pocos genomas virales) y especificidad (capacidad de discriminar distintas variantes de un mismo virus). Los métodos de amplificación pueden clasificarse en:

- **AMPLIFICACIÓN NO ISOTÉRMICA:** PCR y sus variantes: retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), PCR *multiplex*, PCR anidada o *nested*, PCR en tiempo real (qPCR), RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), etc.
- **AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA:** Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación mediada por transcripción (TMA), etc

Independientemente de la tecnología utilizada, los métodos de amplificación constan de 3 etapas:

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: incluye la liberación y concentración del ácido nucleico presente en la muestra y la eliminación de eventuales inhibidores de la amplificación (grupos hemo, heparina, detergentes iónicos, etc). La frase referida a las técnicas de amplificación "*pueden detectar una única molécula en solución en una pileta olímpica*" es verídica si la reacción está optimizada, pero aún queda el problema de transferir todo el contenido de la pileta a un tubo de reacción. La intención de aumentar la sensibilidad del ensayo aumentando el volumen de la muestra puede servir en algunas determinaciones, pero no en otras. Algunas muestras clínicas presentan inhibidores que no son eliminados en el proceso de preparación, por lo cual el aumento del volumen o la concentración de la muestra provocan también el aumento de los inhibidores, con la consecuente aparición de resultados falsos negativos.

- **AMPLIFICACIÓN:** esta etapa depende del criterio en la elección de cebadores y sondas, y del perfil térmico adecuado. Debe cumplir con los requisitos analíticos óptimos de la reacción (eficiencia, límite de detección, reproducibilidad, especificidad, etc).

- **DETECCIÓN:** dependerá de la presencia inicial de la secuencia blanco para su visualización (gel de agarosa, hibridación a una sonda específica en fase líquida o sólida, etc).

Para asegurar un resultado obtenido por estos ensayos moleculares, dada las diferentes plataformas de amplificación (equipos de PCR) y marcas de reactivos, se requiere incorporar en cada análisis de muestras los siguientes controles:

- **Control positivo (CP):** permite controlar el proceso de amplificación de la secuencia blanco. Puede usarse la secuencia específica que se quiere detectar clonada en un plásmido o una muestra positiva para el microorganismo a analizar.
- **Control negativo (CN):** mediante una muestra libre de las secuencias blanco (células no infectadas con el virus que se está analizando) permite controlar la *especificidad* de la reacción. El ácido nucleico del CN debe haber sido obtenido con el mismo procedimiento e iguales condiciones que los utilizados para preparar las muestras clínicas.
- **Control de reactivos (CR):** permite verificar eventuales contaminaciones de los reactivos utilizados en la reacción con productos amplificados previamente (*carry-over*). Se reemplaza el volumen de ácido nucleico purificado con H₂O calidad tipo I o el buffer que se utilizó para eluir las muestras (Buffer TE) después de la purificación de los ácidos nucleicos.
- **Control endógeno (CE):** permite verificar la calidad e idoneidad de la muestra mediante la detección de secuencias genómicas del hospedero distintas del blanco (β -globina, HLA, citocromo C, etc.) simultáneamente con las secuencias blanco si los perfiles térmicos y las condiciones de amplificación de estas secuencias son similares.
- **Control interno (CI):** es una secuencia conocida de ADN/ARN distinta a la secuencia blanco, que se añade a la muestra clínica y se purifica y co-amplifica junto a la secuencia blanco. El CI permite asegurar que todo el proceso (purificación de los ácidos nucleicos, amplificación y detección) ha ocurrido correctamente, descartando posibles fallas que puedan ocurrir como la falta de adición de algún reactivo o la presencia de inhibidores. Existen 2 formatos de CI:
 - **Competitivos:** la secuencia blanco y el CI se amplifican con un mismo set de cebadores, en el mismo tubo de reacción y en las mismas condiciones. En este caso la secuencia blanco y el CI difieren en la secuencia interna comprendida entre los cebadores para que puedan ser diferenciados.
 - **No competitivo:** la secuencia target y el CI se amplifican con diferentes pares de cebadores. Son dos reacciones diferentes, con cinéticas distintas que deben producirse en las mismas condiciones. Entre las desventajas que posee este formato, podemos mencionar que la amplificación del CI no refleja la amplificación de la secuencia blanco ya que se utilizan cebadores distintos; al ser dos reacciones distintas, se debe optimizar bajo las mismas condiciones. La principal ventaja es que se puede utilizar para diferentes ensayos en el mismo laboratorio.

3.6.4.1. PCR EN TIEMPO REAL (qPCR). En las últimas décadas se han desarrollado innumerables aplicaciones de la PCR en microbiología clínica, consolidándose como un procedimiento realmente útil en virología, al ser una buena alternativa a otros métodos. *En la qPCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior.* La señal de fluorescencia se mide durante cada ciclo de amplificación, pudiendo relacionar la emisión de fluorescencia producida en la reacción con la cantidad de amplicones formados. Para ello, los termocicladores convencionales incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir la fluorescencia emitida en cada tubo donde se lleve a cabo la reacción, o sea, en tiempo real. La química empleada en la qPCR (Figura 9) se basa en el uso de:

- **Agentes intercalantes:** fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble hélice. El más empleado en qPCR es el SYBR Green. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de ser universal (no depende de la secuencia a amplificar), pero su principal inconveniente es la baja especificidad dada su unión indistinta a productos generados específicamente o dímeros de cebadores. De esta forma, en reacciones de qPCR con agentes intercalantes la especificidad de la reacción viene determinada únicamente por la selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Cuando se utiliza esta química de reacción, es necesario realizar un paso extra de post-qPCR que consiste en la realización de un **análisis de la curva de fusión:** mientras la temperatura aumenta paulatinamente, el instrumento va midiendo fluorescencia; de esta forma el ADN bicatenario se desnaturaliza y se vuelve monocatenario, lo que hace que el agente intercalante se disocie de él y la fluorescencia disminuya. La variación en la pendiente de esta curva se representa como una función de la temperatura para obtener la curva de fusión. La temperatura de fusión de un amplicón viene dada por la longitud de la secuencia y las bases que la componen. Idealmente, un ensayo específico debería mostrar un solo pico de fusión, que se corresponde con un producto de PCR específico. Este análisis nos permite determinar la presencia de los dímeros de cebadores o de un producto de amplificación no específica.
- **Sondas fluorescentes:** son oligonucleótidos que se hibridan específicamente a la secuencia interna del producto amplificado otorgando especificidad a la reacción, y reduciendo la probabilidad de detectar productos inespecíficos o dímero de cebadores. El sistema utiliza la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre una molécula emisora de fluorescencia (fluorocromo) y una molécula aceptora (extintor o *quencher*). Se distinguen distintos tipos de sondas:
 - **Sondas de hidrólisis:** son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar

con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq ADN-polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciendo la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector.

- **Balizas moleculares (Molecular beacons):** son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptor en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de tallo-burbuja; en la secuencia de la estructura de burbuja reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor están muy cerca uno del otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero.
- **Sondas FRET:** el sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

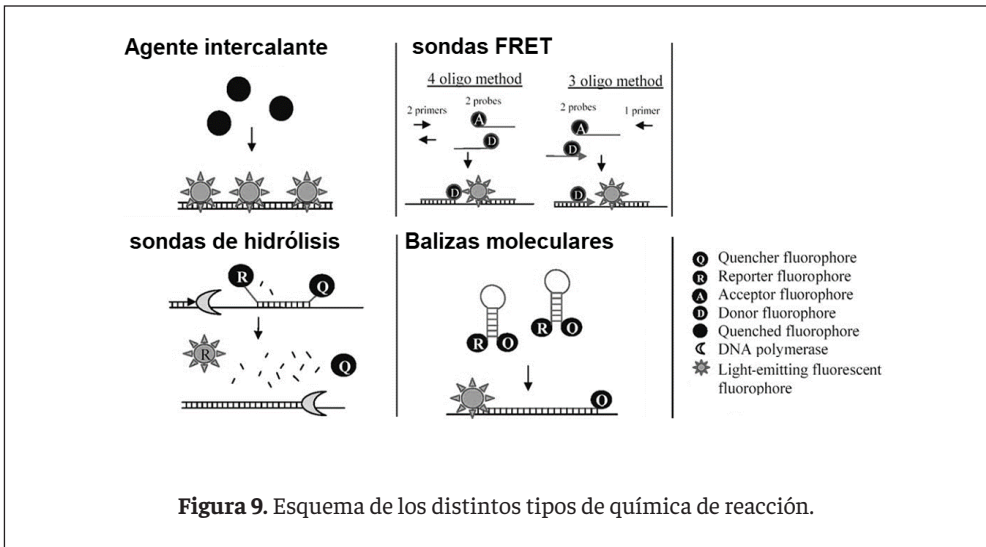


Figura 9. Esquema de los distintos tipos de química de reacción.

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

La primera gran ventaja de la qPCR es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección, y por ello estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la qPCR es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante.

Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango dinámico mucho mayor ($5 - 6 \log_{10}$) que en los procedimientos convencionales ($2 - 4 \log_{10}$). Asimismo, la determinación de mutaciones puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para qPCR tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR *multiplex*, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

3.6.4.2. AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP). Fue desarrollada en el 2000 por Notomi y col, con el objetivo de tener un método de amplificación alternativo a la PCR y que mantenga su sensibilidad y especificidad, pero que pudiera ser utilizada fuera de los laboratorios de diagnóstico y en los sitios de atención primaria (*point-of-care*), siendo rápidos, sensibles y precisos sin necesidad de equipamiento de alta complejidad.

El ensayo involucra 2 tipos de reacciones de amplificación de templados a partir de una estructura de asa formada en el extremo terminal 3' y la unión y elongación de nuevos cebadores de la región de asa. Para ello, se emplean 2 pares de cebadores:

- primer par de cebadores que flanquean la región de interés denominados F3 (cebador externo sentido) y B3 (cebador externo antisentido)
- segundo par de cebadores que se denominan FIP (cebador interno sentido) y BIP (cebador interno antisentido).

Estos 4 cebadores reconocen 6 regiones distintas en una región genómica de interés (Figura 10). Los cebadores internos FIP y BIP están constituidos por una región denominada F1c y B1c, respectivamente, seguido de un espaciador de timina (TTTT) y la región F2 o B2 que son complementarias a la región F2c o B2c (localizadas en la cadena complementaria). Los cebadores externos F3 y B3 son complementarios a F3c y B3c en la secuencia blanco de amplificación. Una modificación de diseño original es la inclusión de un par de cebadores llamados Loop-primer-F y Loop-primer-B, que contienen secuencias complementarias entre las regiones F1 y F2 / B1 y B2 donde se forma el asa, implicando un número mayor de puntos de partida para la síntesis del DNA, lo que se ve reflejado en la disminución del tiempo de amplificación.

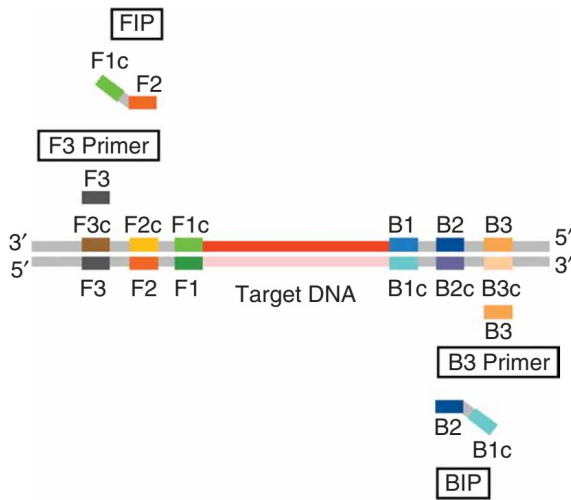


Figura 10. Diseño de los cebadores para LAMP.
Tomado de Tomita N, 2008.

El método utiliza la “Bst” DNA polimerasa termoestable proveniente del *Bacillus stearothermophilus*. La Bst DNA polimerasa posee:

- actividad de helicasa para abrir la doble cadena de DNA
- actividad de exonucleasa 5'-3'(carece de actividad de corrección exonucleasa 3'-5')
- actividad polimerasa con rango óptimo entre 60-65°C.

En la primera etapa de la reacción de amplificación, F2 del cebador FIP se alinea y se une a la secuencia blanco quedando sin hibridar la secuencia F1c. Así, la Bst DNA polimerasa sintetiza una primera cadena desplazándola. El cebador F3 se alinea en su secuencia complementaria y se sintetiza una nueva cadena, liberando la primera cadena sintetizada. En el extremo 3' de la cadena recién liberada, el cebador BIP sigue el mismo proceso que FIP (la secuencia B2 del cebador BIP se alinea en la primera cadena liberada, la Bst DNA polimerasa sintetiza la cadena y B3 se alinea e inicia la copia de la misma). Se libera una segunda cadena conteniendo las regiones antisentido en los extremos, por lo que se alinean entre ellos formando la estructura de bucles en ambos extremos. Los cebadores continúan alineándose con las regiones complementarias en la fase de amplificación exponencial, donde se forman repetidos invertidos de la secuencia blanco por extensión repetida, y las reacciones de elongación se repiten secuencialmente por la actividad de desplazamiento de cadena a una temperatura constante, formando diferentes estructuras de manera azarosa (Figura 11).

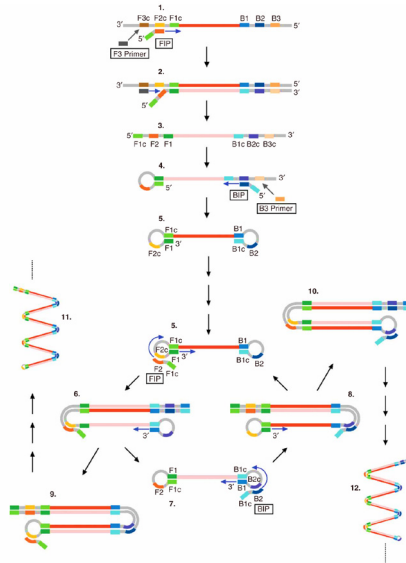


Figura 11. Principio del método de LAMP. Paso inicial de producción de la estructura: La síntesis de ADN iniciada a partir de FIP se realiza de la siguiente manera. La región F2 se anexiona con la región F2c del ADN diana e inicia la elongación. La amplificación del ADN se realiza con BIP de forma similar. El cebador F3 se anexiona con la región F3c del ADN diana y se produce la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra. La hebra de ADN elongada a partir de FIP se reemplaza y se libera. La hebra monocatenaria liberada forma una estructura de bucle en su extremo 5' (estructura 4). La síntesis de ADN se realiza con el ADN monocatenario como molde, y con BIP y el cebador B3, de la misma manera que se describió anteriormente, para generar la estructura 5, que posee la estructura de bucle en ambos extremos (estructura en forma de mancuerna). Etapa de amplificación cíclica: Utilizando la estructura 5 como molde, se inicia la síntesis de ADN autocebado desde la región F1 del extremo 3', y la elongación comienza con la hibridación FIP con la cadena simple de la región F2c en la estructura de bucle. Tras varios pasos, se genera la estructura 7, complementaria de la estructura 5, y la estructura 5 se produce a partir de la estructura 8 en una reacción similar a la que se produjo a partir de las estructuras 5-7. También se producen estructuras más alargadas. Tomado de Tomita N, 2008.

3.7. PAUTAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ENSAYOS CUALITATIVOS

En los EIA colorimétricos cualitativos, en su formato de ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA), los resultados positivos y los negativos de una prueba se discriminan mediante un **valor de corte** o **cut-off**.

La elección del valor *cut-off* óptimo es crucial para equilibrar la sensibilidad (capacidad de detectar verdaderos positivos) y la especificidad (capacidad de identificar correctamente verdaderos negativos) en un ensayo en particular. Para su estimación, se ensayan por triplicado el CN de la prueba, y se calcula el promedio y desvío estándar (DE) de las lecturas de absorbancia o densidad óptica (DO). De esta forma, para un nivel de confianza del 99, la fórmula sería:

$$\text{valor cut-off} = \text{promedio } [DO_{CN}] + 3x \text{ DE } [DO_{CN}] \%$$

El valor *cut-off* se puede hacer más específico lo cual reducirá ligeramente la sensibilidad, mediante el estudio de 2 poblaciones, una cohorte de pacientes infectados y otra cohorte de pacientes normales, y graficando la distribución normal de ambas (modelo de distribución bimodal de los resultados de ELISA para las muestras) mediante la identificación de desviaciones de la distribución esperada de datos.

En los ensayos de electroquimioluminiscencia (ECLIA) cualitativos, para la interpretación de los resultados se utiliza la **Relación de positividad** (Rp) o **índice de punto de corte** (COI) el cual se basa en la relación existente entre la señal del ensayo y la señal del punto de corte (s/co). El COI se calcula automáticamente comparando la magnitud de la señal de quimioluminiscencia de la muestra con el valor de punto de corte determinado por la calibración. En general, de acuerdo con la especificación del fabricante, las muestras se definen como reactivas si el COI es $\geq 1,0$ y no reactivas cuando el COI es inferior a 0,9. Las muestras ($0,9 \leq \text{COI} < 1,0$) se definieron como casos indeterminados.

Cuando se tratan de técnicas inmunoenzimáticas en donde la lectura es por visualización (microscópica o no) como por ejemplo las inmunofluorescencias, aglutinación de partículas, inmunocromatografías, hemaglutinaciones, etc, se determina el resultado bimodal (positivo o negativo) ante la presencia o ausencia de la señal esperada (marcación fluorescente, aglutinación, aparición de banda coloreada, etc.) por parte de un operador calificado siguiendo las recomendaciones de cada kit.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos moleculares cualitativos de aplicación diagnóstica requieren la incorporación de una serie de controles que aseguran la confianza del resultado obtenido para la muestra de un paciente. El formato más extendido de estos ensayos es el de la qPCR en donde el virus a detectar en la muestra se evidencia con una curva de amplificación la cual presenta un determinado valor de Ct (número de ciclo en el cual la curva de emisión de fluorescencia atraviesa el valor umbral) el que es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico viral presente en la muestra. En general, una muestra se considera DETECTABLE cuando el Ct obtenido es menor al límite de detección (LOD) del ensayo, y NO DETECTABLE cuando el Ct obtenido es mayor al LOD.

Bibliografía

- Alavi N, Khan SH, Saadia A, Naeem T. Challenges in Preanalytical Phase of Laboratory Medicine: Rate of Blood Sample Nonconformity in a Tertiary Care Hospital. *EJIFCC* 2020;31(1):21-27.
- Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77(3):153-163.
- Saurav Patra, M., Brijesh Mukherjee, and Ashok Kumar Das. Pre-analytical errors in the clinical laboratory and how to minimize them. *Int J Bioassays* 2013;2(3): 551-553.
- Neogi S., Mehndiratta M., Gupta S., Puri D. Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. *J Clin Scien Res* 2016;5(3):171-178. DOI: 10.15380/2277-5706.JCSR.15.062
- Carballal G, Oubiña JR. Diagnóstico virológico. En: Carballal G y Oubiña JR. *Virología Médica* (4ª ed). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus; 2014. p.205-240.
- Sancho-Insenser JJ, González-Castillo AM. Pruebas diagnósticas. ¿Cómo describir su validez? *Cir Esp* 2022;100(9):590-594. <https://doi.org/10.1016/j.cireng.2022.06.025>.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* 2015;53(1):1-5.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877-82. doi: 10.1038/nprot.2008.57. PMID: 18451795.
- Kurstak E, Tijssen P, Kurstak C, Morisset R. Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. *Bull World Health Organ* 1986;64(3):465-79.
- Alhadj M, Zubair M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Rudolf M Lequin, Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* 2005; 51(12):2415–2418.
- Clementi M, Menzo S, Manzin A, Bagnarelli P. Quantitative molecular methods in virology. *Arch Virol* 1995;140(9):1523-39.
- Josko D. Molecular virology in the clinical laboratory. *Clin Lab Sci* 2010;23(4):231-6.
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-304.
- Scagnolari C, Turriziani O, Monteleone K, Pierangeli A, Antonelli G. Consolidation of molecular testing in clinical virology. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15(4):387-400.
- Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *J Clin Pathol* 2000;53(7):502-6.
- Trujillo-Gómez J, Tsokani S, Arango-Ferreira C, Atehortúa-Muñoz S, Jimenez-Villegas MJ, Serrano-Tabares C, Veroniki AA, Florez ID. Biofire FilmArray Meningitis/Encephalitis panel for the aetiological diagnosis of central nervous system infections: A systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *E Clinical Medicine* 2022;44:101275.

Capítulo 4

RETROVIRUS

Germán R. **Perez**
Miguel A. **Taborda**
Nadia **Gerhardt**
Adriana A. **Giri**

4.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El **Virus de la Inmunodeficiencia Humana** (HIV) es un retrovirus complejo, se agrupa dentro del género *Lentivirus* de la sub-familia *Orthoretrovirinae* en la familia *Retroviridae*.

Hasta el momento han sido descritos 2 tipos de HIV, denominados HIV-1 y HIV-2, que se asocian al Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Estos virus provienen de diferentes eventos de transmisión zoonótica independientes de virus de primates no humanos.

La contribución a la epidemia por cada uno de ellos varía considerablemente. Mientras que las infecciones por HIV-2 se encuentran circunscritas a determinadas regiones de África occidental, con casos esporádicos en el mundo, las infecciones por HIV-1 son las responsables de la pandemia del HIV/SIDA infectando a millones de personas y aislándose en casi todos los países del mundo.

El HIV-1 se divide en 4 **grupos** denominados M, O, N y P, siendo cada uno de ellos un linaje diferente originado por eventos independientes de transmisión inter-especies. El grupo M fue el primero en ser descubierto y es responsable de más del 90% de los casos de infección por HIV-1. Su amplia diseminación involucró una serie de eventos fundadores (“cuellos de botella poblacionales”) que condujo al predominio de diferentes linajes denominados **subtipos** en diferentes áreas geográficas. Actualmente, se distinguen 9 subtipos del HIV-1 dentro del grupo M: A (A1/A2), B, C, D, F (F1/F2), G, H, J y K. Esta clasificación filogenética del HIV-1 evidencia la gran diversidad y variabilidad nucleotídica del HIV-1, dado por la elevada tasa de error de la transcriptasa reversa, la capacidad de recombinación, el corto tiempo de replicación genómica y el alto tamaño poblacional (producción de 10^{10} viriones/día). Es importante señalar que la recombinación entre viriones de distintos subtipos generó formas recombinantes estables que se han extendido geográficamente y son responsables de más del 20% de las infecciones por HIV-1 en todo el mundo. En general, en los países de Centroamérica y Sudamérica persiste un marcado predominio del subtipo B del HIV-1, aunque en los últimos años se ha incrementado la prevalencia de las recombinantes BF/BF1, algunas de las cuales circulan desde 1980.

4.1.1. CURSO DE LA INFECCIÓN NATURAL POR HIV-1

Después de la exposición al HIV-1, cerca de la mitad de los individuos que se infectan desarrollan un cuadro pseudogripal en las primeras semanas de infección que se conoce como **síndrome retroviral agudo** y que corresponde a las manifestaciones clíni-

cas de la primoinfección. El primer marcador virológico en aparecer es el **ARN-HIV** en plasma (**viremia**) aproximadamente a la semana desde la exposición. Prácticamente al mismo tiempo se puede detectar el **ADN-HIV** integrado en el genoma celular (**ADN proviral**) en las células mononucleares de sangre periférica, el cual permanecerá detectable de por vida. El **antígeno p24** aparece en plasma a los 11 – 13 días de la infección, y permanecerá detectable durante aproximadamente 45 días (Figura 12).

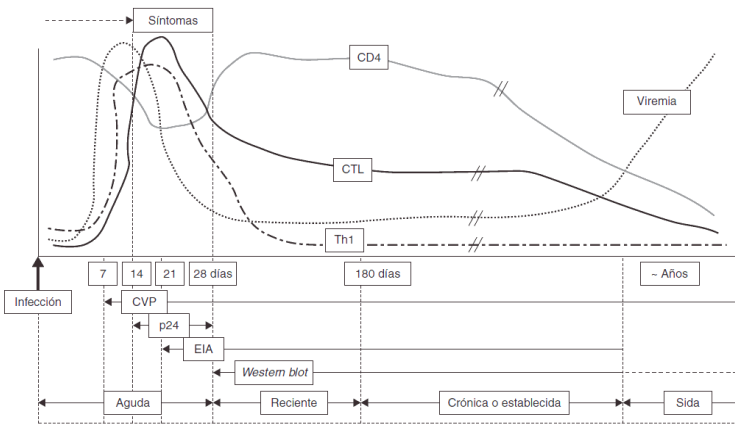


Figura 12. Evolución clínica, inmunológica y virológica en la infección aguda, la infección reciente y la infección crónica por el HIV-1 con los correspondientes marcadores. p24: antigenemia p24; CD4: linfocitos T CD4+ plasmáticos; CTL: linfocitos T citotóxicos plasmáticos; Th1: respuesta proliferativa linfocitos T helper tipo 1 plasmáticos.

Adaptado de Miró JM et al, 2004.

Unas semanas más tarde se comienzan a detectar los **Acs a-HIV** como consecuencia de la respuesta inmune a la infección (Figura 12). Los *primeros Acs a-HIV en ser detectados son aquellos dirigidos contra las proteínas p24, gp160, gp120 y gp41*. Si bien se detectan Acs IgM contra estas proteínas, éstos no son específicos de la primoinfección ya que pueden aparecer en durante el curso de la infección. Los Acs dirigidos al resto de las proteínas virales van apareciendo de modo progresivo en las semanas siguientes. A los 6 meses de la infección por HIV-1, más del 95% de las personas infectadas presentan seroconversión de Acs, es decir, pasan de seronegatividad (Acs a-HIV no reactivos) a seropositividad (Acs a-HIV Reactivos).

La etapa crónica de la infección natural se caracteriza por la persistencia de la replicación viral la cual es contrarrestada por la regeneración de los linfocitos T CD4+. La duración de esta fase es altamente variable y depende de un complejo equilibrio entre factores del hospedero y del virus, no comprendidos en profundidad, que conduce a diferentes formas y tiempos de progresión de la enfermedad. La mayoría de

los pacientes (80-90%) progresan a SIDA a partir de los 5 años de la infección, con un tiempo medio de progresión de 10 años, y son denominados **progresores típicos**. Entre un 5 – 10% de las personas infectadas desarrollan SIDA entre 1 y 5 años post-infección, constituyendo los **progresores rápidos**. Una minoría de los pacientes infectados (< 5%) permanece asintomática luego de más de 10 años de seguimiento, manteniendo estables sus recuentos de linfocitos T CD4+ en plasma en el tiempo. Los pacientes con estas características fueron denominados **controladores**. Dentro de este grupo de individuos se distinguen los:

- **no progresores**: individuos con al menos 10 años de infección, sin tratamiento antirretroviral, con ausencia de síntomas y linfocitos T CD4+ >500/mm³.
- **controladores elite**: individuos con carga viral plasmática (CVP) no detectable y niveles altos de linfocitos T CD4+.

La definición de estos subgrupos de controladores no es uniforme en la literatura ya que se basa fundamentalmente en el límite de detección de los ensayos de cuantificación de la viremia o CVP utilizados en la última década.

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, en las que la detección de Acs refleja usualmente una exposición previa al agente patógeno y su erradicación en un tiempo pasado, *en la infección con HIV la presencia de Acs expresa un estado de portador del virus*, y por consiguiente la posibilidad de transmitirlo a otros, aún en ausencia de manifestaciones clínicas de la infección y de valores de CVP no detectables.

Debido a que no existen manifestaciones clínicas características de la infección del HIV-1, el diagnóstico certero sólo se puede establecer por técnicas de laboratorio. La presencia de la infección puede evidenciarse mediante la detección de proteínas y ácidos nucleicos virales (*métodos directos*), o de Acs específicos contra diferentes proteínas virales (*métodos indirectos*).

Se denomina **periodo ventana** al tiempo que transcurre entre la infección y la detección de algún marcador de infección (ARN-HIV, antígeno p24 o Acs a-HIV). Este periodo es variable entre los individuos que adquieren la infección. Por ejemplo, los individuos que se infectaron a través de transfusiones de componentes sanguíneos contaminados desarrollan Acs a-HIV más rápidamente que aquéllos que se infectaron por vía sexual.

Desde el inicio de la epidemia, las recomendaciones de los organismos oficiales para el diagnóstico de la infección por HIV en adultos indicaban el uso de ensayos de detección de Acs a-HIV en forma secuencial: un ensayo de tamizaje de alta sensibilidad (EIA o aglutinación de partículas de gelatina) y, en aquellas muestras repetidamente reactivas, un ensayo suplementario de alta especificidad (Western Blot).

En los últimos años, el avance metodológico permitió que:

- los tests rápidos logren sensibilidades y especificidades similares a los EIA.
- se desarrollen EIAs que detecten en forma combinada Acs a-HIV y antígeno p24 para tamizaje en Bancos de Sangre.
- los ensayos moleculares para la detección y cuantificación del ARN-HIV posean límites de detección muy bajos, rangos dinámicos amplios, alta reproducibilidad y capacidad de detectar los distintos tipos y subtipos virales, entre otras mejoras.

No obstante, el avance metodológico, la epidemia del HIV/SIDA sigue siendo uno de los problemas sanitarios más graves a nivel mundial, estimándose más de 36 millo-

nes de personas que conviven con el virus. Si bien, la implementación de la *terapia antirretroviral de alta eficacia* logró reducir el número de muertes por SIDA, la cifra de nuevas infecciones a nivel mundial se mantiene constante o en leve descenso dependiendo la región geográfica.

4.1.2. METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL HIV

La Tabla 3 detalla cada uno de los marcadores virológicos disponibles, la metodología empleada para su detección y la utilidad del mismo.

Tabla 3. MARCADORES PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR HIV

MARCADOR / METODOLOGÍA	UTILIDAD
Detección de Acs a-HIV-1/2 - EIA 3 ^o generación - Aglutinación de partículas - Test rápidos	Diagnóstico en adultos (Prueba de tamizaje) Diagnóstico en niños > 18 meses
Detección de Antígeno p24 - EIA captura de antígeno	Diagnóstico en niños < 18 meses
Detección conjunta de Acs a-HIV-1/2 y antígeno p24 - EIA 4 ^o generación	Diagnóstico en adultos (Prueba de tamizaje) Diagnóstico en niños > 18 meses Tamizaje en Banco de Sangre
Discriminación de Acs a-HIV-1/2 - Western Blot - Inmmunoblot	Diagnóstico en adultos (Prueba suplementaria) Diagnóstico en niños > 18 meses
Detección de ADN proviral - PCR cualitativa	Diagnóstico en niños < 18 meses
Detección de ARN-HIV - RT-PCR cualitativa	Diagnóstico en niños < 18 meses Tamizaje en Banco de Sangre
Cuantificación del ARN-HIV - RT-PCR cuantitativa (CVP)	Diagnóstico en adultos (Prueba suplementaria) Diagnóstico en niños > 18 meses Diagnóstico en niños < 18 meses Evaluación de tratamiento
Cuantificación de Linfocitos CD4 - Citometría de flujo	Evaluación de tratamiento
Detección de mutaciones de resistencia - Fenotipo virtual	Evaluación de tratamiento

4.1.2.1. DETECCIÓN DE Acs a-HIV-1/2. Las *técnicas de EIA* son las más empleadas debido a su simplicidad, alta sensibilidad, nivel de automatización y diseño para analizar un gran número de muestras de forma simultánea.

En principio las técnicas de EIA para el HIV se basaron en la utilización de lisados víricos (*ensayos de 1° generación*), y fueron de enorme utilidad para conocer el alcance de la epidemia de SIDA en los primeros años y establecer las primeras medidas preventivas.

Posteriormente las EIA de 1° generación fueron sustituidas por EIA que utilizaban antígenos más específicos obtenidos por recombinación genética o mediante síntesis (*ensayos de 2° generación*) utilizando EIA indirectos o competitivos. Estas técnicas tenían una mejor especificidad, pero planteaban problemas de sensibilidad en el diagnóstico de la infección aguda, debido a que detectaban la seroconversión entre 6 y 12 semanas después de producirse la infección. Para mejorar el diagnóstico temprano de la infección por el HIV se diseñaron técnicas que permitieran la detección simultánea de Acs de distinta clase (IgG, IgM o IgA) en la misma prueba, utilizando un diseño de EIA tipo *sándwich* o de inmunocaptura, incluyendo como antígenos proteínas recombinantes o péptidos sintéticos específicos del HIV-1 (a veces asociados con otros específicos del HIV-2). De este modo se logró reducir el periodo ventana a 3 semanas (*ensayos de 3° generación*).

Además del formato de EIA, existe la técnica de *aglutinación de partículas de gelatina* que utiliza un soporte de partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos HIV-1 y HIV-2 inactivados. La prueba se basa en el principio que las partículas sensibilizadas se aglutinan por la presencia de los Acs a-HIV-1 y Acs a-HIV-2 en plasma o suero humano. Estos ensayos permiten detectar Acs IgG, IgA e IgM del HIV, presentando una sensibilidad comparable a los EIA de 3° generación.

En los últimos años, los test rápidos han ganado importancia en el diagnóstico de la infección por HIV-1, ya que la sensibilidad y especificidad han sido mejoradas y en muchos casos son comparables a los ensayos incluidos en el algoritmo convencional basado en EIA. La OMS estableció en 2005 como una de sus actuaciones prioritarias para la lucha contra el HIV/SIDA la necesidad de extender el diagnóstico fuera de los centros hospitalarios. Esto ha supuesto la difusión de las pruebas rápidas que permiten obtener un diagnóstico presuntivo en pocos minutos sin infraestructura específica.

Los *test rápidos* están basados en técnicas de inmunoblot, aglutinación, inmunocromatografía o técnicas de inmunofiltración. Los formatos que pueden presentar son variables y se caracterizan por ser *simples* (no requieren de equipamiento especial) y *rápidos* (permiten obtener un resultado en 10-40 minutos. Como muestra pueden utilizar sangre entera, suero o plasma, mostrando sensibilidad y especificidad similares en cualquiera de ellas si son ensayos en inmunocromatografía o microaglutinación. Los antígenos virales que se utilizan en las pruebas rápidas son similares a los utilizados en los EIA.

4.1.2.2. DETECCIÓN DE ANTÍGENO p24. La detección del antígeno p24 es un marcador directo de la presencia del virus en el organismo. Aunque teóricamente el antígeno p24 debería detectarse en cualquier fase de la infección, la presencia de Acs a-p24 con los que forma inmunocomplejos suele enmascararlo, por lo que su utilidad ha quedado reducida a situaciones particulares entre las que destacan:

- la detección de la infección antes de la seroconversión.
- el diagnóstico pediátrico.

El antígeno p24 se positiviza después de la infección y lo hace durante un periodo breve de tiempo que puede ser mayor en los sujetos cuyas manifestaciones clínicas de primoinfección obedecen a cuadros más severos reflejados por niveles altos de viremia y antigenemia. Por lo tanto, en el diagnóstico de una posible infección por HIV-1 tras una exposición, un resultado negativo para el antígeno del HIV-1 no excluye la posibilidad de estar infectado y en estos casos se aconseja la detección de Acs a los 6 meses posteriores a la exposición al virus.

Los métodos de detección del antígeno p24 del HIV-1 son fundamentalmente técnicas EIA con Acs específicos fijados en la fase sólida y con sensibilidades diferentes. En algunas pruebas comerciales se realiza una **disociación** (de carácter ácido o básico) que busca la liberalización del antígeno p24 de los inmunocomplejos formados con su anticuerpo. Este procedimiento arroja buenos resultados, con un aumento de la sensibilidad del 60% en pacientes pediátricos y en pacientes asintomáticos con altos niveles de antígeno p24. Es altamente recomendable que todo resultado positivo sea confirmado mediante el **ensayo de neutralización** correspondiente, teniendo en cuenta que si bien la disociación de inmunocomplejos aumenta la sensibilidad también genera falsos positivos.

Entre los factores que pueden condicionar la detección de antígeno p24 se encuentran la sensibilidad de las diferentes pruebas comerciales, el estadio evolutivo de la infección, la administración de antirretrovirales y la presencia de infecciones oportunistas que indirectamente inducen una mayor replicación del HIV.

En general solo es posible detectar antígeno p24 entre el 10-25% de los pacientes seropositivos asintomáticos y en el 70% de los pacientes con SIDA. En la primoinfección el antígeno p24 se detecta en aproximadamente el 25% de los casos. En algunos países es obligatorio el tamizaje del antígeno p24 en las donaciones de sangre para identificar a los donantes en el periodo ventana de la infección por HIV. Sin embargo, no se ha demostrado que esta medida arroje beneficios de reducción del riesgo de transmisión por sangre infectada.

4.1.2.3. DETECCIÓN CONJUNTA DE Acs a-HIV-1/2 Y ANTÍGENO p24. Los **EIA de 4ª generación** permiten la detección simultánea del antígeno p24 y Acs a-HIV-1/2. Tienen como ventaja reducir en una semana el periodo ventana, estableciéndose en 2 semanas desde el inicio de la infección.

La *Ley Nacional N° 22.990* obliga a los Bancos de Sangre a realizar la detección de las siguientes enfermedades transmisibles por transfusión en los hemoderivados: sífilis, brucelosis, chagas, HIV (Acs a-HIV-1/2), Hepatitis c (Acs a-HCV) y Hepatitis B (HBsAg). Una modificatoria posterior de la ley incorporó nuevos marcadores:

Acs a-HBc para la Hepatitis B, Acs a-HTLV-1/2 para HTLV-1/2 y antígeno p24 para HIV-1. Los EIA de 4º generación permiten detectar en forma conjunta los dos marcadores del HIV requeridos para el tamizaje en hemoderivados (antígeno p24 y Acs a-HIV-1/2) y existen ensayos automatizados.

Una nueva generación de **tests rápidos** basados en inmunocromatografía se ha desarrollado en los últimos años con la capacidad de detectar en forma conjunta de Acs a-HIV-1/2 y antígeno p24.

4.1.2.4. DISCRIMINACIÓN DE Acs a-HIV-1. El **Western Blot** permite la discriminación de los Acs a-HIV, presentes en la muestra, contra los distintos antígenos virales. La obtención de los antígenos virales que serán inmovilizados en la membrana es a partir de un **lisado de cultivo del virus**. Las proteínas virales son purificadas por centrifugación, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente transferidas y fijadas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se corta en tiras de unos 5 mm de ancho y en este formato son comercializadas en los kits para su uso en el laboratorio.

La tira se incuba primero con el suero del paciente en estudio y, luego de varios lavados, se la enfrenta a un Ac a-IgG humana conjugada con una enzima que al ser expuesta a un revelador enzimático producirá un precipitado coloreado. Por lo tanto, las bandas coloreadas corresponderán a la presencia de Acs específicos contra el antígeno presente en la tira de nitrocelulosa. Las principales bandas del Western Blot se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. BANDAS PRESENTES EN EL WESTERN BLOT DE HIV-1		
DENOMINACIÓN	PROTEÍNA	GEN
gp160	Precursora de la envoltura	<i>env</i>
gp120	Glicoproteína externa	
gp41	Glicoproteína transmembrana	
gp55 y gp40	Precursora del core	<i>gag</i>
gp24	Proteína principal	
p17	Proteína de la matriz	
p66 y p51	Transcriptasa reversa	<i>pol</i>
p31	Endonucleasa	

Cada uno de los diferentes equipos comerciales contiene instrucciones precisas de cómo interpretar los resultados obtenidos según criterios de positividad más o menos restrictivos. Sin embargo, diferentes organismos internacionales han propuesto diferentes criterios para interpretar los resultados obtenidos por los Western Blot. Los más utilizados por los laboratorios clínicos son:

- *criterio de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)*: presencia de p24, p31 y gp41 u otra glucoproteína.

- *criterio del Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)*: presencia de al menos dos bandas de p24, gp41 y gp160/120.

Se considera que el Western Blot es una prueba sensible para las proteínas derivadas del gen *gag* y algo menos para las proteínas de la envoltura (gen *env*). Por ello durante la primoinfección, y dada la escasez de Acs a-p24 o Acs a-gp41, es considerada una prueba poco sensible. Lo mismo ocurre en las fases terminales de la infección por la pérdida de Acs a-p24. No obstante, el Western Blot constituye *una prueba altamente específica con menos de 1 falso positivo por cada 20.000 individuos infectados*, mientras que la tasa de falsos negativos es, en población donante de sangre, de 1 por cada 250.000 individuos.

El Western Blot puede ofrecer 3 tipos de resultados diferentes:

- **Positivo**: Cuando cumple los criterios de positividad elegido.

- **Negativo**: Cuando ninguna de las bandas presenta reacción.

- **Indeterminado**: Cuando aparecen bandas, pero no alcanzan a cumplir con el criterio de positividad establecido.

Las principales causas de Western Blot con resultados indeterminados suelen obedecer a:

- Reactividad inespecífica (ver falsos positivos)

- Infección por HIV-2 u otros retrovirus humanos

- Seroconversión al HIV-1

- Estado avanzado de infección HIV-1

- Hijo de madre seropositiva

- Divergencias genéticas de la cepa del HIV-1 (individuos provenientes de África)

Aunque se han descrito diferentes causas de reacciones de Western Blot falsamente positivas para antígenos del HIV-1 las principales son similares a las que acontecen en los EIA. En un intento de mejorar y garantizar la sensibilidad del Western Blot frente a los Acs de las proteínas de la envoltura, algunos sistemas comerciales han incorporado péptidos sintéticos o proteínas recombinantes al lisado viral.

Existen métodos alternativos al Western Blot, basados en **inmunocromatografía lineal** en donde se fijan a la fase sólida de la membrana distintos antígenos de HIV-1 (en general, p31, gp160, p24, gp41) y HIV-2 (en general, gp36, gp140). Estos métodos emplean proteína A unida a Acs con partículas de colorante de oro coloidal como conjugado. La muestra del paciente se aplica junto a un buffer que hace que la muestra fluya lateralmente y facilita la unión de los anticuerpos del paciente a los antígenos inmovilizados en la fase sólida. Después de que la muestra y el buffer hayan migrado a la tira reactiva, se agrega un buffer adicional que permite la migración de la proteína A de oro coloidal y promueve su unión a los anticuerpos del paciente. Ante la presencia de Acs anti-HIV se producen líneas rosadas/púrpuras en el área específica. Además, posee un área de control que evidencia la presencia de IgG de la muestra del paciente unida a la proteína A de oro coloidal dando una línea rosa/púrpura en el área de control. Esta línea de control sirve para demostrar que la muestra y los reactivos se han aplicado correctamente y han migrado a través del dispositivo.

4.1.2.5. DETECCIÓN DE ADN PROVIRAL. El ADN-HIV detectado se trata de **ADN proviral** presente en las células infectadas (principalmente en linfocitos T CD4+). Dado que el HIV se integra a las células de modo irreversible, esta determinación es considerada el *marcador del estado de infección* de manera inequívoca. En la actualidad, esta determinación está siendo reemplazada por la determinación de la viremia (ARN-HIV), en gran parte debido a las dificultades de disponer de ensayos comerciales con suficientes controles de calidad y certificación por agencias reguladoras y a la mayor facilidad para obtener la muestra: linfocitos (ADN-HIV) vs. suero (ARN-HIV).

Los laboratorios de referencia que realizan la detección del ADN proviral utilizan una PCR anidada *in house* que amplifica dos regiones génicas del virus (*gag* y *pol*) y un gen cromosómico como control de extracción de ADN genómico.

Si bien este marcador se puede utilizar para valorar la transmisión madre-hijo en el diagnóstico de la transmisión vertical de HIV y para el seguimiento de la profilaxis post-exposición, la mayoría de los laboratorios utilizan la viremia en estos escenarios.

4.1.2.6. DETECCIÓN DE ARN-HIV. La detección del ARN-HIV cualitativa en plasma fue utilizada al comienzo de la epidemia para el diagnóstico pediátrico principalmente, como alternativa a la detección del ADN proviral. Esto fue debido a la existencia de varios ensayos comerciales validados por distintos organismos de control. Sin embargo, el avance de los métodos cuantitativos de ARN (CVP), hizo que los ensayos de ARN-HIV se discontinuaran para tal fin, quedando limitado su uso a la reducción del periodo ventana de la infección en el tamizaje de hemoderivados en Bancos de sangre.

La implementación de ensayos para la detección de ARN-HIV cualitativa para el tamizaje de donantes, denominados NAT (*nucleic acid testing*), aumenta la seguridad transfusional al disminuir la incidencia de infecciones virales transmitidas por transfusión. En el caso de la infección por HIV/SIDA se reduce el periodo ventana a 7 días.

4.1.2.7. CUANTIFICACIÓN DEL ARN-HIV: La CVP es la cantidad de partículas virales, expresada en número de copias, encontradas por mililitro de sangre (copias/ml) o en \log_{10} . Aunque se estima que la CVP es un buen reflejo de lo que ocurre en el sistema linfático, se desconoce cómo el virus se distribuye en otros tejidos. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que el HIV circulante en sangre está por debajo del 20% del total existente en todo el cuerpo. La determinación de la CVP permite evaluar el estado de la enfermedad, el riesgo de progresión y la efectividad del tratamiento. El ensayo ideal para determinar la CVP del HIV debería tener alta sensibilidad analítica (el nivel más bajo de detección viral), reproducibilidad y linealidad elevadas, y precisión en la cuantificación de todos los tipos y subtipos del virus. A estas características técnicas hay que añadir la carga máxima de trabajo del ensayo, la automatización del procedimiento, la reducción de contaminaciones cruzadas (*carry-over*) y el menor tiempo en la obtención de resultados.

La primera generación de ensayos de CVP presentaba un rango dinámico de cuantificación que variaba de 400 a 750.000 copias/ml. Posteriormente, se desarrollaron los denominados *ensayos ultrasensibles* con un rango dinámico de 50 a 750.000 copias/ml.

Actualmente, la mayoría de los ensayos de CVP se basan en la detección en tiempo real de los productos amplificados. Estos nuevos ensayos aportan un mayor intervalo de cuantificación, mayor sensibilidad, mayor rapidez en la obtención de los resultados y menores riesgos de *carry-over*. A esto se debe sumar la disponibilidad de sistemas de extracción de ARN viral automática, reduciendo sensiblemente el riesgo de contaminación cruzada o de errores humanos. Estas plataformas, denominadas de segunda generación, presentan **límites de detección inferiores a las 50 copias/ml, lo cual ha permitido incorporar la CVP como ensayo suplementario en el diagnóstico de HIV en adultos y como alternativa metodológica al ADN proviral y ARN-HIV cualitativo en el diagnóstico pediátrico de la infección.**

Con respecto al uso de la CVP en el seguimiento de pacientes en tratamiento antirretroviral, es conveniente que las mediciones se realicen siempre con la misma metodología y en un mismo laboratorio. En general, diferencias de hasta $0,5 \log_{10}$ no se consideran significativas. Por ejemplo, un descenso de $4,3 \log_{10}$ (20.000 copias/ml) a $3,9 \log_{10}$ (8.000 copias/ml) de ARN-HIV, no necesariamente significa un descenso significativo de la CVP. Si bien estos ensayos son altamente reproducibles, los resultados con una metodología no son extrapolables a los obtenidos con otra diferente.

El **éxito terapéutico virológico** se define con la obtención de un nivel de CVP indetectable usando métodos con límites de detección < 50 copias/ml. Un ensayo de CVP detectable tras 6 meses de tratamiento habitualmente se considera un fracaso terapéutico. Además, la reaparición de cargas virales detectables (mayores a 1.000 copias/ml) en dos controles seguidos también se consideran fracasos terapéuticos. Ante la aparición de fracaso terapéutico se deberá indagar sobre el motivo del mismo, que puede ir desde la falta de adherencia a los fármacos como a la aparición de mutaciones de resistencia a antirretrovirales.

4.1.2.8. CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS CD4+. Los linfocitos T humanos juegan un rol importante en la fisiopatogenia del HIV/SIDA. Estas células poseen moléculas antigénicas denominadas CD (*cluster of differentiation*) que se expresan en la superficie celular y tienen diversas funciones biológicas. Se deben distinguir los linfocitos T CD4, que proveen cooperación a otras células del sistema inmune, de los linfocitos T CD8, que median actividad citotóxica. Las moléculas CD4 y CD8 tienen la función biológica de interactuar con la estructura molecular del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y clase I, respectivamente. Este proceso es vital durante la presentación antigénica y la posterior activación del sistema inmune. El HIV infecta los linfocitos T CD4 del tejido linfoide asociado a mucosa en la etapa aguda de la infección y provoca la muerte de muchas de las células infectadas. El recuento de los linfocitos T CD4 en sangre periférica se realiza por citometría de

flujo y su valor permite estimar el estado inmunológico del paciente infectado por lo que es un parámetro necesario en la atención médica.

El número normal de linfocitos T CD4 en un adulto se encuentra en un rango de 800 a 1.050 células/ml. La variabilidad de los valores depende del número total de leucocitos, el porcentaje de linfocitos y el porcentaje de linfocitos T CD4. Por ello, se debe reportar la **relación CD4:CD8**, la cual en el individuo normal es superior a 1. El **éxito terapéutico inmunológico** se establece cuando con el tratamiento se logra un incremento en el recuento de linfocitos T CD4.

4.1.2.9. DETECCIÓN DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

El desarrollo de diferentes cepas de HIV-1 resistentes a algunas de las drogas incluidas en los tratamientos terapéuticos es una de las principales causas que provocan el fracaso terapéutico. Esto es una característica propia del HIV dado su alta tasa de replicación y el alto grado de error de la retrotranscriptasa.

La aparición de variantes de escape se retrasa (pero no se anula) con una mejor adherencia a la terapia. Si bien el objetivo de la terapia es lograr cargas virales indetectables en el transcurso del tiempo, se debe considerar que no se está erradicando al virus del organismo sino que solo se ha logrado reducir su CVP por debajo del límite de detección del ensayo utilizado, en general inferior a 50 copias/ml.

Una vez que la variante resistente a un fármaco es seleccionada, se convertirá en la especie viral dominante en presencia de dicho fármaco, lo que se verá reflejado en un aumento significativo de la CVP. Entonces, definimos **resistencia secundaria** cuando la adquisición de mutaciones ocurre bajo la presión de selección ejercida en el transcurso del tratamiento con drogas antirretrovirales. Sin embargo, en la última década se describieron casos de individuos infectados con variantes resistentes a fármacos sin haber recibido tratamiento. Así, se denomina **resistencia primaria** a la presencia de mutaciones de escape en un paciente que no ha sido previamente expuesto a las drogas. Se considera que la prevalencia de resistencia primaria en una población es alta cuando más del 15% de las muestras estudiadas presenta mutaciones; moderada cuando este valor es entre 5-15%; baja cuando es menor del 5%. La realización de ensayos para evaluar, previo al inicio de tratamiento, la resistencia a antirretrovirales se recomienda cuando los niveles de resistencia primaria superan el 5% en una determinada población.

Las metodologías disponibles para evaluar hacia qué fármaco la variante viral es resistente son:

- **Ensayo de resistencia fenotípica:** implican la cuantificación directa de la sensibilidad al fármaco. Para ello, la replicación del virus se mide en cultivos celulares bajo presión selectiva, consistente en incrementar la concentración del fármaco. Posteriormente, los resultados obtenidos son comparados en relación con el virus original (en ausencia del fármaco). Las concentraciones del fármaco se expresan como valores del 50% de concentración inhibitoria. Esta prueba presenta 3 inconvenientes: elevada complejidad, costo excesivo y niveles de bioseguridad adecuados para el cultivo del HIV, lo cual hace que sea privativa para los laboratorios clínicos.

- **Ensayo de resistencia genotípica (*fenotipo virtual*):** se basan en el análisis de resistencias asociadas a mutaciones ya establecidas, las cuales se determinan por secuenciación del gen *pol* del HIV. La secuencia nucleotídica obtenida es contrastada en una base de datos en donde está descripta la asociación entre la mutación y la sensibilidad reducida a fármacos obtenida de ensayos de resistencia fenotípica.

4.1.3. ALGORITMOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL HIV

Considerando el avance tecnológico de los distintos ensayos para el tamizaje y diagnóstico de la infección por HIV, y la necesidad de ampliar el acceso al diagnóstico, el Ministerio de Salud de la Nación en 2014 propuso la aplicación de nuevos algoritmos (www.msal.gov.ar). Para ello, se realiza una distinción entre la metodología a utilizarse en laboratorios clínicos de las recomendadas para los centros de salud o testeo voluntario. Esta estrategia acelera la derivación de aquellos individuos identificados como HIV-positivos o presuntamente positivos a servicios de salud para el seguimiento y tratamiento de su infección por HIV.

4.1.3.1. ALGORITMO PARA HIV EN MAYORES DE 18 MESES EN LABORATORIOS CLÍNICO:

Para el diagnóstico de la infección por HIV, los laboratorios clínicos emplean en general ensayos categorizados como de mediana o alta complejidad que incluyen:

- **ensayos de tamizaje:** EIAs manuales de formato colorimétrico o automatizados de quimioluminiscencia de cuarta generación, es decir, que detecte tanto los Acs a-HIV como el antígeno p24.
- **ensayos suplementarios:** para aquellas muestras repetidamente reactivas por los ensayos de tamizaje. Estas pruebas tienen como objeto **verificar que los resultados obtenidos con las pruebas de tamizaje son correctos**. El Western Blot ha sido utilizado como test suplementario desde el inicio de la epidemia. Actualmente, se incorpora la determinación de la CVP como método suplementario, relegando el uso del Western Blot para los casos con resultados de EIA Reactivo y CVP No detectable.

4.1.3.2. ALGORITMO PARA HIV EN MENORES DE 18 MESES EN LABORATORIOS CLÍNICOS:

El diagnóstico de infección en niños recién nacidos de mujeres con infección por HIV debe realizarse lo más precozmente posible para poder iniciar la terapéutica apropiada.

El HIV se transfiere durante el embarazo al nonato principalmente en las últimas semanas previas al nacimiento (75% de los casos). Sólo un 10% de las infecciones verticales se dan antes del tercer trimestre. **La probabilidad de la transmisión vertical del HIV se correlaciona con la CVP de la madre.** Por lo cual, si la CVP es No Detectable (< 50 copias/ml) durante el embarazo, la probabilidad de transmisión es extremadamente baja. Los nacimientos prematuros y la rotura temprana de la bolsa son factores que incrementan el riesgo de transmisión. Por otro lado, el amamantamiento del recién nacido está contraindicado por aumentar el riesgo de transmisión perinatal.

El diagnóstico hasta los 18 meses de vida del niño debe efectuarse exclusivamente a través de ensayos virológicos. Los métodos virológicos moleculares de detección de áci-

dos nucleicos, como la detección del ARN plasmático y el DNA proviral, son los empleados preferentemente en la actualidad.

Un tercio de los niños infectados pueden ser diagnosticados dentro de las 48 horas de nacidos a través de la detección de DNA proviral por PCR. La sensibilidad de un solo ensayo de DNA-HIV realizado a menos de 48 horas de vida es menor al 40%, pero aumenta al 93% durante la segunda semana y alcanza el 96% a los 28 días de vida, y con una especificidad del 99%. El valor predictivo del negativo es del 100% a los 6 meses de vida. La detección de DNA proviral con ensayos de qPCR presenta una sensibilidad superior a la de los ensayos de PCR a punto final.

El algoritmo comienza con un *primer estudio entre 24 y 72 horas de vida preferentemente, o entre 14 y 30 días*. En caso de resultados negativos, se realiza un *segundo estudio entre el primer y segundo mes de vida*. En caso de un nuevo resultado negativo, se hace un *tercer estudio entre el cuarto y sexto mes de vida*.

Se descarta la infección por HIV en un niño cuando 2 ensayos de detección de Acs a-HIV-1/2 son negativos después de los 6 meses de vida, con un intervalo de por lo menos un mes entre ambas, o un ensayo de detección de Acs a-HIV-1/2 negativo después de los 18 meses de vida en ausencia de síntomas clínicos de infección, ausencia de hipogamaglobulinemia y ensayos virológicos negativos.

Se considera que un niño está infectado por HIV cuando tiene 2 pruebas virológicas positivas obtenidas en 2 muestras de sangre diferentes.

4.1.4. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN, NOTIFICACIÓN Y TESTEO

En 2021, se cumplieron 2 décadas desde que en la Argentina se estableciera la obligatoriedad de reportar los nuevos diagnósticos de HIV a la autoridad sanitaria, ya que hasta 2001 sólo se notificaban casos de SIDA. Durante la primera década de este siglo ambos eventos se vigilaron en paralelo, pero ya en la siguiente el reporte de casos de SIDA fue perdiendo fuerza a raíz de los cambios en los procesos salud/enfermedad del HIV, debidos principalmente al amplio acceso a la medicación antirretroviral en nuestro país entre quienes estaban diagnosticados. A su vez, se sumaron otros 2 eventos de vigilancia epidemiológica relacionados con la transmisión vertical: ex-puestos perinatales y embarazos en gestantes con HIV.

El ***diagnóstico tardío*** es uno de los principales indicadores que se monitorea, ya que da cuenta del impacto de las estrategias puestas en marcha para facilitar el acceso al diagnóstico y eliminar barreras dentro y fuera de los servicios de salud. En Argentina, el ***diagnóstico tardío*** se define como aquel que ocurre cuando una persona se encuentra en una situación sintomática, con o sin criterio definidor de SIDA y/o con un conteo de linfocitos CD4+ plasmáticos menor a 200 células/ml.

La ***prevención combinada*** implica la oferta integral de servicios para el abordaje del HIV y otras infecciones de transmisión sexual (ITS) que sean adecuados a cada persona. Desde este enfoque, un centro de testeo necesita ofrecer servicios de diagnóstico y consejería que puedan incorporar fácil y rápidamente a las personas al sistema de salud y acelerar el inicio del tratamiento.

El *Plan Estratégico 2021-2026* de ONUSIDA propone maximizar el acceso a los servicios relacionados con el HIV y derribar las barreras que impiden que las poblaciones

clave accedan a ellos, como pilares fundamentales para alcanzar el fin de la epidemia. En este marco, se propone a los **autotest de HIV** como una herramienta adicional en la respuesta a la epidemia, que permite a las personas hacerse el test en forma autónoma y privada, cuando y donde prefieran. Los autotest disponibles en el mercado muestran un desempeño comparable al de los métodos rápidos para diagnóstico y varios de ellos fueron precalificados por la OMS, que recomienda su incorporación a las políticas nacionales de diagnóstico con especial foco en las poblaciones clave. Desde el año 2010, los Estados miembros de la OPS asumieron el compromiso de impulsar la eliminación de la transmisión materno infantil (ETMI) de la infección por el HIV y la sífilis. Estos compromisos se renovaron y ampliaron en el año 2016 mediante la aprobación del “*Plan de acción para la prevención y el control de la infección por el VIH y las infecciones de transmisión sexual 2016-2021*” al cual Argentina adhirió. Este Plan amplía la iniciativa de ETMI (se renombra como “ETMI-Plus”) para incluir la eliminación de otras enfermedades transmisibles prevenibles, como la hepatitis B y la enfermedad de Chagas. Así, en 2022, Ministerio de Salud de Nación publica los “*Algoritmos de diagnóstico y tratamiento para el control de las infecciones perinatales por VIH, sífilis, hepatitis B y Chagas - Iniciativa ETMI-PLUS*”. Si bien el algoritmo diagnóstico propuesto durante el embarazo no difiere de aquel que se realiza en otras personas adultas, recomienda:

- priorizar el uso de pruebas rápidas o estándares (EIA) de 4^a generación para HIV-1 en la primera consulta obstétrica en el Primer Nivel de Atención, en tiempo real y que permita tomar una conducta terapéutica activa en el mismo momento si fuera necesario. Por ejemplo, solicitud, derivación y toma de muestra para realización de CVP antes de iniciar tratamiento.
- ofrecer el testeo a la/s pareja/s para no desaprovechar oportunidades diagnósticas.
- considerar el embarazo como un **escenario clínico de urgencia** en términos de diagnóstico e inicio de tratamiento antirretroviral. En Durante ese mismo año, se sanciona la *Ley N°27675 - Ley nacional de respuesta integral al VIH, hepatitis virales, otras infecciones de transmisión sexual (ITS) y tuberculosis (TBC)*. A diferencia de la normativa anterior (*Ley 23.798 - Ley Nacional del SIDA*) que tiene un enfoque médico, la nueva ley tiene una perspectiva de derechos humanos. Entre sus artículos indica:
 - Declarar de **interés público nacional** la respuesta integral e intersectorial a la infección por HIV-1, las hepatitis virales, ITS y TBC, así como los medicamentos, vacunas, procedimientos y productos médicos y no médicos para la prevención, diagnóstico, tratamiento y cura, la disponibilidad de formulaciones pediátricas y el acceso universal, oportuno y gratuito a los mismos.
 - Los agentes del servicio público de salud, las obras sociales y las empresas de medicina prepagas, están obligadas a brindar asistencia integral, universal, gratuita, a las personas expuestas y/o afectadas.
 - Se prohíbe la oferta y la realización de la prueba diagnóstica de HIV-1, hepatitis virales y otras ITS en los **exámenes médicos preocupacionales**, como así también durante el transcurso y como parte de la relación laboral. En el caso de acciden-

tes de trabajo podrá requerirse la prueba diagnóstica al sólo efecto de proteger la salud de la persona afectada.

- Ninguna **institución educativa**, pública o privada, podrá solicitar pruebas de HIV-1, hepatitis virales, otras ITS y/o TBC a postulantes e integrantes de la comunidad educativa como requisito de ingreso, permanencia, promoción o para el acceso a becas.
- Toda prueba deberá ser **voluntaria** (con el consentimiento de la persona), **gratuita** (en todos los subsistemas de salud), **confidencial** (la prueba como el resultado), **universal** (para toda persona que la solicite), **realizada con el debido asesoramiento** (previo y posterior al testeo y garantice la vinculación con los sistemas de salud).

La Ley N° 27675 junto con la Resolución N° 731/2023 de la Superintendencia de Servicios de Salud, establecieron la obligatoriedad de cobertura de la **Profilaxis Pre-Exposición** (PrEP) en el sistema privado y de la seguridad social. La PrEP consiste en el uso de medicación antirretroviral para reducir su posibilidad de infección en personas HIV-1 negativas y en riesgo sustancial de contraer el virus. La PrEP se refiere al uso continuo o a demanda de medicación antirretroviral antes de las situaciones de exposición. La PrEP oral basada en la combinación de *tenofovir disoproxil fumarato* (TDF) con emtricitabina (FTC) o lamivudina (3TC) es altamente efectiva para prevenir la transmisión del HIV y su uso está fuertemente recomendado en personas en riesgo sustancial de infección.

La **Profilaxis Post-Exposición** (PEP) se refiere al uso de medicación antirretroviral luego de una exposición potencial al HIV-1 para reducir la posibilidad de transmisión, y debe iniciarse dentro de las 72 horas de producido el evento, idealmente en las primeras 2 horas, con una duración de cuatro semanas. Pasados los 5 días no existe evidencia de beneficio de la PEP y no se ofrece ni recomienda la misma. Se prefieren esquemas disponibles localmente, con buena tolerancia y baja toxicidad, a fin de mejorar la adherencia y cumplir el objetivo de completar el tratamiento, como por ejemplo TDF/3TC (300/300 mg) en 1 comprimido/día.

4.2. VIRUS LINFOTRÓPICO HUMANO TIPO 1 Y 2

Los **Virus Linfotrópicos T Humanos** (HTLV) tipo 1 (HTLV-1) y tipo 2 (HTLV-2) se agrupan dentro del género *Deltaretrovirus* en la sub-familia *Orthoretrovirinae* de la familia *Retroviridae*.

HTLV-1 y HTLV-2 son retrovirus complejos que infectan seres humanos con vías de transmisión similares al HIV-1 pero que presentan importantes diferencias en aspectos virológicos y con las interacciones que establecen con el hospedero. A diferencia del HIV-1 que posee una variabilidad genómica importante, los HTLVs son relativamente estables. Esta escasa variabilidad genética se debe principalmente a la ausencia o baja frecuencia de ciclos replicativos utilizando la transcriptasa reversa viral, conocida por introducir mutaciones en alta frecuencia. Esta característica determina que la infectividad asociada a las partículas libres extracelulares sea muy baja colaborando con la persistencia de la infección en el organismo y evadiendo la respuesta inmune del hospedero. En relación con el tropismo viral, el HTLV-1 infecta preferencialmente los linfocitos T CD4+ mientras que el HTLV-2 infecta preferencialmente los linfocitos T CD8+.

Otro aspecto relevante de HTLV-1 y HTLV-2 es la distinta asociación de estos retrovirus con patologías humanas. Mientras que se desconoce el rol etiopatogénico del HTLV-2, el HTLV-1 ha sido reconocido como el agente etiológico de 2 enfermedades específicas denominadas **Leucemia a Células T del Adulto** (ATL, *Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*) y **Mielopatía Asociada al HTLV-1 o Paraparesia Espástica Tropical** (HAM/TSP, *HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis*). Se estima que 1-5% de los sujetos HTLV-1 seropositivos desarrollarán HAM/TSP o ATL a lo largo de su vida, sugiriéndose un contexto multifactorial que involucra la carga proviral del inóculo al momento de la infección, el haplotipo HLA del individuo, la vía de infección primaria y la cepa viral, entre otros. De esto se desprende que es de suma importancia diferenciar la infección de estos retrovirus. En efecto, la detección de anticuerpos para HTLV-1/2 en donantes de sangre en Argentina es obligatoria desde 2005 (Resolución 865/2006 del Ministerio de Salud y Ambiente). Sin embargo, no es obligatoria en mujeres embarazadas.

La ATL asociada a la infección por HTLV-1 es un proceso linfoproliferativo de linfocitos T CD4+ maduros. La mayoría de los pacientes infectados por HTLV-1 son portadores asintomáticos del virus y sólo el 1-5% de ellos desarrollará una forma sintomática de la enfermedad. La ATL tiene un período de incubación mínimo de 20 años con una edad de presentación promedio de 50 años y similar en ambos sexos. Se desarrolla con más frecuencia en individuos infectados por transmisión madre a hijo por vía vertical o por amamantamiento, lo que resulta en una mayor incidencia intra-familiar.

La ATL presenta características clínicas semejantes a otras leucemias agudas. El diagnóstico debe considerar características clínicas, epidemiológicas y resultados de laboratorio, tales como la morfología de linfocitos, el inmunofenotipo, la histología de los tejidos afectados en los casos de linfoma, detección de anticuerpos anti-HTLV-1 en plasma/suero y del genoma viral en los cortes histológicos. Son patognomónicos los linfocitos pleomórficos con núcleos hipersegmentados en forma de trébol en sangre periférica y la hipercalcemia. En cuanto al tratamiento, hasta el momento las terapias disponibles presentan una eficacia mínima. Una de las últimas estrategias empleadas consiste en el uso combinado de zidovudina (AZT) e interferón α seguida de quimioterapia convencional.

El HTLV-1 es capaz de inducir la inmortalización de los linfocitos T CD4+ en cultivo, causando una proliferación inicialmente policlonal que es seguida por una expansión de tipo oligoclonal o monoclonal. En los pacientes con formas agudas de ATL, los linfocitos tumorales derivan de un único clon celular y no se detecta replicación viral activa en los clones leucémicos. Se ha descrito que la proteína viral *tax*, que regula de forma positiva la replicación del virus, induce a su vez la expresión de distintos genes celulares entre los que se encuentra el receptor de alta afinidad para la interleucina 2 (IL-2). La expresión de este receptor está aumentada en los linfocitos infectados, lo que los hace susceptibles de experimentar una expansión clonal inducida por IL-2.

La HAM/TSP es un síndrome neurológico desmielinizante caracterizado por la destrucción celular y por un proceso inflamatorio en el sistema nervioso central que afecta principalmente la espina dorsal y el cerebro. Se manifiesta en individuos de edad adulta siendo más prevalente en mujeres. El período de incubación es de 15 a 20 años si la vía de transmisión es de madre a hijo o de tipo sexual, y de 3 meses a 3 años si la vía de transmisión

fue por transfusión. La HAM/TSP se caracteriza por una debilidad de miembros inferiores que se incrementa progresivamente hasta llegar a una discapacidad motora invalidante. El mecanismo por el cual HTLV-1 induce la HAM/TSP no está claro. Actualmente se propone que la HAM/TSP es una inmunopatología derivada de la infección retroviral en la cual HTLV-1 provocaría cambios en el comportamiento normal de sus células blanco, los linfocitos T CD4+, induciendo una respuesta de tipo Th1 con producción de altos niveles de INF- γ y IL-2. En consecuencia, los pacientes con HAM/TSP muestran niveles elevados de citoquinas inflamatorias (particularmente citoquinas neurotóxicas tales como IFN- γ y TNF- α) y proliferación espontánea de linfocitos T CD4+ en regiones de la médula espinal y altos títulos de Acs a-HTLV-1 en suero y LCR.

4.2.1. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HTLV-1/2

Como fue mencionado previamente, la mayoría de los individuos infectados con HTLV-1 o HTLV-2 son portadores asintomáticos del virus. No obstante, estos individuos son capaces de transmitir el virus debido a que el genoma proviral está integrado en el ADN de la célula infectada. El provirus retroviral puede ser identificado en las células de los pacientes asintomáticos y en aquellos con patologías asociadas a HTLV-1. Sin embargo, ambos retrovirus están asociados a células, no replican eficientemente y por lo tanto no se encuentran frecuentemente en plasma. De esto se desprende que la CVP de HTLV-1 o HTLV-2 no tiene un valor clínico de utilidad a diferencia del HIV-1.

Existen tres procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por HTLV-1/2:

- **Técnicas serológicas.** La existencia de Acs específicos frente a HTLV-1 o HTLV-2 es diagnóstico de la infección. Actualmente existen EIAs de nueva generación con formato tipo sándwich que incluyen antígenos de péptidos recombinantes y/o sintéticos para ambos tipos virales. Las muestras reactivas deben ser confirmadas con una técnica más específica como es el Western Blot. La inclusión de proteínas recombinantes de HTLV-1 y HTLV-2 en los reactivos actuales de Western Blot permite el diagnóstico diferencial entre ambos virus. El diagnóstico de positividad por Western Blot requiere la detección de anticuerpos contra 2 proteínas de la envoltura (TM: gp21, SU: gp46) y contra 1 de la nucleocápside (p24). Sin embargo, el porcentaje de resultados indeterminados por Western Blot sigue siendo elevado por lo que se recomienda realizar una PCR específica para cada tipo para confirmar la infección.
- **Detección del genoma viral integrado (ADN proviral).** Se realiza mediante PCR específica para cada retrovirus y es la metodología de elección para determinar el estado de infección. Las técnicas que se utilizan son la PCR anidada o PCR en tiempo real, en formato multiplex o en reacciones individuales. Las regiones génicas amplificadas son generalmente el gen *pol* (HTLV-1) y el gen *tax* (HTLV-2). Como muestra se utilizan células mononucleares de sangre periférica.
- **Cuantificación de la carga proviral de HTLV-1.** Algunos estudios sugieren que la determinación de la carga proviral podría ser un indicador de progresión de la

infección por HTLV-1 en portadores asintomáticos para evaluar la propensión al desarrollo de las patologías asociadas. Si bien hasta el momento no se ha encontrado una asociación positiva entre la carga proviral de HTLV-1 y el desarrollo de ATL o HAM/TSP, esta determinación es una herramienta útil en el monitoreo de la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos o antirretrovirales. Se realiza utilizando la técnica de PCR en tiempo real a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados por HTLV-1

Bibliografía

- Alexander TS. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clin Vaccine Immunol* 2016;23(4):249-53. doi: 10.1128/CVI.00053-16.
- Parekh BS, Ou CY, Fonjongo PN, Kalou MB, Rottinghaus E, Puren A, Alexander H, Hurlston Cox M, Nkengasong JN. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 2018;32(1):e00064-18. doi: 10.1128/CMR.00064-18.
- Armstrong WS, Guarner J, Kraft CS, Caliendo AM. Human Immunodeficiency Virus. *Microbiol Spectr* 2016;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0024-2015.
- OPS. Plan de acción para la prevención y el control de la infección por el VIH y las infecciones de transmisión sexual 2016-2021.
- Bouzas, M. B.; Cudola, A.; Salomón, H.: Propuesta sobre nuevos algoritmos de diagnóstico de VIH, Dirección de Sida y ETS, Ministerio de Salud de la Nación y Organización Panamericana de la Salud, Buenos Aires, 2013.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2022. Algoritmos de diagnóstico y tratamiento para el control de las infecciones perinatales por VIH, sífilis, hepatitis B y Chagas - Iniciativa ETMI-PLUS.
- UNAIDS. Global AIDS Strategy 2021-2026 — End Inequalities. *End AIDS* 2021;164. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Boletines epidemiológicos.
- Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Rev Esp Quimioter* 2019;32(6):485-496.
- Brites C, Grassi MF, Quaresma JAS, Ishak R, Vallinoto ACR. Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. *Braz J Infect Dis* 2021;25(3):101594. doi: 10.1016/j.bjid.2021.101594.
- Miró JM, Sued O, Plana M, Pumarola T, Gallart T. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1 [Advances in the diagnosis and treatment of acute human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(10):643-59.

Capítulo 5

HEPATITIS VIRALES

Germán R. **Perez**

Ana Laura **Cavatorta**

Agustina **Cerri**

Elisa M. **Bolatti**

Miguel A. **Taborda**

Adriana A. **Giri**

5.1. INTRODUCCIÓN

Se define como **hepatitis** a la lesión inflamatoria difusa del hígado producida por variados agentes etiológicos que clínicamente puede ser asintomática o cursar con grados variables de insuficiencia hepática. A nivel bioquímico, presenta en forma constante elevación de aminotransferasas. Dentro de las diferentes causas se encuentran agentes infecciosos, trastornos metabólicos, sustancias tóxicas y drogas.

Las **Hepatitis virales** son enfermedades infectocontagiosas caracterizadas por un proceso inflamatorio sistémico con selectividad hepática, producidas por diferentes agentes virales hepatotropos [virus de la hepatitis A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV), E (HEV)] o no hepatotropos (CMV, EBV, etc) que causan enfermedades agudas similares clínicamente, pero diferenciables por el modo de transmisión, la evolución y el hallazgo de los marcadores virológicos específicos.

Ninguno de los virus de la hepatitis es citopático *per se*, de manera que las manifestaciones clínicas que están asociadas al daño del tejido hepático se deben a la respuesta que desencadena el sistema inmunitario del individuo a la infección viral. Los síntomas pueden ser fiebre, malestar general, anorexia, náuseas y dolor abdominal, ictericia y hepatomegalia que, en caso de resolución, desaparecen espontáneamente en 2 a 3 semanas.

5.2. VIRUS DE LA HEPATITIS A

HAV es un virus de ARN monocatenario lineal de polaridad positiva, que pertenece al género *Hepatitisvirus* de la familia *Picornaviridae*. Cada partícula viral tiene un diámetro de 27 a 32 nm y carece de envoltura. Es muy estable y puede sobrevivir en el medio ambiente por más de 3 meses, siendo resistente a agentes físicos y productos químicos, así como a temperaturas de hasta 56°C o tan bajas como -20°C.

La infección por HAV suele asociarse a una *enfermedad autolimitada* que provoca una inflamación temporal del hígado (lesión del parénquima hepático) pero que no requiere tratamiento específico. No obstante, en casos excepcionales la infección puede asociarse a una enfermedad grave, cuya consecuencia es una insuficiencia hepática o la muerte.

El HAV se detecta en las heces de las personas infectadas y suele transmitirse a través del contacto persona a persona y del consumo de agua o alimentos contaminados por las he-

ces de individuos infectados. Esto explica su mayor prevalencia en individuos residentes en zonas con deficientes sistemas sanitarios: la tasa de infección es inversamente proporcional a las condiciones sanitarias de la población.

5.2.1 MARCADORES VIRALES

5.2.1.1. Acs IgM a-HAV: Se utiliza para el *diagnóstico de infección aguda*, dado que siempre es positivo en el inicio de la sintomatología clínica, manteniéndose por 3-6 meses. La positividad de este marcador es de denuncia obligatoria en los sistemas de vigilancia epidemiológica.

5.2.1.2. Acs IgG a-HAV: Su presencia demuestra *contacto previo con el virus* y se determina para estudios de pre-vacunación y seroprevalencia. Se mantiene positivo durante períodos de tiempo muy largos.

La **vacuna contra el HAV** contiene virus inactivados. Tiene una antigenicidad cercana al 100%, inmunidad duradera y eficacia protectora. Los Acs producidos por la vacuna son 200 veces mayores a los producidos en una infección natural y darían protección por aproximadamente 20 años.

En Argentina, la hepatitis A ha ocasionado brotes epidémicos cada tres a cuatro años hasta el año 2005, momento en el que se incorporó la vacuna al año en el Calendario Nacional de Vacunación (Resolución Ministerial N°653/05). Hasta entonces la hepatitis A era la causa principal de *fallo hepático fulminante* (FHF) en la Argentina en niños menores de 10 años, llegando en algunos casos a la necesidad del trasplante hepático. El último trasplante realizado en la Argentina por FHF por HAV fue en el año 2006. La notificación de casos de hepatitis A se redujo de más de 40.000 casos/año (2004) a menos de 2.000 (2008). La vacuna contra el HAV puede inducir concentraciones protectoras de anticuerpos antes del periodo de incubación habitual de 30 días de la infección, por lo que es posible utilizar la vacuna para interrumpir un brote. Se recomienda administrar la vacuna dentro de las 2 semanas posteriores a la exposición al HAV, a personas de 12 meses a 40 años.

5.2.1.3. Detección del HAV: La detección de virus en heces o en sangre mediante técnicas de EIA de captura de antígeno o del genoma por RT-PCR no se realiza rutinariamente y *sólo se emplea en estudios de investigación*.

5.2.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.2.2.1. INDIVIDUO CON HEPATITIS A AGUDA: Con un periodo de incubación de la enfermedad que oscila entre 15 y 30 días, la infección proporciona inmunidad permanente (durante toda la vida) con presencia de Acs IgG a-HAV. Las personas que padecen hepatitis A transmiten la infección durante la segunda mitad del periodo de incubación y continúan haciéndolo hasta algunos días después del inicio de la ictericia. En los casos anictéricos (ausencia de ictericia), el periodo de mayor transmisión de la enfermedad coincide con la elevación máxima de los niveles de las transa-

minas. Luego de la primera semana de la ictericia, es probable que la mayor parte de las personas no sean transmisoras, aunque se han identificado viremias de larga duración (hasta 30 a 45 días). En las formas recidivantes, la persona vuelve a eliminar partículas virales infectivas.

La Figura 13 esquematiza el curso natural de una infección aguda por HAV.

A continuación se describen formas clínicas que aparecen con menor frecuencia, pero que tienen características particulares:

- **Hepatitis fulminante:** forma grave de hepatitis caracterizada por la aparición de insuficiencia hepática, marcada por la coagulopatía, ictericia y encefalopatía.
- **Hepatitis colestásica:** se presenta con colestasis marcada (valores de fosfatasa alcalina y bilirrubina elevados), generalmente acompañada de prurito y escasamente con alteraciones de la coagulación.
- **Hepatitis bifásica:** luego de que se ha producido la recuperación del cuadro inicial de hepatitis, reaparecen signos clínicos y/o de laboratorio.
- **Hepatitis prolongada:** las manifestaciones clínicas y de laboratorio de hepatitis se extienden por un periodo mayor a 3 meses.

En los niños menores de 7 años la hepatitis A es oligo o asintomática en un 70 a 80% de los casos, pero son los que más excretan virus y, por consiguiente, los mayores transmisores de la infección. Entre los adultos solo el 25% de los casos no presenta síntomas. Tanto en los adultos como en los niños el proceso es autolimitado: más del 85% de las personas con hepatitis A se recuperan en un período de tres meses, con un lapso que varía entre 1 a 2 semanas hasta 5 a 6 meses. **La infección por HAV no evoluciona a la cronicidad.** La forma bifásica se presenta en un 8% a un 10% de los casos, mientras que la hepatitis fulminante con necrosis hepática es muy excepcional y puede ser mortal.

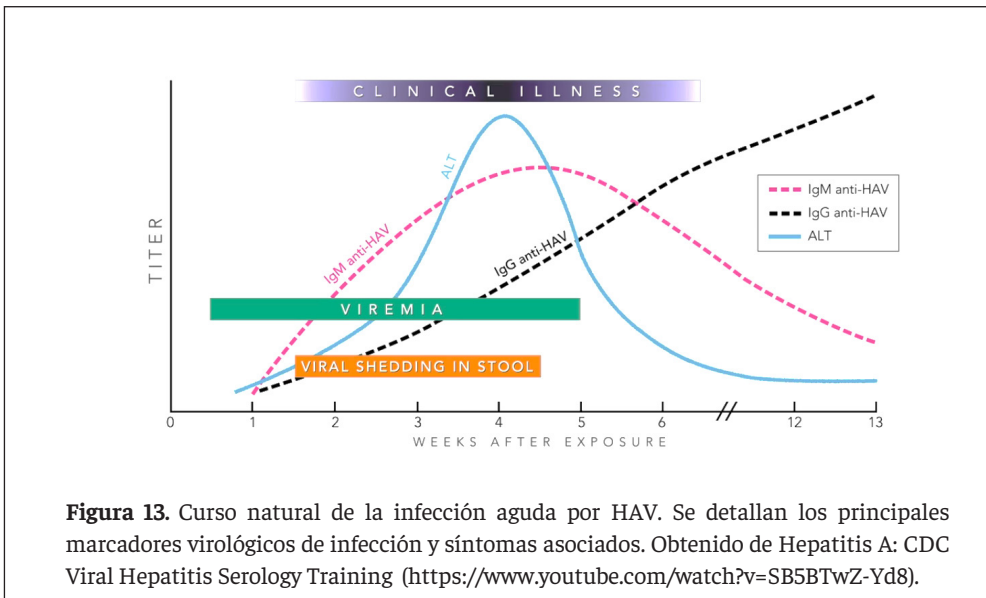


Figura 13. Curso natural de la infección aguda por HAV. Se detallan los principales marcadores virológicos de infección y síntomas asociados. Obtenido de Hepatitis A: CDC Viral Hepatitis Serology Training (<https://www.youtube.com/watch?v=SB5BTwZ-Yd8>).

5.2.2. INDIVIDUO CON INFECCIÓN RESUELTA O VACUNADO: La presencia de Acs IgG a-HAV indica, dependiendo de la situación, el contacto previo con el virus, la resolución de una Hepatitis A aguda o la efectividad del esquema vacunal.

5.3. VIRUS DE LA HEPATITIS B

EL HBV es un virus de genoma de DNA circular doble cadena parcial que pertenece al género *Ortohepadnavirus* de la familia *Hepadnaviridae*. El virión completo (denominado partícula de Dane) de 42 nm de diámetro se compone de: (i) una envoltura formada por proteínas virales (antígenos de superficie) y bicapa lipídica derivada del hospedero, y (ii) una partícula central (*core*) compuesta por proteínas de la nucleocápside (antígeno del core), el genoma viral y un complejo polimerasa. HBV también genera partículas esféricas (20-22 nm de diámetro) o filamentosas compuestas sólo por proteínas de la envoltura (antígeno de superficie) por lo que no son infecciosas. Estas partículas son mucho más numerosas que los viriones, en proporción de 1.000 – 10.000 partículas por cada virión.

El genoma del HBV (-3.2 kB) presenta 4 marcos abiertos de lectura (ORF: *open reading frame*) parcialmente solapados que codifican las distintas proteínas virales:

- ORF PreS/S codifica 3 proteínas de envoltura diferentes (HBsAgS: antígeno de superficie), estructuralmente relacionadas, que se sintetizan a partir de codones de iniciación alternativos y se denominan grande (HBsAg-L), media (HBsAg-M) y pequeña (HBsAg). Las 3 proteínas tienen diferentes extensiones del extremo amino terminal pero comparten el mismo extremo carboxilo terminal. Estas proteínas contienen los principales dominios antigénicos virales, en particular, el determinante “a” que lleva el dominio de neutralización de los Acs a-HBs.
- ORF P codifica la polimerasa viral, una proteína multifuncional que posee actividades de transcriptasa inversa, ADN polimerasa dependiente de ADN y ARNasa H, y también funciona como una proteína terminal para la iniciación.
- ORF pre-Core/Core codifica la proteína estructural de la nucleocápside viral (HBcAg: antígeno del core) y la proteína “e” no estructural secretada (HBeAg: antígeno e). Estas 2 proteínas virales derivan de la iniciación alternativa de la traducción en 2 codones de iniciación en marco.
- ORF X codifica la proteína reguladora X que es esencial para la replicación viral y puede modular directa e indirectamente la expresión de genes del hospedero y del virus.

La infección del HBV ocurre por la exposición directa con la sangre o sus derivados, a través del contacto sexual y por transmisión vertical. Más del 60% de las infecciones por HBV son asintomáticas.

Luego de una infección aguda, aproximadamente el 5% de los adultos, más del 90% de los neonatos y hasta el 30% de los niños menores de 5 años pueden evolucionar a la cronicidad. Alrededor del 1% de los cuadros sintomáticos agudos pueden desarrollar insuficiencia hepática. La hepatitis fulminante se produce en menos del 1% de los casos de hepatitis B, pero en nuestro país representa la causa más frecuente de trasplante hepático en adultos por hepatitis fulminante. **Se define infección crónica por HBV a la persistencia del HBsAg por más de 6 meses.**

Se calcula que existen 350 millones de personas a escala mundial infectadas crónicamente con el HBV, de las cuales el 25% termina sufriendo graves daños hepáticos (fibrosis y cirrosis) con el paso de los años. En los casos graves, la hepatitis B puede ocasionar insuficiencia hepática y resultar mortal. El HBV es el causante de hasta el 80% de los casos de cáncer de hígado en todo el mundo.

Existe una vacuna eficaz para prevenir el HBV. También hay distintos tratamientos que pueden reducir o detener la progresión de la enfermedad.

5.3.1. MARCADORES VIRALES

Las técnicas serológicas actuales permiten detectar, en los pacientes infectados, los antígenos del HBV y la respuesta de Acs frente a dicha infección con distintos grados de sensibilidad y especificidad. Su determinación cualitativa y cuantitativa nos permite realizar un diagnóstico, establecer un pronóstico fiable de la infección, con o sin tratamiento, y conocer la susceptibilidad de la población a la infección por HBV para adoptar medidas de prevención. Los métodos serológicos utilizados habitualmente en el laboratorio para la determinación de los marcadores de HBV (HBsAg, HBeAg, Acs a-HBc, Acs a-HBe, Acs a-HBs) se basan en la tecnología del EIA. Suelen utilizarse, sobre todo, técnicas de EIA tipo *sandwich* y EIA competitivo.

5.3.1.1. HBsAg (antígeno de superficie): Fue llamado inicialmente *antígeno Australiano*, pues fue el primer marcador identificado por Bloomberg en un aborigen australiano. Se sintetiza en el citoplasma del hepatocito independientemente de los viriones completos y se excreta fuera de la célula en forma de agregados esféricos o filamentosos que se pueden detectar libres en el suero. *Aparece muy pronto después de la infección y se detecta en todas las fases de la misma.* Si la evolución es favorable, desaparecerá paulatinamente. Por el contrario, su persistencia al cabo de 6 - 8 semanas o la ausencia de una disminución significativa en su título tras el 1º mes de la enfermedad son indicadores de mal pronóstico y de evolución a la cronicidad.

La positividad de este marcador por más de 6 meses de la infección define la situación de infección persistente. Con frecuencia, esta persistencia del virus origina una *infección crónica* y, eventualmente, una *enfermedad hepática crónica*. La infección de aquellos pacientes con HBsAg detectable en suero y que no presentan marcadores de replicación vírica ni signos de lesión hepática se define como *infección crónica inactiva* del HBV. En ciertas ocasiones pueden presentarse resultados falsamente positivos al HBsAg, que deben confirmarse con la realización de *técnicas de neutralización con Acs a-HBs de alto título*. *La prueba de confirmación debe realizarse siempre ante cualquier resultado positivo para HBsAg que se observe en una muestra negativa para Acs a-HBc total o Acs IgM a-HBc, o en cualquier muestra con bajo nivel de reactividad.* Cuando es positiva, el seguimiento del paciente debe realizarse con pruebas de detección del ADN-HBV. Sin embargo, la reactividad aislada para HBsAg puede deberse a un estadio precoz de la infección aguda por HBV.

La sangre de personas infectadas con HBV contiene, adicionalmente a las partículas infectivas intactas del HBV, un excesivo número de partículas más pequeñas "vacías" no infecciosas que contienen asimismo el HBsAg. Todas las partículas tienen

en común al determinante **a** del HBsAg, objetivo principal de la respuesta inmune y vacunal.

En condiciones de selección inmune externas (causadas por tratamiento antiviral o por el propio sistema inmunológico), el HBV puede expresar diferentes tipos de mutantes del HBsAg (llamados *mutantes de escape*). Algunos mutantes pueden hacer que los análisis HBsAg de uso comercial pierdan su capacidad de detección. Así, diversas marcas comerciales han modificado sus ensayos a fin de poder detectar las mutantes de escape mediante el empleo de Acs monoclonales y policlonales anti-HBs. Algunos equipos comerciales permiten titular la concentración de HBsAg y su objetivo es ser utilizado para la respuesta al tratamiento.

5.3.1.2. Acs a-HBs (Acs contra el antígeno de superficie): Indica *recuperación o resolución de la enfermedad*, último marcador en aparecer, haciéndolo generalmente a los 3 meses de evolución de la enfermedad aguda. Persiste durante muchos años, es capaz de neutralizar el virus y de conferir protección frente a la reinfección.

En los *individuos vacunados* con respuesta inmunológica es el *único marcador presente*. Es recomendable el testeo de Acs a-HBs a las 4 semanas después de la última dosis en el personal de la salud, parejas de portadores crónicos de HBV e inmunocomprometidos, considerándose que existe protección si el nivel de Acs es mayor a 10 mUI/ml. Quienes no respondan, deben ser vacunados nuevamente con un esquema completo. No está indicada la revacunación en personas inmunocompetentes.

La introducción de la vacunación frente al HBV y el monitoreo de la respuesta inmune a la vacuna hizo necesario el desarrollo de técnicas serológicas cuantitativas. La mayoría de los EIA comerciales incorpora un panel de Acs a-HBs de cuantificación. El panel incluye habitualmente 5 o 6 estándares que contienen una concentración creciente y conocida de un Ac policlonal humano a-HBs, expresada en mUI/ml (0, 10, 30, 100, 300 y 1.000 mUI/ml). Los resultados de las muestras estudiadas en el mismo ensayo se comparan con los valores de una curva de calibración estándar obtenida a partir del panel de cuantificación.

5.3.1.3. Acs a-HBc (Acs contra el antígeno del core): Se suele detectar mediante 2 tipos de ensayos:

– **Acs a-HBc totales:** Acompaña siempre a los Acs a-HBs tras la recuperación, así como al HBsAg durante la persistencia. Su hallazgo como único marcador puede reflejar una infección pasada y resuelta, dada la larga persistencia de estos Acs en el suero. Sin embargo, dicho hallazgo no asegura la protección frente a la reinfección, ya que los Acs a-HBc no poseen capacidad neutralizante.

– **Acs IgM a-HBc:** Es un indicador de *infección aguda reciente*. No sólo se detecta durante la fase aguda, sino que también puede detectarse, ocasionalmente, en los casos de enfermedad crónica con replicación activa del virus y lesión hepática, aunque su concentración suele ser menor. Algunas pruebas comerciales modifican deliberadamente la sensibilidad para que únicamente ocasionen reacciones positivas en los casos de infección aguda. La persistencia de los Acs IgM a-HBc es variable, pudiéndose prolongar hasta 12 - 18 meses, con títulos decrecientes, en los casos de enfermedad aguda autolimitada.

5.3.1.4. HBeAg / Acs a-HBe (antígeno e / Acs contra el antígeno e): El HBeAg se excreta en forma libre de los hepatocitos infectados y se detecta en el suero de la mayoría de los enfermos que se encuentran en la fase aguda, así como en algunas formas de enfermedad crónica en las que, histológicamente, suele corresponderse con patrones de hepatitis crónica activa. El valor diagnóstico de la detección de este antígeno se basa en su *excelente correlación con la presencia de replicación del virus y viremia*. La sangre de los individuos positivos para HBeAg debe considerarse siempre con alto nivel de infectividad. El estudio del HBeAg es necesario en todos los pacientes con infección crónica por HBV. La mayoría de los pacientes que resultan positivos para HBeAg presentan valores de viremias entre 10^5 y 10^8 copias/ml.

La desaparición del HBeAg en la evolución de una hepatitis crónica suele indicar un buen pronóstico y con frecuencia el inicio de una fase de erradicación del virus que conduce a la resolución total de la infección. Sin embargo, también puede suceder que la ausencia de HBeAg en el suero de un paciente crónico coexista con una replicación viral persistente, lo que implica un peor pronóstico de la enfermedad (infecciones crónicas por variantes pre-core defectuosas). Por lo tanto, la detección del ADN-HBV es imprescindible para caracterizar estos casos.

La aparición de los Acs a-HBe en el curso de una infección aguda indica, generalmente, buena evolución y una baja infectividad del paciente. En la mayoría de los casos se detecta poco antes de que desaparezca el HBsAg, pudiendo mantenerse positivo durante varios años después de la infección. En los casos de hepatitis crónica en los que coexiste con HBsAg suele indicar escasa actividad replicativa del HBV, coincidiendo casi siempre con diagnósticos histológicos de hígado "normal" o de hallazgos histológicos hepáticos compatibles con hepatitis crónica con bajos índices de lesión hepática. En contraste, en las infecciones crónicas por variantes pre-core defectuosas, la seroconversión para los Acs a-HBe no supone una mejoría ni clínica ni histológica y se asocia con mucha frecuencia a cuadros histológicos de hepatitis crónica activa y/o cirrosis (ver ítem 3.2.4).

5.3.1.5. ADN-HBV: *La detección del ADN-HBV en el suero o plasma constituye el marcador de elección para detectar la viremia y refleja la replicación del virus en los hepatocitos.* El ADN-HBV es detectable en un elevado número de pacientes HBeAg positivos y su positividad se suele correlacionar con el HBeAg intrahepático, con la ventaja de que su determinación no precisa biopsia. Actualmente existen métodos comerciales muy sensibles, rápidos y sencillos que permiten detectar y cuantificar la viremia mediante este marcador. La determinación cuantitativa del ADN-HBV es importante en el seguimiento y el tratamiento de pacientes con infección crónica por HBV.

5.3.1.6. Detección de mutantes de resistencia al tratamiento: Se han desarrollado pruebas capaces de detectar la aparición de mutantes potencialmente resistentes al tratamiento.

5.3.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Es importante recordar que, aunque la sensibilidad y especificidad absolutas son parámetros que debemos considerar en cualquier técnica, los valores predictivos po-

sitivo y negativo, que variarán en función de la población estudiada, son los más importantes en la práctica clínica. Esto quiere decir que *se debe aplicar siempre el ensayo adecuado a la población que lo requiera*.

Es también importante mencionar que el laboratorio no debe ser un mero emisor de resultados validados, sino que tiene que emitir un informe que interprete el conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de cada muestra. Por todo ello, se deben escoger los marcadores adecuados en función del cuadro clínico del paciente y, en ocasiones, aplicar algoritmos diagnósticos, utilizando los ensayos de un modo secuencial (Figura 14).

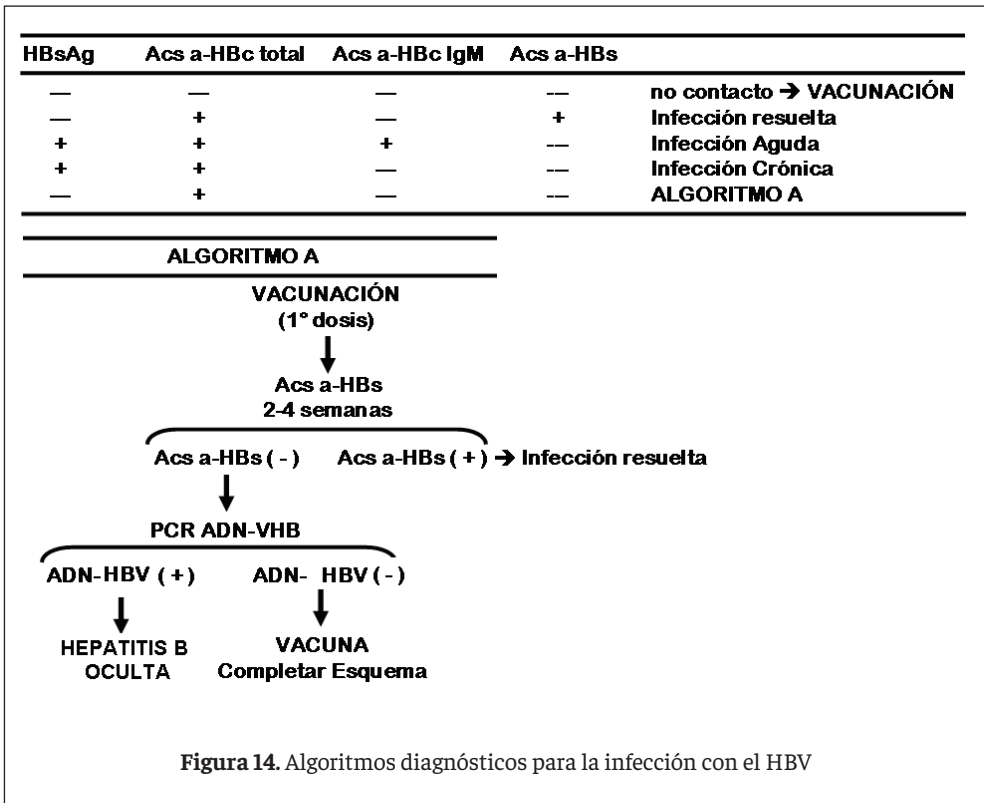


Figura 14. Algoritmos diagnósticos para la infección con el HBV

5.3.2.1. Individuo sin contacto previo con el HBV: A estas personas se les recomienda realizar *el esquema de vacunación completo* (3 dosis: tiempo 0, al mes, y a los 6 meses) sobre todo si forman parte del considerado *grupo de riesgo* (personal sanitario, convivientes con enfermos agudos o portadores de HBV, recién nacidos de madres portadoras de HBV, pacientes en programa de hemodiálisis, pacientes en programa de trasplantes, pacientes que requieran múltiples transfusiones de sangre o hemoderivados, etc).

Los estudios post-licencia de la vacuna han demostrado que tras las 3 dosis se induce una respuesta protectora de Acs en el 95%-98% de los individuos vacunados, por lo cual *es necesario al finalizar el esquema realizar el dosaje de Acs a-HBs (30-60 días)*. Se consideran títulos protectores los iguales o superiores a 10 mU/ml de Acs a-HBs, pudiéndose encontrar estos niveles normalmente a partir de la 2° semana de la 2° dosis.

De manera general, la respuesta inmunitaria es mayor en niños y adolescentes que en adultos. Varios estudios han demostrado que tras 3 dosis, tanto en los niños como en los adultos que hayan desarrollado Acs protectores, la protección tiene una duración de al menos 15 años. A pesar del decaimiento de los Acs protectores en el tiempo, debido a la presencia de una memoria inmunológica, se establece la respuesta inmune tras la exposición al virus en individuos inmunocompetentes.

Dentro del *calendario vacunal*, se pueden emplear 2 pautas de vacunación:

- con inicio al nacimiento y continuación a los 2 y 6 meses de edad
- con inicio a los 2 meses y continuación a los 4 y 6 meses

Los hijos de madres HBsAg positivo deben recibir una dosis de vacuna y la gammaglobulina-hiperinmune (GGHI) a-HBV en las primeras 12 horas tras el nacimiento. La 2° dosis se administrará al mes de vida y la 3° dosis a los 6 meses. En los casos de desconocimiento del HBsAg de la madre se deberá administrar la vacuna en el neonato al nacimiento e investigarlo de manera que, en caso de ser positivo, pueda administrarse la GGHI a-HBV en la 1° semana de vida.

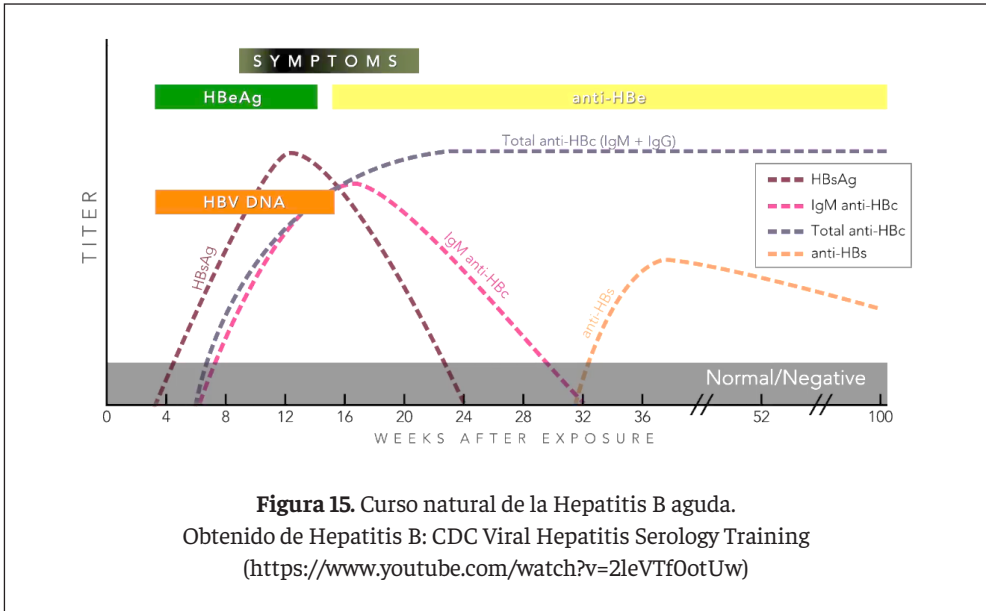
5.3.2.2. Individuo con infección resuelta: La presencia de Acs a-HBc totales y Acs a-HBs junto con HBsAg negativo, indica el contacto previo con el virus y la resolución de una Hepatitis B aguda.

5.3.2.3. Individuo con Hepatitis B aguda: El perfil de los marcadores serológicos en la infección aguda está claramente definido y permite seguir en cada paciente la evolución de la infección. A las 6 semanas después de la infección viral se detectan HBsAg y marcadores de replicación viral activa (HBeAg y ADN-HBV) previamente al comienzo de los síntomas clínicos o alteraciones bioquímicas. Estos marcadores permanecen positivos durante toda la fase prodrómica y al inicio de la fase clínica (Figura 15).

El diagnóstico de Hepatitis B aguda puede establecerse por demostrar la presencia de Acs IgM a-HBc junto al HBsAg. A los 6 meses ya pueden desaparecer los Acs IgM a-HBc predominando una respuesta de Acs a-HBc totales que persiste indefinidamente.

A los 4-6 meses suele desaparecer el HBsAg y aparecen los Acs a-HBs los cuales se asocian con la recuperación de la infección por HBV y con la inmunidad a la reinfección por este virus.

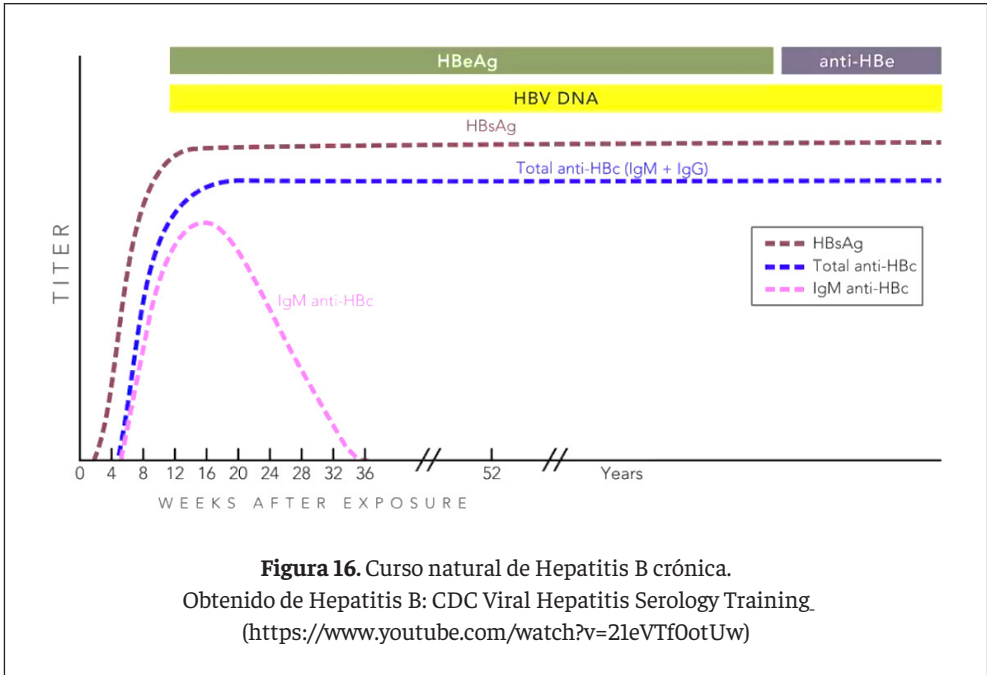
El HBeAg es detectable durante todo el periodo de replicación activa del HBV. En casi todos los casos de infección aguda, el HBeAg aparece simultáneamente o a los pocos días del HBsAg, y declina en paralelo con el HBsAg, siendo reemplazado con un pico de Acs a-HBe al comienzo de la recuperación clínica. Los Acs a-HBe pueden persistir por 1-2 años luego de la resolución de la infección por HBV.



5.3.2.4. Individuo con Hepatitis B crónica: Estos pacientes padecen una enfermedad necroinflamatoria crónica del hígado causada por la infección persistente del HBV. En la mayoría de los individuos crónicamente infectados se detecta HBsAg en suero por más de 6 meses. A nivel clínico se observa la elevación persistente o intermitente de las transaminasas y la biopsia hepática presenta actividad necroinflamatoria y grados variables de fibrosis. Casi todos los pacientes crónicamente infectados presentan títulos elevados de Acs a-HBc totales en la sangre (Figura 16).

Los pacientes con infección crónica se pueden clasificar como:

- *hepatitis B crónica con HBeAg positivo:* caracterizados por alta tasa replicativa viral (ADN-HBV > 2.000 UI/ml). Estos pacientes son altamente infecciosos para sus contactos y tienden a tener un daño hepático sustancial. Aproximadamente 10% de estos pacientes presentan reversión espontánea a un estado replicativo bajo en el cual se pierde HBeAg y se adquieren Acs a-HBe.
- *hepatitis B crónica con HBeAg negativo:* caracterizados por baja tasa replicativa viral (ADN-HBV < 2.000 UI/ml). La infectividad y daño hepático están limitados por lo que estos pacientes tienden a ser asintomáticos o presentar escasos síntomas de hepatitis.



Durante la persistencia viral, puede excepcionalmente generarse variantes con mutación *pre-core* que no producen HBeAg. La variante G1896A es la más frecuentemente detectada. La variante *pre-core* mutado suele coexistir en un mismo paciente junto a la cepa dominante que sí expresa el HBeAg (*paciente con Hepatitis B crónica HBeAg positivo*). Durante la evolución de la enfermedad, la seroconversión HBeAg/a-HBe (desaparición de HBeAg, aparición de Acs a-HBe) hace que la variante *pre-core* mutado escape al control inmunológico, se haga predominantes y prolifere profundizando el daño hepático. Estos pacientes presentan un perfil serológico similar a los pacientes con *Hepatitis B crónica HBeAg negativo* pero con cargas virales típicamente altas (ADN-HBV >2.000 UI/ml), aumentos de los valores de transaminasas y alteraciones en la biopsia hepática (inflamación-necrosis).

En pacientes con hepatitis B crónica que desarrollan cirrosis, la incidencia anual de descompensación hepática es del 3%. Las manifestaciones principales de descompensación son ascitis (49%), ictericia (12%) y sangrado de varices esofágicas o gástricas (9%).

Los pacientes con HBV pueden desarrollar hepatocarcinoma a partir de la hepatitis crónica. El ADN-HBV se integra al genoma del hospedero, provocando mutaciones y muchas veces hepatocarcinogénesis. El riesgo de hepatocarcinoma en hepatitis B crónica es 0,2–0,6% por año y se incrementa a 2% por año ante la presencia de cirrosis. El riesgo de hepatocarcinoma es mayor en pacientes con replicación viral activa. La tasa de mortalidad es de 14-20% a 5 años en pacientes con cirrosis compensada, y 70-86% en enfermos con cirrosis descompensada.

5.3.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN PATRONES SEROLÓGICOS ESPECIALES

5.3.3.1. Reactividad aislada para Acs a-HBc en ausencia de HBsAg y Acs a-HBs (ALGORITMO A, Figura 14): Es un patrón frecuente al estudiar individuos con prácticas de riesgo (10-25%). Este patrón puede responder a:

- excepcionalmente, puede ser reflejo de una infección crónica con muy baja o nula expresión de HBsAg, lo que podría ponerse de manifiesto o descartarse investigando la presencia del ADN-HBV por técnicas de amplificación genómica cuando el caso lo justifique. Aun así, la positividad aislada de Acs a-HBc no garantiza inmunidad a la reinfección, por lo que no se debe tomar como criterio de exclusión para la vacunación.
- menos frecuentemente, puede deberse a reacciones inespecíficas ligadas a componentes séricos no identificados sensibles a agentes reductores. La confirmación de especificidad se puede basar en el estudio de Acs a-HBe y valorando las características epidemiológicas y el riesgo a la infección por HBV del individuo estudiado.
- más frecuentemente, puede indicar una respuesta inmune incompleta frente a una infección previa por HBV. Esto se corrobora aplicando una dosis de la vacuna y evaluando la presencia de Acs a-HBs a las 2-4 semanas (Figura 14: Algoritmo A).

En el caso que se detecten los Acs a-HBs estamos ante una respuesta inmune incompleta o pérdida de Acs por infección natural con el HBV, por lo cual no sería necesaria la vacunación.

*En el caso que no se detecten los Acs a-HBs, se debe investigar la presencia sérica de ADN-HBV. Si la CV es no detectable, se considera que el individuo presenta una respuesta inmune incompleta y se le realiza el esquema vacunal completo (3 dosis). Si el individuo presenta CV, se considera estar en presencia de una **hepatitis B oculta**, la cual se define como la presencia de ADN-HBV detectable (bajas concentraciones: <200 UI/ml = 1.000 copias/ml) en ausencia de HBsAg. Biológicamente el aclaramiento del virus es clásicamente caracterizado por la emergencia de Acs a-HBs en el perfil serológico. Sin embargo el virus puede perpetuarse debido a su peculiar ciclo de vida, que permite la conversión del genoma del HBV en un ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc). La estabilidad y larga persistencia de las moléculas virales ADNccc junto con la larga vida media de los hepatocitos implica que la infección coSn HBV, una vez que ha ocurrido podría continuar toda la vida.*

No obstante, aún se desconoce la causa de que los portadores de hepatitis B oculta sean HBsAg negativos a pesar de la presencia del episoma viral en el hígado. Existen distintas hipótesis, desde variantes del virus que producen una proteína S modificada (mutantes S), o mutaciones capaces de inhibir la expresión del gen S y/o la replicación del virus. La relevancia clínica de la hepatitis B oculta radica en el impacto en diferentes situaciones como la posibilidad de transmisión de esta infección, la reactivación, el efecto que pudiera tener en pacientes con enfermedad hepática crónica y la probabilidad de relacionarse con el carcinoma hepatocelular.

5.3.3.2. Reactividad confirmada de HBsAg en ausencia de Acs a-HBc total: Este patrón es poco frecuente, en ocasiones, de débil reactividad y sólo detectable si se utilizan métodos de detección de HBsAg de sensibilidad < 0,3 ng/ml (0,03 UPE/ml). Si bien puede darse en la *Fase aguda precoz de una hepatitis B*: (debiendo confirmarse con la detección del ADN-HBV utilizando la misma muestra), en general suelen ser falsos positivos metodológicos especialmente ante resultados con relación de positividad bajos cuando se usan ensayos de electroquimioluminiscencia.

5.3.3.3. Reactividad aislada para Acs a-HBs en individuos no vacunados: Es un patrón muy poco frecuente (0,1-0,5%), que no se asocia a ninguna población definida. Responde en muchos casos a reacciones inespecíficas, mediadas por Acs IgM capaces de unirse al HBsAg.

5.3.4. SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON HEPATITIS B CRÓNICA

Una vez confirmada la hepatitis crónica (HBsAg detectable en suero por más 6 meses) y determinado el tipo de cronicidad (HBeAg positivo o HBeAg negativo), el seguimiento de la evolución de la enfermedad se realiza básicamente con la medición de las transaminasas, la CVP del HBV y la evaluación de la fibrosis hepática por combinación de métodos no invasivos para la valoración inicial (ecografía abdominal, elastografía y scores de funcionalidad hepática). Se reserva la biopsia hepática ante la necesidad del diagnóstico diferencial con otras patologías, o ante la discrepancia en los resultados de los métodos no invasivos para la valoración de la fibrosis. En el caso de que existan hallazgos clínicos, imagenológicos y endoscópicos de cirrosis y/o hallazgos compatibles con hipertensión portal clínicamente significativa, estos criterios serán suficientes para el diagnóstico de cirrosis.

La indicación actual del tratamiento se basa fundamentalmente en la combinación de tres criterios: transaminasas (ALT: alanina aminotransferasa), CVP-HBV y fibrosis hepática, tomando en cuenta además el estado general de la persona y la disponibilidad de las drogas antivirales (Tabla 5).

El HBeAg/Acs a-HBeAg ya no diferencia distintos grupos de personas a tratar, dado que los últimos consensos recomiendan considerar el mismo punto de corte del CVP-HBV tanto en personas HBeAg positivo como en HBeAg negativo.

Se recomienda el tratamiento de todas las personas con hepatitis B crónica con edad ≥ 12 años (incluyendo embarazadas y mujeres en edad reproductiva) portadoras de un ADN-HBV > 2.000 UI/ml y/o niveles de ALT que superen el límite superior al normal y con una histología hepática que muestre inflamación de grado moderado a severo y/o fibrosis significativa (F2 o mayor por score METAVIR) o bien pacientes con cirrosis independiente de los valores de CVP y ALT. También el tratamiento es recomendado para pacientes con coinfecciones (HIV, HDV, HCV), antecedentes familiares de hepatocarcinoma o cirrosis, inmunosupresión (ejemplo: uso de crónico de corticoides, trasplante de órganos sólidos o de precursores hematopoyéticos, etc), comorbilidades (diabetes, disfunción metabólica vinculada a esteatosis hepática), manifestaciones extrahepáticas (glomerulonefritis o vasculitis), independientemente de la fibrosis, el valor de CVP o el de ALT.

Tabla 5. EVALUACIÓN DEL PACIENTE CON HEPATITIS B CRÓNICA

CIRROSIS	ADN-HBV	ALT/FIBROSIS	TRATAMIENTO	INDICACIONES
SI	cualquier valor	cualquier valor	SI	Monitoreo de CVP y ALT semestral Iniciar vigilancia de hepatocarcinoma (HCC) Ante descomposición cirrótica, evaluar trasplante hepático
NO	≥ 2000 UI/ml	ALT elevada y/o Fibrosis F2-3	SI	Monitoreo de CVP y ALT semestral <i>En pacientes HBeAg positivo:</i> monitorear HBeAg/Acs a-HBe cada 6 meses <i>En paciente HBeAg negativo:</i> monitorear HBsAg cada 12 meses.
		ALT normal y/o Fibrosis FO-1	NO	Monitoreo de CVP y ALT semestral Evaluar fibrosis cada 2 años
	< 2000 UI/ml	ALT elevada y/o Fibrosis F2-3	NO	Descartar otras causas etiológicas. Monitoreo de CVP y ALT semestral Evaluar fibrosis cada 1-2 años
		ALT normal y/o Fibrosis FO-1	NO	Monitoreo de CV y ALT semestral Evaluar HBsAg cada 12 meses Evaluar fibrosis cada 2-3 años

5.3.5. PRINCIPIOS GENERALES DEL TRATAMIENTO DE HEPATITIS B CRÓNICA

El *objetivo del tratamiento* es erradicar o disminuir en forma significativa y sostenida la replicación viral. De esta manera se puede mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes mediante la prevención del desarrollo de cirrosis, de la descompensación de la cirrosis, de la enfermedad hepática terminal, del HCC y de la muerte relacionada con la enfermedad hepática. Además, el tratamiento previene la transmisión materno-fetal, la reactivación de la infección por el HBV y la prevención y el tratamiento de las manifestaciones extrahepáticas.

Los enfermos con Hepatitis B crónica candidatos a terapia (ver TABLA 5) deben ser sometidos a una **evaluación inicial pre-tratamiento** que consta de:

- **Pruebas de laboratorio que evalúen la enfermedad hepática:** plaquetas, transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina, albúmina, tiempo de protrombina.
- **Pruebas que midan la presencia y replicación del HBV:** CVP del ADN-HBV.
- **Evaluación de la fibrosis hepática:** elastografía por ultrasonido.

En Argentina, los antivirales recomendados para el tratamiento incluyen:

- **Fármacos de primera línea:** análogos nucleós(t)idos con alta barrera genética al virus como Entecavir (ETV), Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y Tenofovir alafenamida (TAF).
- **Fármacos de segunda línea:** se recomienda el uso de TDF en pacientes con fallo confirmado o sospechado a 3TC, ETV, adefovir o telbivudina. Se puede considerar el uso de TAF como alternativa.

El tratamiento antiviral es de por vida, y los **criterios de respuesta** al mismo incluyen la evaluación de 3 criterios:

- **Criterio bioquímico:** normalización o mejoría de las transaminasas.
- **Criterio virológico:** negativización o disminución de la CVP-HBV, negativización de los antígenos (HBeAg y HBsAg) y seroconversión (aparición de Acs a-HBe y Acs a-HBs).
- **Criterio histológico:** mejoría en los parámetros histológicos (fibrosis y/o necrosis).

En base a estos criterios, la **respuesta terapéutica** puede ser:

- **parcial:** cuando mejoran los parámetros pero no alcanza al criterio de respuesta completa.
- **completa:** cuando hay respuesta bioquímica y virológica con negativización del HBsAg.
- **sostenida:** cuando hay normalización de las transaminasas, negativización de los marcadores serológicos (incluyendo aparición de Acs a-HBs) y mejoría en el puntaje necrosis/fibrosis.

La **suspensión del tratamiento** solo se puede considerar en personas sin cirrosis cuando presente:

- seroconversión de HBeAg (HBeAg negativo y Acs a-HBe positivo) por más de 1 año.
- valores normales de ALT persistentemente.
- CVP-HBV no detectable persistentemente.

La reanudación del **tratamiento** se recomienda cuando hay signos de reactivación: positividad de HBeAg, alteración de la ALT o aparición nuevamente de CVP-HBV.

5.3.6. TRANSMISIÓN VERTICAL

La detección precoz de la infección por HBV de la mujer embarazada y/o de su pareja y el adecuado y oportuno tratamiento son estrategias fundamentales para la prevención de la transmisión perinatal. Por ello, como primera medida se recomienda el **seguimiento de las embarazadas mediante la determinación del HBSAg**.

Los niños que se infecten de **modo perinatal** presentan un **alto riesgo de desarrollar una infección crónica (>85%)**. La infección intrauterina es rara (<5%).

Se recomienda que las **mujeres embarazadas con HBSAg positivo** que cumplen con los criterios de tratamiento reciban la profilaxis con Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF) o Tenofovir Alafenamida (TAF). En el caso de no cumplir con los criterios, debe repetirse la CVP-HBV en la semana 26-28 de gestación, indicando solo el tratamiento si la CVP-HBV ≥ 200.000 UI/ml (si la CVP-HBV < 200.000 UI/ml, el riesgo de transmisión es bajo no recomendándose el tratamiento).

Un **recién nacido sin la inmunoprofilaxis hijo de una mujer con HBSAg y HBeAg positivos adecuada** tiene un 90% de probabilidad de contraer la infección.

Un **recién nacido sin la inmunoprofilaxis hijo de una mujer con HBSAg positivo y HBeAg negativo** presenta < 10% de probabilidad de contraer la infección.

La inmunoprofilaxis en niños que nacen de madres HBSAg-positivas consiste en recibir 1 dosis de vacuna contra el HBV antes de las 12 horas de vida y GGHI contra HBV en las primeras 48 horas de vida (idealmente dentro de las primeras 12 horas). Deberá luego continuar con el esquema habitual de vacunación, completando 3 o 4 dosis totales, según reciba vacuna contra el HBV monovalente o combinada con otras vacunas respectivamente.

La profilaxis mediante vacuna y GGHI posee una eficacia superior al 90% en la prevención de la infección neonatal y su fracaso sugiere una infección intrauterina o bien la existencia de variantes defectuosas en la expresión del determinante "a" del HBSAg en la madre.

El retraso en la realización de la profilaxis aumenta la probabilidad de infección neonatal. La GGHI podrá ser aplicada hasta los 7 días posteriores al nacimiento. En esos casos, debe realizarse un control serológico en el niño 3 meses después del nacimiento, determinando los niveles de Acs a-HBs. Si el resultado es negativo, se debe realizar la determinación de HBSAg.

La lactancia no está contraindicada en madres HBSAg (+) no tratadas ni en aquellas recibiendo tratamiento con TDF o TAF.

5.4. VIRUS DE LA HEPATITIS D

HDV es un pequeño virus "satélite" envuelto de genoma ARN circular monocatenario de polaridad negativa y para realizar su ciclo de replicación necesita de la presencia del HBV. Pertenece al género *Deltavirus* de la familia *Kolmioviridae*. Mientras que la envoltura lipo-

proteica viral contiene al HBsAg (antígeno de superficie de HBV), en el interior del virión se observa una ribonucleoproteína compuesta por el genoma viral y el antígeno Delta (HDAg). HDAg es la única proteína codificada por HDV y se puede encontrar en 2 formas: una pequeña (HDAg-S) y una grande (HDAg-L).

Se estima que aproximadamente el 5% de las personas infectadas crónicamente con el HBV están también infectadas con el HDV, lo que representa unos 15 millones de infectados en el mundo. Dada la necesidad de asociación con el HBV, el HDV solo puede transmitirse en presencia de una infección concomitante con el HBV de una de 2 formas:

- **Superinfección:** cuando la infección por HDV se produce en un paciente con Hepatitis B Crónica, en donde puede manifestarse como una hepatitis aguda severa o como una exacerbación de la hepatitis B crónica. Casi siempre evolucionan a la cronicidad y en ocasiones pueden producir cuadros graves de fallo hepático o el empeoramiento significativo de la hepatitis B crónica que ya tenía previamente. Sólo excepcionalmente puede producir la eliminación del HBV.
- **Coinfección:** cuando la infección por HDV y HBV se produce en simultáneo pudiendo producir una hepatitis aguda más severa con una tasa de mortalidad más elevada que la que se presenta en la infección por HBV sola, pero rara vez evolucionan a una hepatitis crónica.

5.4.1. MARCADORES VIRALES

5.4.1.1. HDAg (Antígeno delta): Aparece fugazmente en sangre en la primoinfección, por lo que *su utilidad clínica es muy limitada*. En la forma crónica, la antigenemia es intermitente.

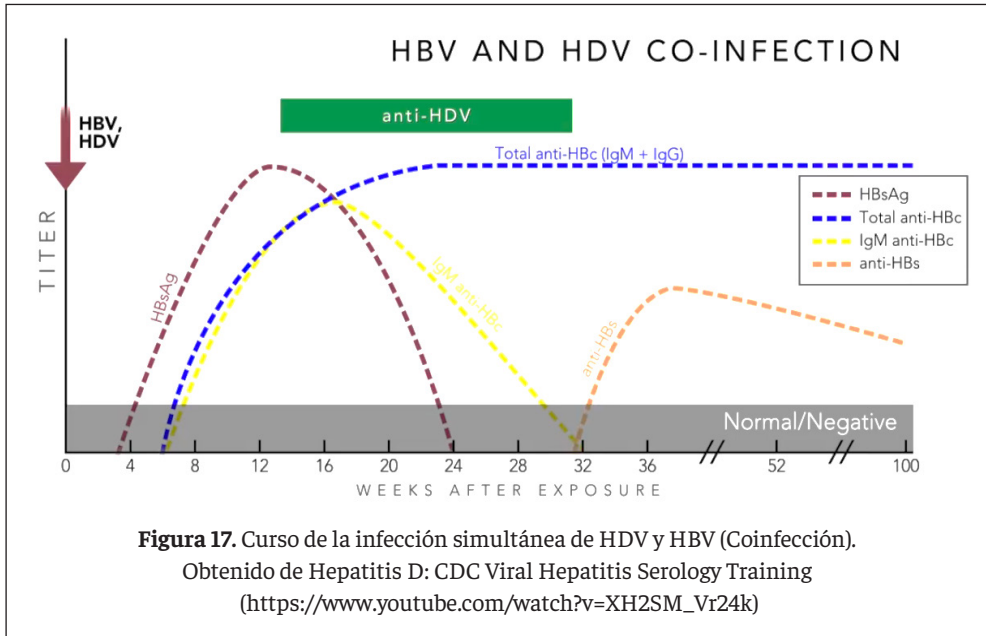
5.4.1.2. Acs IgM a-HDV (Acs IgM contra el antígeno del core del HDV): Después de la aparición del HDAg surge el anticuerpo de clase IgM, que se mantiene positivo a bajos títulos durante un tiempo limitado en el caso de evolución favorable, persistiendo su positividad a títulos altos en los casos que evolucionan hacia la cronicidad.

5.4.1.3. Acs totales a-HDV (Acs totales contra el antígeno del core del HDV): La aparición de los Acs de clase IgG frente al HDV suele coincidir en el tiempo con los Acs de clase IgM y se mantienen positivos durante largos períodos de tiempo, por lo que *su detección indica solamente contacto previo con el virus*. No obstante, la presencia de Acs IgG a-HDV en un paciente portador de HBsAg refleja, casi invariablemente, infección crónica por ambos virus, lo que elimina la necesidad de estudiar otro marcador específico de infección por este virus. *En general, se utilizan métodos que detectan Acs totales a-HDV.*

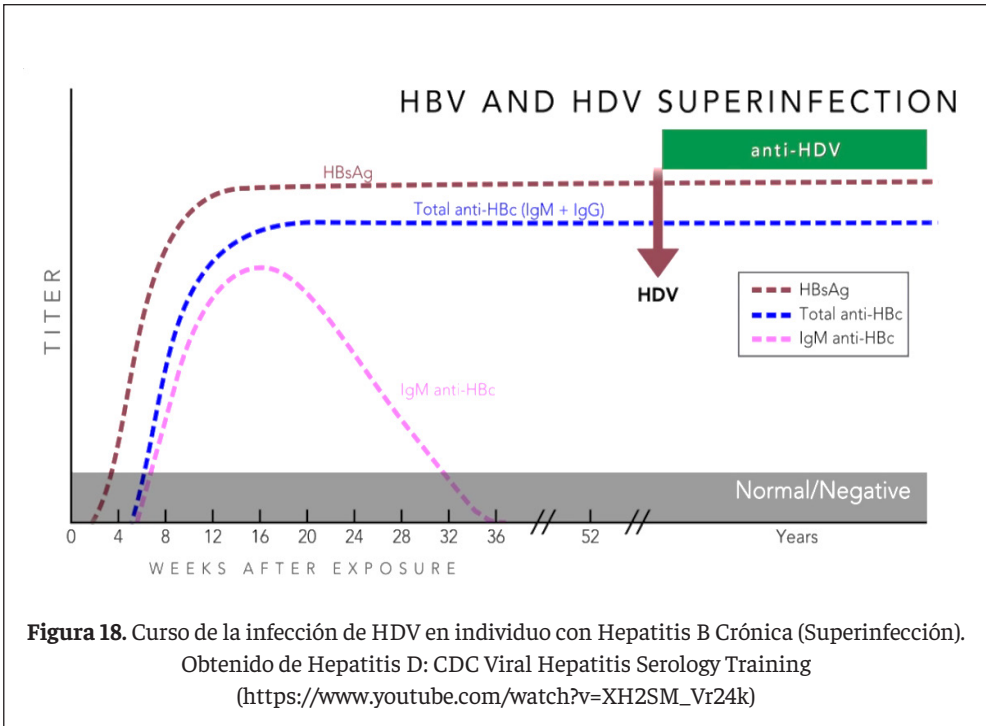
5.4.1.4. ARN HDV: La positividad por técnicas de hibridación o RT-PCR indica presencia del virus.

5.4.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La presencia simultánea de Acs IgM a-HDV y HBsAg en presencia de Acs IgM a-HBc asociada a hepatitis aguda se considera diagnóstico de coinfección por HBV y HDV (Figura 17).



La presencia de Acs IgM a-HDV y HBsAg en ausencia de Acs IgM a-HBc debe tomarse como indicativa de *superinfección* por HDV en un portador crónico de HBV (Figura 18). Excepcionalmente, puede ocurrir que dicha *sobreinfección* haga disminuir transitoriamente la concentración de HBsAg en suero a niveles no detectables, originando un patrón de reactividad aislada para Acs IgM a-HDV. En estos casos, se recomienda determinar HDAg en suero y Acs a-HBc total, así como realizar seguimiento para HBsAg y Acs a-HDV total. En cualquier caso y dada la situación epidemiológica en nuestro país, no parece recomendable la búsqueda rutinaria de la infección por HDV, salvo en pacientes usuarios de drogas por vía parenteral.



5.5. VIRUS DE LA HEPATITIS C

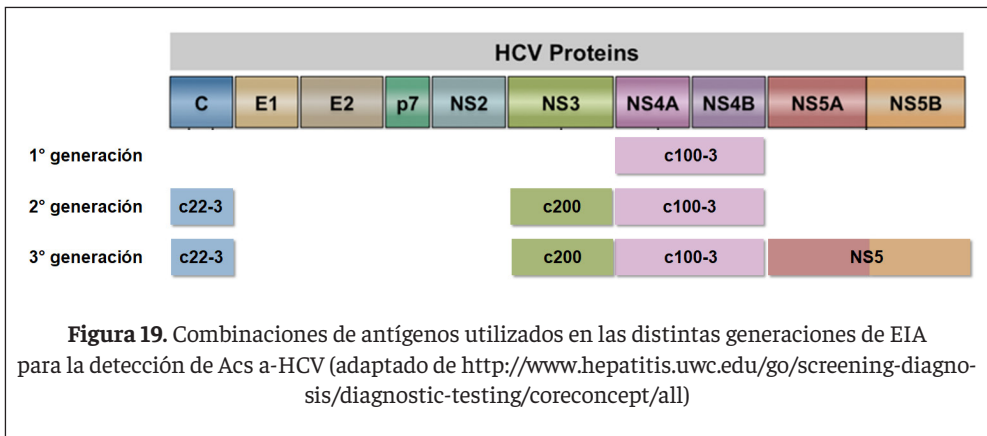
HCV es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva perteneciente al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. En el virión, el genoma está protegido por una cápside proteica compuesta por el antígeno “c” o proteína del core (HCCAg) que, a su vez, está cubierta por una envoltura que contiene las glicoproteínas E1 y E2 asociadas de forma no covalente como un heterodímero incrustadas en la membrana lipídica derivada del hospedero.

Más del 95% de las infecciones por HCV son asintomáticas o subclínicas. La infección es autolimitada en el 10 al 15% de los casos y, en el resto, la enfermedad evoluciona a la forma crónica. La forma crónica suele ser subclínica y se puede manifestar tanto con enzimas hepáticas persistentemente elevadas como con enzimas hepáticas con valores normales u oscilantes. El HCV es reconocido como la principal causa de hepatitis crónica constituyendo 70% de las mismas y 20% de las hepatitis agudas. De las hepatitis crónicas, 20% evoluciona a la cirrosis hepática y 4% al carcinoma hepatocelular, siendo por ello una de las razones más frecuentes de indicación de trasplante.

La infección ocurre mayoritariamente luego de la exposición directa parenteral o percutánea. De acuerdo con ello, los receptores de sangre o sus derivados, los usuarios de drogas intravenosas, los pacientes en hemodiálisis y los que sufren accidentes por punción con agujas contaminadas, representan los grupos de mayor incidencia. Su vía de transmisión reconocida es principalmente sanguínea; las vías sexual y vertical ocurren aunque con menor frecuencia.

5.5.1. MARCADORES VIRALES

5.5.1.1. Acs a-HCV (Acs IgG el HCV): Los ensayos para detectar Acs a-HCV surgieron a partir de 1989. Desde entonces han evolucionado progresivamente mejorando su sensibilidad y especificidad a lo largo de 3 generaciones, mediante el agregado de antígenos virales *sintéticos o recombinantes*, dado que el virus no ha podido ser aún cultivado (Figura 19). Desde los ensayos de 1° generación en los que sólo se utilizaba la proteína NS4A/B hasta los ensayos de 3° y 4° generación en los que se utilizan proteínas del core (estructurales) y las proteínas no estructurales NS3 proteasa/helicasa, NS4A/B y NS5 replicasa. En los EIA de 3° generación los antígenos utilizados presentan sensibilidad para diferentes genotipos de HCV.



La aparición de Acs a-HCV se retrasa entre 8 a 11 semanas² en promedio, aunque puede tardar aún más en casos puntuales. Durante ese período de “*ventana serológica*”, la detección de Acs a-HCV será negativa, por lo que la *negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección*.

La presencia de Acs a-HCV en suero indica contacto previo con el virus, pero no es, en sí misma, suficiente para establecer el diagnóstico de infección. Además, en pacientes con inmunodeficiencias en la respuesta humoral y en pacientes en hemodiálisis, la negatividad para Acs a-HCV no excluye la infección.

5.5.1.2. Ensayos suplementarios para los Acs a-HCV: Se han de considerar como pruebas suplementarias de la presencia de Acs a-HCV y *no necesariamente de infección activa*. Se realizan mediante *sistemas de inmunoblot* (RIBA o LIA) que emplean diferentes antígenos adsorbidos sobre tiras de nitrocelulosa o nylon pudiendo variar su interpretación dependiendo de la prueba y de los antígenos empleados. Con carácter general, *la presencia de reactividad frente a 2 o más antígenos derivados de regiones diferentes del genoma vírico confirma la presencia de Acs frente al virus, en tanto que la*

2. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/SurveillanceGuidance/Appendices.htm#Appendix-B>

ausencia total de reactividad en la prueba la descarta. La reactividad frente a antígenos derivados de una única región del genoma del virus no permite confirmar ni descartar la presencia de Acs (resultados indeterminados).

Estos ensayos se circunscriben a confirmar un resultado positivo de EIA de baja relación de positividad, o resultados de EIA positivos, con viremia no detectable.

Un **resultado negativo** por RIBA o LIA en pacientes con EIA positivo podría indicar un resultado falso positivo de este último. Un **resultado positivo**, por RIBA o LIA, con al menos dos determinaciones de ARN-HCV no detectables, espaciadas en un lapso mínimo de 6 meses, sugiere fuertemente una infección HCV resuelta.

La reactividad detectada frente a los distintos antígenos no presenta un valor pronóstico. Durante el período de ventana serológico, se pueden observar distintos patrones indeterminados en presencia de viremia detectable, lo que indica el inicio de la respuesta inmune humoral.

5.5.1.3. ARN-HCV: su detección indica presencia de virus circulante y confirma infección en curso (aguda o crónica). Su presencia en pacientes por más de 6 meses establece la cronicidad de la hepatitis. En promedio, el ARN-HCV se vuelve detectable de 1 a 2 semanas después de la exposición al virus. El ARN-HCV representa el indicador más sensible y específico de infección actual y, si se cuantifica, se correlaciona con los niveles de HCV en suero o plasma, medidos en IU/ml. *Su negatividad en una muestra puntual no descarta la infección crónica, ya que la viremia es, en ocasiones, intermitente.*

Si el ARN-HCV es detectable y el anti-HCV es no reactivo en la misma muestra, esto podría indicar una Hepatitis C Aguda temprana ya que el paciente se encontraría en período de ventana serológico. Esta situación podría ser más común en entornos donde se realizan pruebas de HCV regularmente (por ejemplo, centros de donación de sangre o plasma). En inmunodeprimidos, la aparición de Acs a-HCV podría retrasarse por más de 11 semanas.

La mayoría de los métodos comerciales actuales permiten no solo la cuantificación de la viremia del paciente infectado sino la detección entre 5 y 15 UI/ml. *Sólo son utilizables métodos comerciales validados en UI/ml contra el estándar de la OMS.* En el informe debe especificarse el método (por ejemplo, RT-qPCR), el rango dinámico de medición (límites inferior y superior de cuantificación) y el límite inferior de detección. Si bien todos los ensayos expresan los resultados en la misma unidad, la comparación entre métodos presenta discrepancias, por lo que se sugiere utilizar siempre la misma técnica en el paciente.

La utilidad de la detección del ARN-HCV *es aplicable en los siguientes casos:*

- Como ensayo suplementario en pacientes con Acs a-HCV positivo para confirmar diagnóstico (*formato cualitativo*).
- Determinar la presencia de viremia durante el período de ventana serológica en hemocomponentes (*formato cualitativo*).
- Determinar la presencia de viremia en pacientes inmunosuprimidos con Acs a-HCV negativo (*formato cualitativo*).

- Cuantificar la viremia previa al inicio del tratamiento antiviral (*formato cuantitativo*).
- Evaluar la respuesta virológica al tratamiento antiviral (*formato cualitativo*).

5.5.1.4. HCcAg (Antígeno del core del HCV): Es un EIA de captura de antígeno, semejante a los desarrollados para la detección del HBsAg, que permite detectar y estimar la viremia a través de la detección y cuantificación de la proteína del core del virión, una vez lograda su liberación de las partículas y en condiciones que previenen su acomplejamiento por los Acs específicos que puedan contener la muestra. La interpretación de la positividad o negatividad del HCcAg es idéntica a la de las pruebas de detección de ARN-HCV y la expresión cuantitativa de resultados se realiza en pg/ml. De igual manera que para HBsAg es posible realizar ensayos de neutralización para confirmar la positividad del Ag HCV. *Se estima que su sensibilidad clínica se acerca a la de las pruebas de detección de ARN-HCV, con correlaciones superiores al 90% en la gran mayoría de los estudios, con las ventajas de presentar menor riesgo de contaminación cruzada que la mayoría de las pruebas de detección de ARN-HCV y de ofrecer una cuantificación más precisa y reproducible que la viremia.*

Actualmente se dispone de ensayos de EIA que combinan la detección simultánea del core y Acs (NS3 y core) de HCV, siendo utilizados principalmente en bancos de sangre, denominados ensayos de 4^a generación.

5.5.1.5. Genotipificación: La generalización de los tratamientos antivirales en la Hepatitis C crónica y la demostrada influencia del genotipo del virus en la respuesta al tratamiento han introducido el uso de **pruebas de genotipificación del HCV** en la práctica clínica. La genotipificación viral puede realizarse mediante la amplificación del genoma viral por PCR convencional seguida de la secuenciación del producto amplificado. Los genotipos del HCV en Argentina, cuando se considera la totalidad de los datos comunicados por los distintos grupos del país, muestran una mayor prevalencia del genotipo 1, luego del genotipo 2 y, finalmente, del genotipo 3.

5.5.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

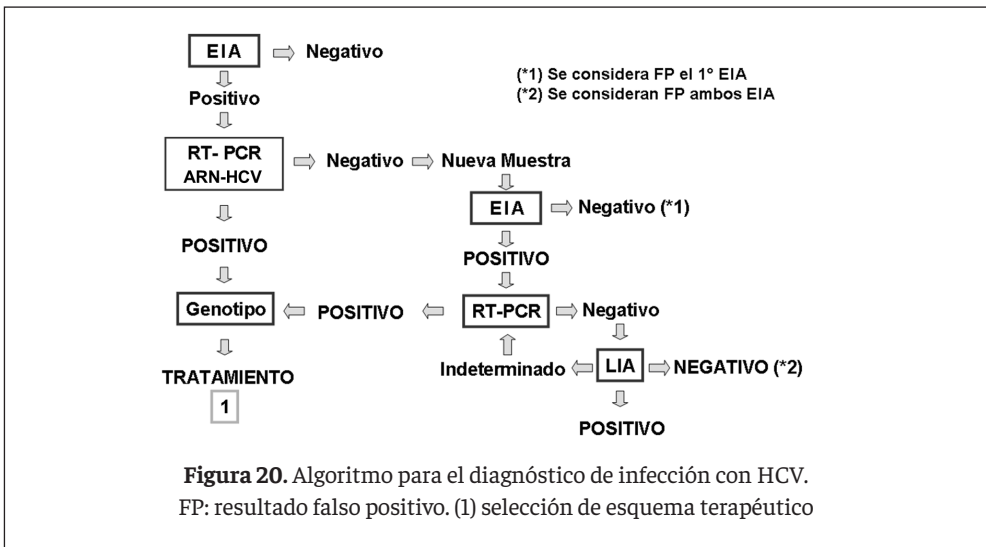
El diagnóstico de la infección por el HCV suele hacerse en un paciente asintomático al que se le realizan análisis durante un examen de salud laboral, un embarazo o una donación sanguínea. En otros casos su descubrimiento es consecuencia de su búsqueda en un paciente con antecedentes de riesgo de infección por el HCV. Las personas o situaciones en las que está indicada la realización de una prueba diagnóstica encaminada a la detección de la infección por el HCV se basan en los criterios de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD):

- personas que se han inyectado al menos una vez drogas ilícitas;
- individuos con situaciones asociadas a elevada tasa de infección con HCV: personas HIV-1 positivo, hemofílicos que recibieron concentrados de factores antes de 1987, hemodializados y personas con elevación no explicada de transaminasas;
- receptores de transfusiones de sangre o hemoderivados y receptores de trasplantes de órganos antes de julio de 1992;

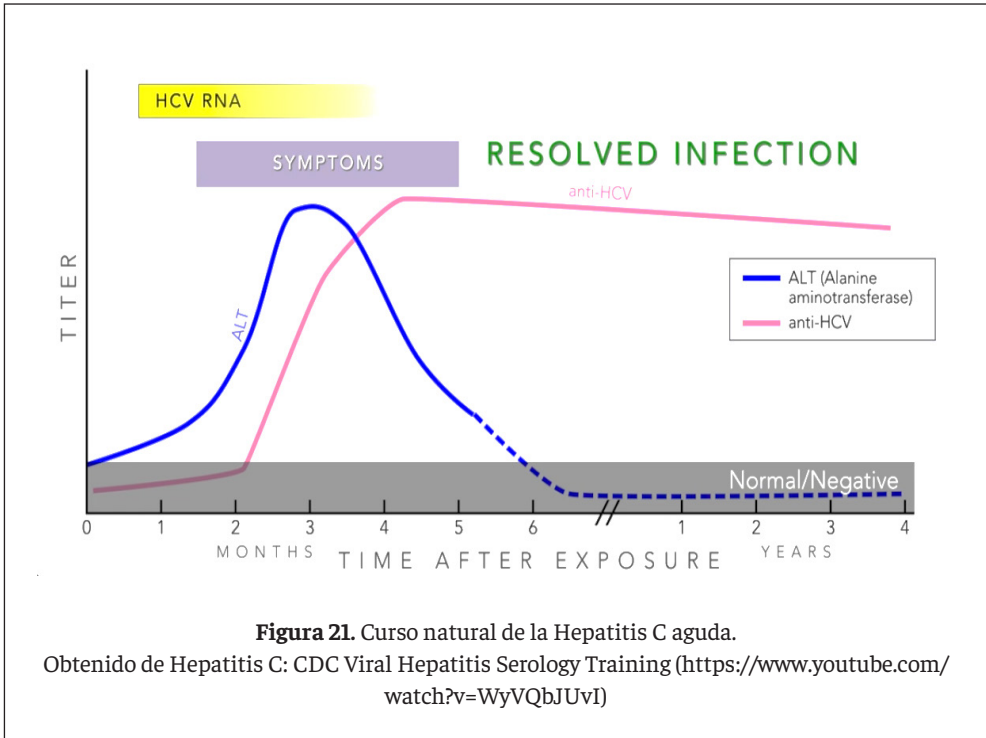
- niños nacidos de madre infectada con HCV;
- personal sanitario y trabajadores de seguridad;
- parejas sexuales de pacientes infectados con HCV;

La evaluación inicial de estos pacientes debe focalizarse en conocer la fase en que se encuentra la infección y la coexistencia de otras posibles enfermedades víricas (HBV, HIV), metabólicas, por consumo de tóxicos (principalmente etanol) o de naturaleza autoinmune, que pueden coexistir y estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad hepática.

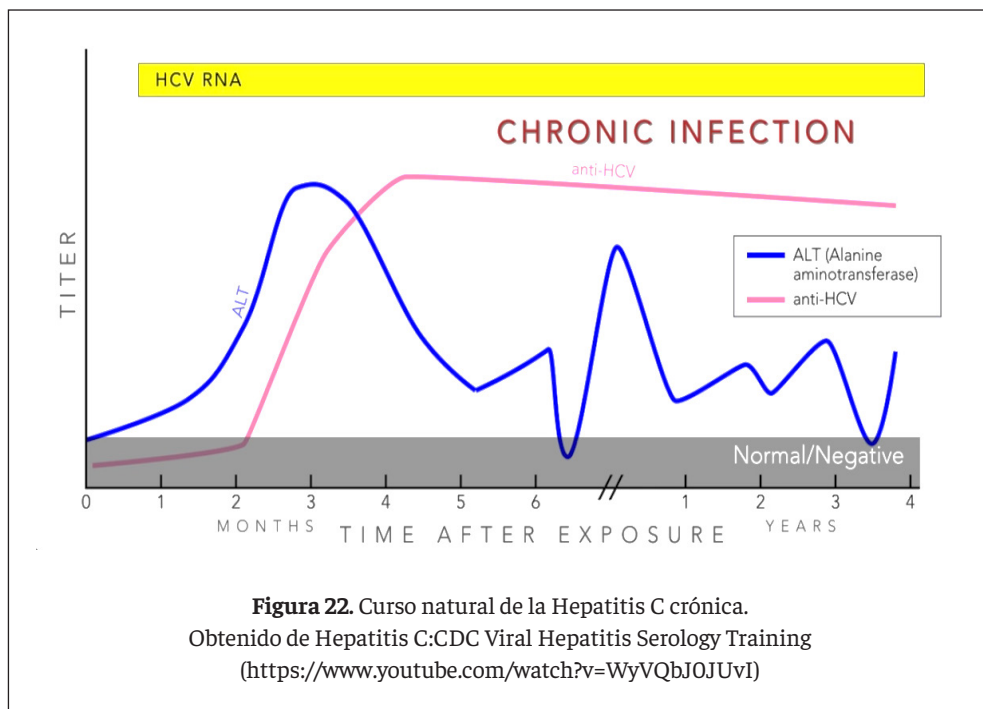
El algoritmo para el diagnóstico del HCV incluye los EIA (detección de Acs a-HCV) en conjunto con métodos moleculares (detección de ARN-HCV) (Figura 20).



5.5.2.1. Hepatitis C Aguda (Figura 21): La *seroconversión para Acs a-HCV* constituye el criterio más fiable para establecer un diagnóstico de infección aguda reciente por HCV. Dicha seroconversión suele retrasarse entre 8 y 11 semanas desde el inicio de la infección, por lo que se requiere el estudio de muestras de seguimiento, al menos hasta el 3° mes. La *detección de ARN-HCV o HcAg* adelanta sensiblemente el diagnóstico (suelen ser detectables en 1 a 2 semanas post-infección), por lo que debe realizarse siempre que los antecedentes hagan sospechar una hepatitis C aguda. Con todo, el diagnóstico de seguridad se alcanzará durante el seguimiento, una vez que se haya verificado la seroconversión. En pacientes con inmunodeficiencias de tipo humoral y en algunos pacientes en hemodiálisis, la seroconversión puede tardar más tiempo o, incluso, no llegar a producirse nunca, presentando patrones indeterminados en las pruebas de confirmación. Todo ello dificulta especialmente el diagnóstico de la hepatitis C aguda en este tipo de pacientes, en los que es imprescindible la realización de pruebas de detección directa del virus.



5.5.2.2. Hepatitis C Crónica (Figura 22): La presencia de Acs a-HCV asociada a hepatitis crónica es altamente indicativa de hepatitis C crónica, aunque no permite establecer, en términos estrictos, un diagnóstico seguro. La detección de ARN-HCV o HCcAg ayuda a establecer el diagnóstico y confirma la infección en curso, aunque un resultado negativo aislado no la descarta, ya que la viremia puede ser intermitente en ocasiones. Dado el alto costo de los métodos de confirmación de Acs a-HCV y vistos los altos porcentajes de confirmación que se obtienen en los pacientes con hepatitis crónica que resultan reactivos para Acs a-HCV en las pruebas de screening, se considera que es suficiente una confirmación mediante un 2° método de screening que utilice antígenos obtenidos por una tecnología diferente para establecer la presencia de Acs a-HCV en pacientes con hepatitis crónica demostrada, e incluso no sería necesario realizar la confirmación en grupos con alta prevalencia de infección por el HCV. Si el estudio de Acs a-HCV se realiza en un paciente en el que sólo se ha documentado una alteración puntual de las enzimas hepáticas, sin evidencia de hipertransaminasemia persistente ni prácticas de riesgo, se deberá acudir al uso de métodos moleculares antes de informar un resultado positivo para Acs a-HCV.



5.5.3. PRINCIPIOS GENERALES DEL TRATAMIENTO DE HEPATITIS C CRÓNICA

El objetivo del tratamiento es curar la infección por el HCV para prevenir la cirrosis hepática, la descompensación, el HCC, las manifestaciones extrahepáticas y la muerte.

En la práctica, el objetivo final es **lograr la respuesta virológica sostenida (RVS), definida por ARN-HCV NO DETECTABLE en plasma a las 12 semanas (RVS12) después de haber finalizado el tratamiento, utilizando un método molecular sensible, con un límite de detección menor o igual a 15 UI/ml**. Los estudios de seguimiento a largo plazo han demostrado que la RVS corresponde a la cura definitiva de la infección por HCV en más de 99% de los casos. En los pacientes con fibrosis avanzada y cirrosis, la erradicación del HCV reduce la tasa de descompensación de la hepatopatía y el riesgo de HCC, aunque no lo elimina definitivamente. En estos pacientes la vigilancia del HCC debe mantenerse independientemente de la RVS.

Deben ser tratados todos los pacientes con hepatitis crónica por HCV, *naïve* o no respondedores a un tratamiento previo, que quieran ser tratados, que no tengan contraindicaciones. Los pacientes que no tengan una corta expectativa de vida por una enfermedad que no sea solucionada por el tratamiento de la hepatitis C, también deben ser tratados independientemente del nivel de la fibrosis hepática.

El tratamiento con INF_{α} en monoterapia fue la primera posibilidad de tratamiento para la hepatitis crónica por HCV, al que se sumó años después el tratamiento combinado con ribavirina (RBV). Con esta combinación se elevó la tasa de RVS hasta el 35-43% con respecto a la monoterapia. Pese al avance que supuso la terapia de combinación, casi el 60% de los pacientes no conseguían la RVS, en particular aquéllos infectados con genotipos 1 y 4.

A partir del año 2011 se comenzaron a utilizar los primeros **antivirales de acción directa** (AAD) dirigidos a inhibir la proteasa viral (NS3-4A) en el tratamiento de la infección crónica por HCV. En el año 2013 comenzaron a surgir otros AAD que permitieron desarrollar esquemas terapéuticos libres de interferón e independientes del genotipo de HCV (**pangenotípicos**), siendo además muy eficaces, cortos y bien tolerados. Actualmente, existen tres tipos de AADs que inhiben 3 fases del proceso replicativo del HCV:

1. **Inhibidores de la proteasa (NS3-4A) – terminación en “previr”** (*Telaprevir, Boceprevir, Grazoprevir, Simeprevir, Paritaprevir, Voxilaprevir, Glecaprevir*): interfieren en la unión de la proteasa a su sustrato, impidiendo el correcto procesamiento de la poliproteína del virus.
2. **Inhibidores de la polimerasa (NS5B) – terminación en “buvir”**: se clasifican en 2 categorías atendiendo a su estructura química:
 - *Inhibidores análogos de nucleós(t)idos (Sofosbuvir)*: se unen al sitio activo de la polimerasa actuando como terminadores de la cadena de ARN naciente.
 - *Inhibidores de nucleós(t)idos (Dasabuvir, Beclabuvir)*: se unen a uno de los cuatro sitios alostéricos de la ARN polimerasa dependiente de ARN, alterando su conformación y bloqueando su función catalítica.
3. **Inhibidores de la proteína NS5A – terminación en “asvir”** (*Ledipasvir, Daclatasvir, Ombitasvir, Elbasvir, Velpatasvir, Pibrentasvir*): se unen al dominio I de la proteína NS5A, bloquean la formación de la red membranosa en la que se encuentran los complejos de replicación funcionales de HCV, e inhiben los procesos de ensamblaje y secreción de partículas virales.

Las combinaciones de AADs han demostrado ser muy eficaces para erradicar el HCV (>95% en la mayoría de las poblaciones) y en menos tiempo (normalmente 12 semanas y algunos esquemas 8 semanas). Estas pautas de tratamiento varían en función de los genotipos del HCV, de los tratamientos previos recibidos, presencia de cirrosis, etc.

En 2020, la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (AAEEH) publicó sus recomendaciones para el tratamiento de la Hepatitis C (Ridruejo E & Galdame O.):

Tratamiento simplificado en pacientes SIN tratamiento previo (con o sin cirrosis): Esquemas: Glecaprevir/Pibrentasvir x 8 semanas (pangenotípico), o Sofosbuvir/Velpatasvir x 12 semanas (pangenotípico).

En pacientes sin tratamiento previo (*naïve*) con cirrosis, el esquema glecaprevir/pibrentasvir puede ser indicado sin necesidad de conocer el genotipo del paciente, porque la eficacia es similar en genotipos 1 a 6. En cambio, sofosbuvir/velpatasvir podría tener una menor eficacia en cirrosis con genotipo 3 si coexiste con la *sustituciones asociadas a resistencia antiviral* (RAS) Y93H. Por lo tanto, antes de indicar este

esquema habría que conocer el genotipo del paciente mediante una **prueba de genotipificación** y realizar la **prueba de sustitución de resistencia asociada a la NS5A** (RAS) si el paciente es genotipo 3. Aquellos pacientes sin RAS Y93H pueden ser tratados con 12 semanas de sofosbuvir/velpatasvir. Si RAS Y93H está presente, se utilizan otras opciones.

Pruebas de laboratorio pretratamiento (dentro de los 6 meses previos):

- Hemograma completo con recuento de plaquetas
- Pruebas bioquímicas: albúmina, bilirrubina total y directa, transaminasas, Tiempo de protrombina y RIN
- Tasa de filtración glomerular calculada
- RNA-HCV cuantitativo (carga viral del HCV)
- Prueba de antígeno/Acs del HIV-1
- Prueba de antígeno/Acs del HBV: HBsAg, a-HBs, a-HBc

Monitoreo durante el tratamiento:

- No se requiere monitoreo de CVP-HCV
- Solo se monitorea hipoglucemia en DBT y RIN en anticoagulados.

Evaluación de la curación posterior al tratamiento (RVS) a las 12 semanas:

- RNA-HCV cuantitativo
- Pruebas bioquímicas hepáticas

Confirmar que el ARN-HCV es NO DETECTABLE (**cura virológica**) y la normalización de las transaminasas.

Seguimiento después de lograr la curación virológica (RVS):

- No se recomienda seguimiento relacionado con el hígado para pacientes sin fibrosis o con fibrosis leve que logran RVS.
- Se recomienda el seguimiento y el screening de HCC en los pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis.

Seguimiento para pacientes que no logran una cura virológica:

- Deben ser reevaluados para un nuevo tratamiento por un especialista.
- Para los pacientes que no pueden volver a tratarse, se recomienda evaluar la progresión de la enfermedad cada 6 a 12 meses con pruebas bioquímicas hepáticas, hemograma completo y RIN.

- **Tratamiento según genotipo, subtipo, tratamiento previo y presencia o ausencia de cirrosis:** Se recomienda el tratamiento basado en el genotipo y subtipo, especialmente en los pacientes que hayan recibido cualquier tratamiento previo. Existen distintos esquemas terapéuticos basados en el genotipo de HCV y presencia o ausencia de cirrosis.

Se puede optar por el tratamiento simplificado (Glecaprevir/Pibrentasvir x 8 semanas, o de Sofosbuvir/Velpatasvir x 12 semanas) u otras opciones terapéuticas según el criterio del médico tratante.

- **Consideraciones en el tratamiento de la Hepatitis C:**

- Los pacientes deben ser evaluados antes, durante y luego de finalizado el tratamiento. Previo al tratamiento debe cuantificarse los niveles de ARN-HCV utilizando métodos comerciales estandarizados con límite de detección menor o igual a 15 UI/ml.

- La determinación del genotipo debe realizarse por métodos comerciales o secuenciación con capacidad para diferenciar genotipos y subtipos del virus.
- En el caso de realizar la detección de RAS, debe hacerse por secuenciación de las regiones NS5A (aminoácidos 24 a 93), NS5B (aminoácidos 159 a 565) o NS3 (aminoácido 36 a 175).
- Los pacientes sin fibrosis o con fibrosis leve con RVS que tengan una ARN-HCV no detectable a las 48 semanas de suspendido el tratamiento, pueden considerarse curados y no requieren otro seguimiento.
- Los pacientes con fibrosis avanzada o cirróticos con RVS deben continuar con su seguimiento hepatológico clínico y tamizaje de HCC cada 6 meses.

5.6. VIRUS DE LA HEPATITIS E

HEV es un virus de ARN monocatenario lineal de polaridad positiva, que pertenece al género *Paslahepevirus* dentro de la subfamilia *Orthohepevirinae* de la familia *Hepeviridae*. Las partículas de HEV presentes en las heces y la bilis no tienen envoltura, mientras que las presentes en la sangre circulante y en los sobrenadantes de cultivos están cubiertas por una membrana celular, similar a los virus con envoltura.

La infección por HEV suele asociarse a una *enfermedad autolimitada* y asintomática en individuos inmunocompetentes; sin embargo, las tasas de mortalidad y la incidencia de insuficiencia hepática son significativas en mujeres embarazadas y en pacientes inmunocomprometidos. La vía de transmisión del HEV es principalmente fecal-oral, en especial en los países en desarrollo. En países desarrollados se dan casos ocasionales relacionados, principalmente, con los animales considerándose la hepatitis E una zoonosis emergente. Además del cerdo, algunas especies de animales salvajes como jabalíes y cérvidos son hospedadoras de este virus. La infección en humanos se debe al consumo de carne o hígado poco cocinada.

5.6.1. MARCADORES VIRALES

5.6.1.1. Acs IgM a-HEV: Se utilizan para el *diagnóstico de infección aguda*, alcanzan su mayor título junto con el máximo valor de ALT y pueden persistir detectables hasta 6-9 meses luego del inicio de los síntomas. La positividad de este marcador es de denuncia obligatoria en los sistemas de vigilancia epidemiológica.

5.6.1.2. Acs IgG a-HEV: Su presencia indica *infección pasada e inmunidad*. Se mantiene positivo durante períodos de tiempo muy largos. Sin embargo, se desconoce el título de IgG a-HEV necesario para conferir protección ya que se han reportado reinfecciones no solo en individuos inmunosuprimidos sino también en inmunocompetentes.

5.6.1.3. ARN-HEV: se detecta en suero y heces durante el período de incubación (15 a 60 días) y permanece detectable por 4 a 8 semanas luego del inicio de los síntomas en suero y por 2 semanas más en heces.

5.6.2. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.6.2.1. Individuo con Hepatitis E aguda (Figura 23): La infección aguda de HEV se puede diagnosticar por la presencia de Acs IgM a-HEV, mientras que los Acs IgG a-HEV aparecen poco después de la aparición de las IgM a-HEV y pueden persistir durante varios años. Por lo tanto, la detección de Acs IgG a-HEV, como único parámetro de laboratorio, indica una infección pasada. La detección del ARN viral en muestras biológicas es el estándar de oro para la confirmación de la hepatitis E aguda, ya que permite identificar con precisión la infección activa y ayudar a confirmar los hallazgos serológicos. Los pacientes infectados desarrollan inmunidad contra el HEV después de la resolución de la infección aguda (fase de convalecencia). Sin embargo, en un pequeño porcentaje de pacientes, la infección por HEV puede progresar a insuficiencia hepática aguda.

– **Hepatitis crónica:** en individuos inmunocomprometidos la replicación viral puede persistir más de 3 meses conduciendo a una infección crónica con progresión a cirrosis. La presencia de ARN-HEV persistente durante al menos 3 meses, permite confirmar el diagnóstico de hepatitis E crónica.

– **Hepatitis E aguda y embarazo:** se caracteriza por manifestaciones clínicas más graves, que podrían conducir a una falla hepática fulminante y a la muerte materna. En áreas de alta endemicidad la infección aguda por HEV puede estar asociada a transmisión vertical y a mayor morbi-mortalidad perinatal.

– **Manifestaciones extrahepáticas:** en pacientes con infecciones agudas o crónicas pueden presentarse una variedad de síndromes neurológicos, daño renal, pancreatitis y alteraciones hematológicas, asociadas a la infección por HEV.

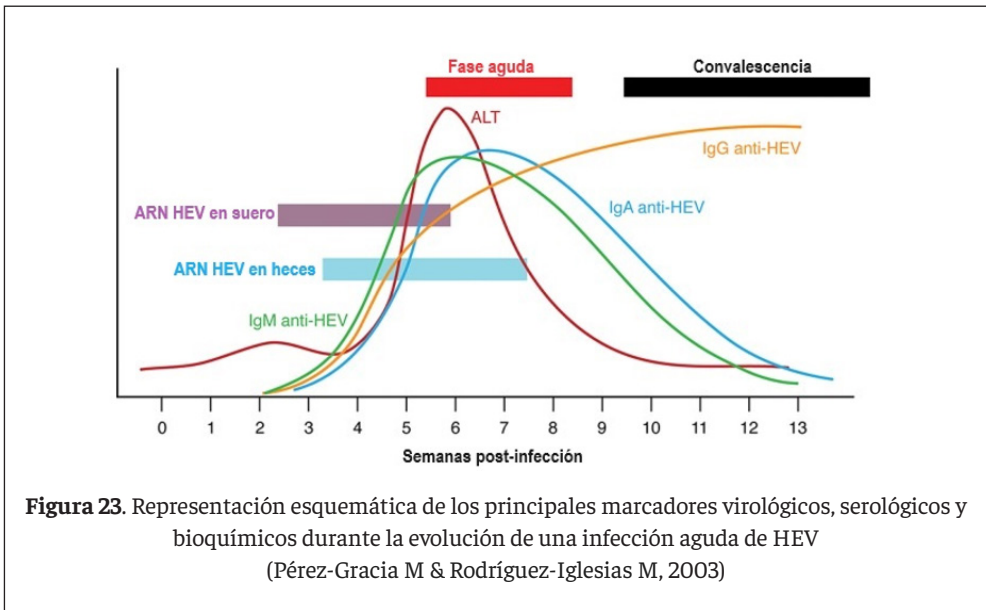


Figura 23. Representación esquemática de los principales marcadores virológicos, serológicos y bioquímicos durante la evolución de una infección aguda de HEV (Pérez-Gracia M & Rodríguez-Iglesias M, 2003)

Bibliografía

- Van Damme P, Pintó RM, Feng Z, Cui F, Gentile A, Shouval D. Hepatitis A virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2023;9(1):51.
- McKnight KL, Lemon SM. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8(12):a033480.
- Shin EC, Jeong SH. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis A. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8(9):a031708.
- Guvenir M, Arıkan A. Hepatitis B Virus: From Diagnosis to Treatment. *Pol J Microbiol* 2020;69(4):391-399.
- Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin Microbiol Rev* 2020;33(2):e00046-19.
- Veronese P, Dodi I, Esposito S, Indolfi G. Prevention of vertical transmission of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2021;27(26):4182-4193.
- Pan C, Gish R, Jacobson IM, Hu KQ, Wedemeyer H, Martin P. Diagnosis and Management of Hepatitis Delta Virus Infection. *Dig Dis Sci*. 2023 Aug;68(8):3237-3248. Erratum in: *Dig Dis Sci* 2023;68(10):4062-4063.
- Lee JH, Kim HS. Current laboratory tests for diagnosis of hepatitis B virus infection. *Int J Clin Pract* 2021;75(12):e14812.
- Sigal T, Marciano S. Tratamiento simplificado para pacientes con Hepatitis C. *Evid Actual Pract Ambul* 2022;25(2):e007014.
- Ridruejo E, Galdame O. Recomendaciones para el Tratamiento de la Hepatitis por Virus C [Internet]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado; 2020 [Consultado 3 de junio de 2024]. Disponible en : <https://www.sahe.org.ar/es/attachment/show/55>
- Ministerio de Salud Argentina. Hepatitis Virales Guía para el diagnóstico y tratamiento de la infección por el virus de las hepatitis B y C [Internet]. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/guia-para-el-diagnostico-y-tratamiento-de-la-infeccion-por-el-virus-de-las-hepatitis-b-y-c.pdf>
- OMS. Resumen Guía Hepatitis B 2024. [Internet]. Disponible en: <https://www.sadi.org.ar/publicaciones/item/1779-resumen-guia-hepatitis-b-oms-2024>
- Sociedad Argentina de Hepatología Guía de Hepatitis B. [Internet]. Disponible en: <https://www.sahe.org.ar/es/attachment/show/80>
- Munné MS, Altabert NR, Otegui MLO, et al. Updating the knowledge of hepatitis E: new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* 2014;13:496-502
- Humzah Iqbal, Bilal Fazal Mehmood, Aalam Sohal, and Marina Roytman. Hepatitis E infection: A review. *World J Virol* 2023;12(5): 262–271.
- Lemon, S. M., Ott, J. J., Van Damme, P. & Shouval, D. Type A viral hepatitis: a summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034> (2017).
- Kamar, N., Izopet, J., & Rostaing, L. Hepatitis E virus infection. *Current Opinion in Gastroenterology* 2013;29(3), 271–278.
- Aslan AT, Balaban HY. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroenterol* 2020;26(37):5543-5560.

- World J Gastroenterol. 2020 Oct 7;26(37):5543-5560. Rehermann, B., & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology* 2005;5(3), 215–229.
- Abu-Freha N, Mathew Jacob B, Elhoashla A, Afawi Z, Abu-Hammad T, Elsana F, Paz S, Etzion O. Chronic hepatitis C: Diagnosis and treatment made easy. *Eur J Gen Pract* 2022;28(1):102-108.
- CDC. Viral Hepatitis. Appendices. Actualizado al 29/02/2024. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/SurveillanceGuidance/Appendices.htm#Appendix-B>
- Ridruejo E & Galdame O. Recomendaciones para el tratamiento de la hepatitis por Virus C. Actualización 2002. Asociación Argentina para el Estudio de la Enfermedades del Hígado.
- Pisano MB, Giadans CG, Flichman DM, Ré VE, Preciado MV, Valva P. Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World J Gastroenterol* 2021;27(26):4018-4044.
- Mukherjee R, Burns A, Rodden D, Chang F, Chaum M, Garcia N, Bollipalli N, Niemz A. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Lab Autom* 2015;20(5):519-38.
- Aron JS, Kerr CA, Bernstein DE, Flanigan C, Hoffmann CJ, Gonzalez CJ. **Hepatitis C** Virus Screening, Testing, and Diagnosis in Adults [Internet]. Baltimore (MD): Johns Hopkins University; 2023.
- Negro F, Lok AS. Hepatitis D: A Review. *JAMA* 2023;330(24):2376-2387.
- Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Aspectos actuales del virus de la hepatitis E [Hepatitis E virus: current status]. *Med Clin (Barc)* 2003;121(20):787-92. Spanish. PMID: 14697167.

Capítulo 6

HERPESVIRUS

María Alejandra **Sánchez**
Germán R. **Perez**

INTRODUCCIÓN A LA FAMILIA HERPESVIRIDAE

La familia *Orthoherpesviridae* comprende una serie de virus envueltos con genoma ADN lineal (TABLA 6) cuyas características biológicas más notables son:

- su ciclo replicativo productivo con **síntesis cinética secuencial de proteínas virales**.
- establecimiento de un **estado de latencia** en células del hospedero.

Tras la **infección primaria**, sintomática o no, el virus permanecerá latente en diversos tipos celulares o tejidos que les son propios a cada miembro de la familia. Desde aquí, y sin que se conozcan bien los mecanismos precisos que desencadenan el fenómeno, se van a producir **reactivaciones** con replicación y producción de nuevas partículas víricas. Además de las infecciones primarias y las reactivaciones, en algunos herpesvirus se ha demostrado la posibilidad de **reinfección** por una cepa del mismo virus distinta a la que estableció latencia en el individuo infectado. En cualquiera de estas 3 circunstancias es posible la aparición de síntomas clínicos relacionados con la infección.

Tabla 6. MIEMBROS DE LA FAMILIA ORTHOHERPESVIRIDAE QUE PRODUCEN INFECCIONES EN EL SER HUMANO

SUBFAMILIA	GÉNERO	VIRUS	SINÓNIMO
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Human alphaherpesvirus 1	Virus Herpes Simplex 1
		Human alphaherpesvirus 2	Virus Herpes Simplex 2
	<i>Varicellovirus</i>	Human alphaherpesvirus 3	Virus Varicela-Zoster
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Human betaherpesvirus 5	Citomegalovirus
	<i>Roseolovirus</i>	Human betaherpesvirus 6A	Herpesvirus 6A
		Human betaherpesvirus 6B	Herpesvirus 6B
		Human betaherpesvirus 7	Herpesvirus 7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Human gammaherpesvirus 4	Virus Epstein-Barr
	<i>Rhadinovirus</i>	Human gammaherpesvirus 8	Herpesvirus 8

Los estudios epidemiológicos demuestran que todos los herpesvirus son extraordinariamente ubicuos y están ampliamente extendidos en la población general. Una sustancial proporción de adultos presentarán Acs, reflejo de una primoinfección en una etapa previa de su vida y manifestación de la infección latente. Esto condicionará el diagnóstico serológico y la interpretación de los resultados de otras pruebas diagnósticas de laboratorio. En contraste con la gran prevalencia en la población general, la mayor parte de las infecciones, sean del tipo que sean, son asintomáticas. Cuando no lo son, oscilan clínicamente desde las benignas a las que cursan con grave compromiso de la salud o la vida del paciente. Serán estas últimas, el interés principal del diagnóstico de laboratorio, teniendo en cuenta la inespecificidad de los signos y síntomas clínicos que se presentan.

6.1. VIRUS HERPES SIMPLEX

Si bien los miembros del género *Simplexvirus*, el Virus Herpes Simplex 1 (HSV-1) y el Virus Herpes Simplex 2 (HSV-2) comparten un 40% de homología genómica, con características antigénicas comunes y muchas similitudes biológicas, son distinguidos principalmente por la zona del cuerpo que afectan y por la forma en que se transmiten (TABLA 7).

Tabla 7. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LAS INFECCIONES POR SIMPLEXVIRUS		
	HSV-1	HSV-2
Zona afectada	Boca, faringe, cara, ojos, sistema nervioso central	Zona genital
Forma de transmisión	Contacto oral	Contacto sexual
Infecciones más comunes	Herpes labial, queratitis herpética, gingivostomatitis, etc	Herpes genital, herpes neonatal, etc.
Recidivas	Poco frecuentes	Más frecuentes

La infección por los HSV-1 y HSV-2 está mundialmente extendida y a los 20-40 años prácticamente toda la población ha tenido contacto con el virus. Las reactivaciones por HSV-2 son 8-10 veces más frecuentes que las producidas por HSV-1, teniendo una media de 4 recurrencias en un año después de la infección primaria.

La infección herpética afecta tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, aunque en estos últimos la gravedad de los procesos es mayor. **El 80% de pacientes inmunosuprimidos tienen reactivaciones por HSV**, siendo las localizaciones periorales las más frecuentes. Un 10-15% de estas infecciones tienen diseminación hematogena y pueden provocar una afectación visceral.

El espectro clínico de las infecciones por los HSV es amplio, estando implicados en lesiones mucocutáneas locales o generalizadas, infección genital, infección ocular, infección

congénita y neonatal, afectación neurológica (meningitis/encefalitis) e infección visceral. La **primoinfección herpética** puede producir *lesiones cutáneas en forma de exantema vesicular* (infección perioral, perigenital, neonatal). Ocasionalmente produce complicaciones neurológicas y viscerales en especial en pacientes inmunosuprimidos.

El diagnóstico virológico se puede realizar de varias formas dependiendo en cada ocasión de que haya o no vesículas, de las características del hospedero (edad, inmunosupresión, etc.) y del momento en que se realice la toma de la muestra.

6.1.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR HSV

6.1.1.1. Herpes recidivante extragenital: entidad muy frecuente, afectando en algunos casos hasta a un 20% de la población adulta. La localización más frecuente es la cara (especialmente en territorio orolabial), seguido por sacro, nalgas y parte distal de los dedos de las manos. Las recidivas suelen presentarse siempre en el mismo sitio y tener un pródromo de 24 – 48 horas que consiste en parestesias, ardor o prurito (“síndrome de Maurice”). No suele haber fiebre ni sintomatología sistémica aunque sí adenopatías regionales. Lo típico son brotes herpéticos faciales-orales recurrentes (de 1 a 5 al año) que se resuelven espontáneamente en unos días.

6.1.1.2. Gingivostomatitis: forma clínica más frecuente de primoinfección sintomática por HSV1. Afecta sobre todo a la mucosa oral anterior. El cuadro típico es el de un niño de 1-10 años con gingivostomatitis asociada a linfadenopatías dolorosas, fiebre, odinofagia y malestar general. En ocasiones se forma una circunferencia alrededor de la boca de erosiones y ulceraciones que imposibilitan al niño comer o beber, lo que requerirá incluso ingreso hospitalario. La deshidratación secundaria es la complicación más frecuente.

6.1.1.3. Queratoconjuntivitis: es habitualmente unilateral y purulenta, con dolor intenso y visión borrosa. El virus produce ulceraciones corneales de morfología dendrítica muy características. Existen adenopatías preauriculares dolorosas.

6.1.1.4. Vulvovaginitis: en niñas de corta edad suele ser por HSV-1. Si es por HSV-2 debe investigarse potenciales abusos sexuales.

6.1.1.5. Panadizo herpético (*herpes whitlow*): lesiones en los dedos de la mano muy dolorosas. Se suele ver en niños que se autoinoculan de forma inadvertida un herpes simple orofacial recurrente o en personal sanitario que explora la región de la boca o los genitales de los pacientes. Puede acompañarse de fiebre, cefalea y adenopatías regionales. Después de la primoinfección, el virus queda latente en el nervio y puede recidivar en la misma localización.

6.1.1.6. Herpes genital: causa más frecuente de úlceras genitales en los países industrializados. En el 80% de casos se debe a HSV-2 y en un 20% de casos a HSV1.

La posibilidad de recidiva es mayor con el HSV-2 que con el HSV-1. Más del 50% de adultos que han padecido una infección primaria genital desarrollarán recidivas a lo largo de su vida. La primoinfección suele determinar un cuadro clínico florido, que puede durar más de 3 semanas. Las lesiones cutáneas suelen ser múltiples y muy dolorosas, con disuria y adenopatías inguinales bilaterales. Incluso un porcentaje nada despreciable de pacientes desarrollan una meningitis aséptica (fiebre, fotofobia, cefalea y rigidez de nuca). Las recidivas son más leves, con escasas lesiones cutáneas y sintomatología menos intensa y de menor duración. La intensidad y duración de la primoinfección se relaciona con la frecuencia e intensidad de las recurrencias.

6.1.1.7. Herpes neonatal: Los recién nacidos (RN) típicamente adquieren la infección mediante el paso a través del canal del parto infectado (85% casos), sin embargo existe un pequeño porcentaje de casos debidos a infección transplacentaria (5%) y a adquisición postparto (15%). Es importante señalar que *el 70 - 85% de los casos de neonatos infectados son hijos de madres sin historia previa de herpes genital, sin sintomatología en el momento del parto y sin historia del mismo en la pareja*. La tasa de infección neonatal varía dependiendo del tipo de infección materna siendo más frecuente en la primoinfección materna genital (33 - 50%) que en la reactivación materna (1 - 3%). *La mayoría de los neonatos infectados presentan sintomatología*, sin embargo la media de diagnóstico varía entre los 5 - 7 días post-parto ya que las manifestaciones clínicas de la enfermedad son inicialmente inespecíficas. El 10% de los RN, pese a ello, desarrollan sintomatología en el primer día de vida.

El **Herpes Neonatal causado por HSV** se clasifica en 3 categorías clínicas:

– **Enfermedad cutánea/ocular/oral** (conocida como *SEM disease* [skin/eye/mouth]): es la forma menos severa y típicamente se manifiesta por lesiones cutáneas en forma de vesículas aisladas o agrupadas. Pueden seguir apareciendo lesiones cutáneas incluso tras el inicio del tratamiento. Se puede acompañar de úlceras bucales y de queratoconjuntivitis o coriorretinitis como hallazgos oculares predominantes. Pueden producirse manifestaciones cutáneas recidivantes en algunos de estos pacientes y parece que ello se relaciona con anomalías neurológicas lo que podría sugerir una afectación del SNC no detectada.

– **Enfermedad localizada del SNC:** la fiebre suele estar presente en el 44% de estos pacientes y puede ser la única manifestación clínica. Además pueden presentar hipotermia, letargia, apnea, irritabilidad, convulsiones focales o generalizadas, opso-clonus (alteración de la motilidad ocular), signos piramidales o pérdida del reflejo de succión. *En un tercio de estos pacientes no existen lesiones orales o cutáneas asociadas que sugieran el diagnóstico*. El análisis del LCR muestra una pleocitosis mononuclear, a pesar de que se han demostrado casos con predominio neutrofílico e incluso con recuentos celulares normales. Suele existir hiperproteíorraquia con glucosa normal o ligeramente disminuida. *Aproximadamente el 15% de los casos de encefalitis por HSV-2 fallecen, pero la mortalidad de la encefalitis por HSV-1 es prácticamente nula*. Dos tercios de los supervivientes tienen secuelas neurológicas a largo plazo.

– **Enfermedad diseminada:** se considera diseminada si existe *evidencia de afectación visceral* incluyendo hepatitis, neumonitis o coagulación intravascular diseminada. Los órganos más afectados son el hígado, el corazón, los pulmones, las glándulas suprarrenales y el tracto digestivo. En dos tercios de los casos diseminados existe también afectación del SNC. La tasa de mortalidad es del 55% pese al tratamiento con aciclovir y del 80% sin tratamiento. La quinta parte de los que sobreviven presentan graves secuelas neurológicas.

Se debe considerar la posibilidad de infección herpética en todo neonato con sospecha clínica de sepsis, resultados negativos de los cultivos bacterianos y disfunción hepática.

Existe cierta superposición entre estas 3 categorías clínicas ya que se suelen apreciar lesiones cutáneas en todas ellas (el 68% de los RN infectados las presentan) y la enfermedad diseminada suele asociarse también con afectación neurológica.

6.1.2. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA PARA LAS INFECCIONES POR HSV

Las situaciones que justifican el diagnóstico de laboratorio de los HSV son:

- Diagnóstico diferencial en las infecciones congénitas y neonatales (herpes neonatal).
- Prevención del herpes neonatal.
- Diagnóstico etiológico de las infecciones del SNC (encefalitis).
- Diagnóstico de las infecciones generalizadas en inmunosuprimidos.
- Diagnóstico diferencial en formas de presentación clínica inhabituales.
- Diagnóstico etiológico del herpes genital y diagnóstico diferencial de úlceras genitales.
- Pruebas de sensibilidad a los antivirales (en centros de referencia).

6.1.2.1. Diagnóstico en presencia de lesiones vesiculosas externas. Los métodos directos elegidos a partir de *hisopado de la lesión* son:

- **IFD** a partir de improntas fijadas en acetona fría y teñidas luego con Acs monoclonales marcados, habitualmente con fluoresceína. La eficacia diagnóstica de esta técnica está relacionada con el estado de lesión, variando desde el 100% en el caso de vesículas, a un 25% cuando las improntas se realizan a partir de las costras.
- **PCR** a partir de los purificados obtenidos de hisopos en medio de transporte viral o molecular.

6.1.2.2. Diagnóstico en ausencia de lesiones vesiculosas externas. Es importante distinguir 4 circunstancias:

- **Procesos clínicos donde se produce excreción viral como faringitis, uretritis, cervicitis y neumonías:** Las muestras de elección son los exudados de la zona afectada (faringe, uretra, endocérnix y lavados broncoalveolares en las neumonías). La detección del virus debe realizarse mediante técnicas moleculares de amplificación o IFD.
- **Queratitis, esofagitis, proctitis:** Las muestras de elección en estos casos son los raspados corneales, biopsias respectivas o humor vítreo. En estos casos el diagnóstico se hace mediante técnicas de amplificación genómica.

- **Procesos clínicos acompañados de viremia (herpes neonatal, herpes generalizado y herpes visceral):** En estos casos se puede detectar por métodos moleculares en sangre periférica.
- **Encefalitis:** los métodos moleculares a partir del LCR son la metodología diagnóstica de elección.

El papel de los **métodos serológicos** en el diagnóstico de la infección herpética sintomática es secundario; no obstante, pueden ser útiles en las siguientes situaciones:

- Historia reciente de enfermedad compatible con un Herpes genital sin lesiones aparentes.
- Primoinfección herpética o infección inicial sintomática recientemente adquirida (> 6 semanas) en que los métodos directos son negativos.
- Existencia de lesiones recurrentes de naturaleza presuntamente herpética en que no se puede demostrar la presencia del virus mediante métodos directos.
- Estudios epidemiológicos de prevalencia.

Se dispone de pruebas comerciales en los formatos EIA, *immunodot* e *immunoblot* que permiten la detección de Acs IgM e IgG a-HSV-1 o a-HSV-2. Estos ensayos utilizan como sustrato antigénico las glucoproteínas gG1 (HSV-1) y gG2 (HSV-2), las cuales contienen epítopes tipo-específicos en su extremo N-terminal. La infección natural por los HSV no suele generar cantidades apreciables de Acs con reactividad cruzada para antígenos gG.

Los **métodos moleculares** de amplificación en el **diagnóstico de las meningoencefalitis** son los ensayos elegidos, ya que es posible detectar HSV en *muestras de LCR* en estadios iniciales de la enfermedad, lo que permite instaurar una terapéutica antiviral precoz que tiene gran importancia en el pronóstico. *El ADN-HSV puede detectarse en LCR hasta 1-2 semanas después de iniciado el tratamiento antiviral.* Si bien, presenta una sensibilidad superior al 95% en el momento de la presentación clínica con una especificidad del 100%, **la PCR puede arrojar resultados negativos en el diagnóstico de encefalitis por HSV en las primeras 48 horas de la enfermedad.** Estos falsos negativos precoces pueden deberse a la presencia de insuficiente cantidad de ADN-HSV en el LCR o a limitaciones técnicas. La sensibilidad clínica sugerida en estos períodos precoces de la enfermedad es del 70%.

En el **Herpes neonatal con manifestación neurológica, la PCR sobre LCR es el método de elección** porque no suele detectarse ADN-HSV en plasma o suero del paciente. La PCR como método de screening de HSV en embarazadas en momentos cercanos al parto para prevenir el Herpes neonatal no es recomendado ya que la técnica puede detectar excreción asintomática del virión y no es posible adoptar medidas activas (parto por cesárea).

6.2. VIRUS VARICELA-ZOSTER

6.2.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR VZV

La infección primaria (**varicela**) es una enfermedad altamente contagiosa, con una alta incidencia en la primera década de la vida. Sin embargo, una proporción variable de personas (4 - 20%) alcanzará la edad adulta siendo todavía susceptible a la

infección. La varicela cursa en el niño como una dolencia benigna, con infrecuentes complicaciones y fácilmente diagnosticable clínicamente.

También suelen reconocerse con facilidad, por sus manifestaciones clínicas, las **re-activaciones** del virus (**herpes zoster**) en el hospedero inmunocompetente. Por lo contrario, el paciente inmunodeprimido es un terreno fértil para la presentación de formas complicadas, incluso fatales, tales como la neumonitis o la encefalitis. También el cuadro clínico en la afección cutánea tiende a ser atípico.

El VZV puede causar infección materna y neonatal, aunque es infrecuente en términos absolutos y relativos. Si bien es posible la infección intrauterina en las primeras etapas de la gestación, con graves consecuencias para el feto, esta situación es extremadamente rara, siendo más frecuentes aquellas que se producen en el período próximo al parto, desde 7 días antes del parto hasta 4-5 días postparto.

Existe una vacuna a virus vivos atenuados elaborada con una cepa atenuada (**cepa OKA**) cultivada en células diploides humanas MRC-5 y Wi-38. La formulación fue autorizada por la FDA para EE.UU. en 1995, para mayores de un año que no hubieran padecido varicela. Genera un 95 a 100% de inmunidad duradera en la mayoría de los casos, con altos títulos de Acs que se mantienen aún después de 10 años desde su aplicación.

6.2.2. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA PARA LAS INFECCIONES POR VZV

Las situaciones que justifican el diagnóstico de laboratorio del VZV son:

- Diagnóstico diferencial rápido de infecciones mucocutáneas en paciente inmunodeprimidos.
- Diagnóstico diferencial de las infecciones del SNC.
- Diagnóstico de las formas clínicas graves y poco habituales (afección del SNC o neumonitis).
- Conocimiento del estado inmunitario en pacientes de alto riesgo de presentar complicaciones, o de sus cuidadores sanitarios.
- Determinación de la susceptibilidad a la infección en mujeres en edad fértil.
- Evaluación de la eficacia protectora de la infección natural y de la vacuna.

6.2.2.1. Diagnóstico en presencia de lesiones vesiculosas externas. Los métodos elegidos para a partir de **hisopado de la lesión** son:

- **IFD** a partir de improntas fijadas en acetona fría y teñidas luego con Acs monoclonales marcados, habitualmente con fluoresceína. La eficacia diagnóstica de esta técnica está en relación con el estado de lesión y dependerá en gran medida de *la correcta toma de muestra*. La sensibilidad del método puede detectar el 100% de las lesiones tempranas. Si se utilizan Acs monoclonales no hay reactividad cruzada con los HSV.
- **PCR** a partir de los purificados obtenidos de hisopos en medio de transporte viral o molecular.

6.2.2.2. Diagnóstico en ausencia de lesiones vesiculosas externas. Las pruebas EIA son las más generalizadas y existen reactivos comerciales que permiten *la detección de Acs IgG e IgM a-VZV*. Estas técnicas han demostrado una gran sensibilidad y son buenos marcadores de susceptibilidad a la infección. Suelen positivizar a los pocos días de la aparición del cuadro de varicela. En el herpes zoster se detectan concentraciones altas de Acs en fases iniciales del cuadro. **La detección de IgM no permite diferenciar necesariamente una primoinfección de una reactivación.**

La detección de Acs a-VZV cuando se aplica al diagnóstico de las infecciones activas presenta 3 problemas:

- las reacciones heterotípicas que se producen por el estímulo de los antígenos comunes del VZV y los HSV.
- el retraso en la producción de Acs en la infección primaria, siendo necesario obtener muestras de suero de las fases aguda y de convalecencia (no menos de 2 semanas después)
- la respuesta serológica puede verse alterada en los pacientes inmunodeprimidos.

Por ello, **se recomienda reservar las pruebas serológicas sobre todo para conocer el estado inmunitario frente al virus.** Cuando se desee *conocer la susceptibilidad al virus en pacientes de alto riesgo* (niños con cáncer candidatos a quimioterapia o radioterapia, por ejemplo) se considerará que la inmunodepresión puede enmascarar el resultado. También puede ser interesante conocer el *estado inmunitario del personal sanitario, cuidadores o familiares que atienden a los pacientes de alto riesgo y en la embarazada expuesta a un contacto con el VZV*. En este sentido, es necesario recordar que la existencia de antecedentes de haber pasado la infección es un marcador fiable de protección, por lo que no se necesitará ninguna acción adicional en caso afirmativo. De lo contrario, se realizarán pruebas de EIA sobre todo si la gestación está en las 2-3 últimas semanas.

La PCR es de gran utilidad en el diagnóstico de los siguientes procesos causados para el VZV:

- **Infección primaria o reactivaciones en inmunodeprimidos:** es necesario el diagnóstico diferencial con las infecciones diseminadas causadas por las HSV.
- **Complicaciones neurológicas** (*encefalitis, meningoencefalitis, meningitis, mielitis, etc*); la PCR en LCR permite el diagnóstico de estas infecciones y la instauración de la terapia adecuada.
- **Complicaciones respiratorias** (*neumonitis*): a partir de lavado broncoalveolar u otras muestras respiratorias profundas, limitada a pacientes inmunodeprimidos.
- **Complicaciones en retinitis en pacientes con SIDA:** para establecer el diagnóstico diferencial con el CMV (muestra adecuada: humor vítreo) y aplicar la terapia antiviral específica.

6.3. CITOMEGALOVIRUS

6.3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR CMV

El 80% de la población adulta en nuestro país está infectada por el CMV. Gran parte de estas infecciones se contraen durante la gestación, la lactancia o en la edad preescolar o escolar. El virus puede transmitirse por la saliva (picos de incidencia en guarderías y en adultos jóvenes) y a través de la sangre, de sus derivados y de los órganos trasplantados. Cuando existen síntomas, se manifiesta como un **síndrome mononucleósico** y, más raramente, bajo la forma de **hepatitis**.

La situación es muy diferente en el paciente inmunodeprimido (trasplantados de órganos sólidos o de médula ósea, neoplásicos, pacientes tratados con medicamentos que deprimen la inmunidad celular como corticoides o ciclosporina y los portadores del HIV-1). En esta población las infecciones activas son muy frecuentes, generalmente debidas a reactivaciones. El espectro clínico es muy variable y puede manifestarse desde las formas asintomáticas a las que cursan con grave compromiso de la vida del paciente; en cualquiera de los casos son manifestaciones clínicas inespecíficas.

El CMV es la causa más frecuente de infecciones congénitas y neonatales. Se calcula que el 0,5 - 2,5% de los recién nacidos vivos contraen el virus durante el parto o durante la lactancia materna. El 40% de los niños se infectarán durante el 1º año de vida. Desde el punto de vista clínico es importante distinguir:

- **Infección por CMV:** el aislamiento o identificación del virus en algún producto biológico (sangre, orina, esputo, heces) o el aumento en 4 veces del título de Acs IgG a-CMV o aparición de Acs IgM a-CMV (seroconversión), en ausencia de síntomas o hallazgos clínicos (leucopenia o signos de afectación de algún órgano).
- **Enfermedad por CMV:** demostración de infección con evidencia histológica de los ECP del virus o PCR ADN-CMV detectable en las muestras tisulares, junto a la presencia de síntomas compatibles. La presencia de viremia en sangre (ADN-CMV) por PCR, o la evidencia de seroconversión en un paciente con síntomas sugestivos también permiten diagnosticar la enfermedad.
- **Enfermedad diseminada por CMV:** cuando se produce enfermedad en 2 o más órganos no contiguos o enfermedad localizada en un solo órgano, coincidiendo con la detección del virus en sangre.

En las *personas inmunocompetentes*, los Acs IgM a-CMV son detectables 7-12 días después de la aparición de los síntomas, y tardan 2-3 semanas en alcanzar su nivel máximo (Figura 24). Después, decrecen paulatinamente hasta ser indetectables unos meses más tarde. No obstante lo anterior, los Acs IgM a-CMV pueden persistir en el suero 1 año o más tras la primoinfección, aun en ausencia de infección activa (replicación del virus). Los Acs IgG a-CMV pueden detectarse en el suero a las 4-6 semanas posteriores a la infección y, aunque su nivel declina, generalmente persisten en el suero de por vida, si bien en concentraciones bajas. La *avidéz de los Acs IgG a-CMV* aumenta con el tiempo (maduración de la afinidad), alcanzando su máximo a los 4-5 meses del inicio de los síntomas.

Por otra parte, los Acs que detectan todos los procedimientos serológicos disponibles reconocen mayoritariamente proteínas del tegumento (fosfoproteínas) y no glucoproteínas de su membrana, por lo que *no existe correlación entre el grado de protección frente al CMV circulante, que sólo la confieren los Acs neutralizantes, y el nivel de Acs determinado por estos métodos.*

La reactivación de la infección latente y la reinfección por una cepa heterotípica generan un efecto amplificador (*booster*), que suele traducirse en un incremento apreciable del nivel basal de los Acs IgG a-CMV (aumento de 4 veces el título). En estas circunstancias la reaparición de los Acs IgM a-CMV en el suero es posible.

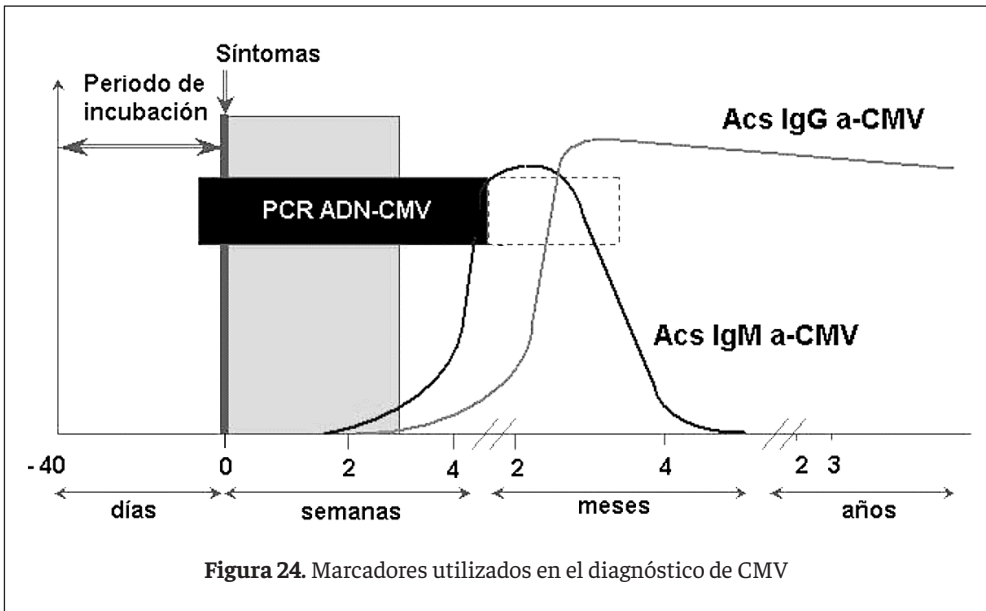


Figura 24. Marcadores utilizados en el diagnóstico de CMV

6.3.2. METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA PARA INFECCIONES POR CMV

6.3.2.1. Detección de Acs a-CMV. La *IFI* utiliza como fuente de antígeno un microcultivo de CMV en fibroblastos humanos y son aptas para detectar Acs IgG e IgM a-CMV. El mayor problema es la *presencia de falsos positivos en la detección de Acs IgG a-CMV* debido a que CMV induce receptores Fc en el citoplasma de los fibroblastos que reaccionan inespecíficamente con las IgG y que el personal inexperto puede interpretar erróneamente. Estas inespecificidades aparecen como inclusiones citoplasmáticas perinucleares fluorescentes justo por fuera de la membrana nuclear de estas células. Esto debe ser diferenciado de las inclusiones nucleares específicas de CMV fluorescentes.

Los *EIA* son automatizables y pueden detectar Acs IgG e IgM a-CMV. Los métodos *EIA* son también más sensibles y la especificidad en la detección de Acs IgG a-CMV es muy elevada, por encima del 98%. Estos ensayos presentan antígenos virales en

la fase sólida correspondientes a las fosfoproteínas de tegumento viral pp150 y pp65 que son las más inmunogénicas.

El **ensayo de avidéz para los Acs IgG a-CMV** se basa en un EIA en el cual el suero del paciente se hace reaccionar en duplicado con el antígeno CMV adherido a los pocillos de una microplaca. Tras la primera incubación, seguida de un lavado de la microplaca, los duplicados de cada suero se incuban con 2 soluciones tampón distintas: i) diluyente de muestra o ii) solución conteniendo urea. Este último reactivo provoca la disociación de la unión antígeno-anticuerpo formado precedentemente, en distinta medida según la avidéz de los Acs. Tras un nuevo lavado, los Acs que queden unidos a la fase sólida se evidencian mediante sucesivas reacciones con Acs anti-IgG humana marcado con peroxidasa, y un cromógeno. Finalmente, se calcula la relación entre las densidades ópticas obtenidas con las 2 soluciones tampón utilizadas y se expresa como porcentaje de avidéz. Una avidéz mayor a 45% indica presencia de Acs IgG a-CMV de alta avidéz.

Los **Acs neutralizantes** son aquellos capaces de bloquear la capacidad infectiva del virus contra el antígeno viral al que van dirigidos. Estos Acs aparecen después de una media de 13 semanas tras la seroconversión o de 15 semanas tras la primoinfección. Por lo tanto, *la ausencia de los Acs neutralizantes a-CMV en presencia de Acs IgG a-CMV sería un marcador fiable de infección primaria reciente*, mientras que su presencia excluiría la infección en un tiempo inferior a 13-15 semanas. Los Acs neutralizantes a-CMV van dirigidos contra las proteínas virales gB (glicoproteína UL55) y gH (glicoproteína UL75). Sin embargo, poner a punto la detección de estos Acs en el laboratorio requiere de técnicas largas y laboriosas, y es necesario poder mantener cepas vivas del virus en cultivo celular, lo cual no es posible para la mayoría de los laboratorios clínicos. Recientemente se han comercializado 2 técnicas de **inmunoblot** y de **EIA** en las que se utilizan como antígeno las mismas glicoproteínas recombinantes gB y gH.

6.3.2.2. Detección de ADN-CMV. La PCR cualitativa se aplica en las siguientes situaciones

- **Infecciones del SNC** (encefalitis, mielitis, etc.): La detección de ADN-CMV en LCR es el método de elección. Se correlaciona con los estudios histopatológicos y con las manifestaciones clínicas.
- **Otras infecciones por CMV en pacientes con SIDA** (retinitis, esofagitis, duodenitis, colitis, etc). De ellas, la más frecuente es la **retinitis**, que suele diagnosticarse por exploración oftalmológica. En algunos casos, cabe la necesidad de un diagnóstico diferencial (por ejemplo con VZV) y se realiza sobre humor vítreo.
- **Infecciones congénitas y neonatales:** Puede detectarse ADN-CMV en orina, suero y LCR de neonatos con infección congénita. Los infectados con detección de genoma en LCR se correlacionan con retraso en el desarrollo neurosensorial.
- **Infecciones en trasplantados:** La PCR cualitativa puede predecir precozmente el riesgo de reactivación, lo que **no** quiere decir enfermedad. Para mejorar el valor pronóstico se están utilizando técnicas de **PCR cuantitativas** (CVP-CMV), ya que se ha demostrado que una mayor CVP se asocia con una mayor probabilidad de enfermedad por CMV.

6.3.3. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA PARA LA INFECCIONES POR CMV

6.3.3.1. Diagnóstico de primoinfección-reactivación de CMV. El diagnóstico de una **infección primaria** de reciente adquisición mediante el ensayo de Acs IgM a-CMV resulta difícil dada la presencia de esta clase de Acs también en casos de **infecciones recurrentes**. Además, los Acs IgM a-CMV pueden detectarse en suero durante varios meses, y en pacientes inmunodeprimidos hasta 2 años. La medida de la **avidez de los Acs IgG a-CMV** es particularmente útil para el diagnóstico de una infección primaria. Así, para la diferenciación serológica entre **infección primaria y secundaria** (reactivación o reinfección), se puede recurrir a distintas estrategias (Tabla 8).

TABLA 8. Pruebas utilizadas para el diagnóstico por CMV

	INFECCIÓN PRIMARIA	INFECCIÓN SECUNDARIA
Seroconversión	SI	NO
Nivel alto de IgG en muestra única	SI	SI
Detección de Acs IgM	SI	posible
Detección de Acs IgG	< 30%	> 65%
Acs neutralizantes	NO	SI

6.3.3.2. Infección de CMV en trasplantes sólidos. La infección por CMV aparece en el 30 – 80% de los pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos, aunque su incidencia y la presencia de enfermedad sintomática varían dependiendo del tipo de trasplante, de la presencia de factores de riesgo asociados y de las estrategias de prevención utilizadas. No todos los pacientes trasplantados de órganos sólidos tienen el mismo riesgo de desarrollo de infección o enfermedad por CMV. *El principal factor de riesgo de enfermedad por CMV es el trasplante de un donante seropositivo (D+) a un receptor seronegativo (R-), por lo cual es importante conocer el status serológico del receptor mediante el dosaje de Acs IgG a-CMV.*

El período de mayor riesgo de infección por CMV está entre el 1° - 6° mes post-trasplante, con una máxima incidencia entre el 2° - 3° mes. En la **infección primaria (D+/R-)**, la falta de inmunidad específica del receptor permite una gran replicación de CMV, y suele ser una infección sintomática (*enfermedad por CMV*) a veces muy grave. En las **reactivaciones (D+/R+)**, la propia inmunidad humoral y celular del receptor disminuyen la dinámica de replicación del virus con lo que la incidencia y gravedad de la enfermedad es menor.

La infección por CMV en individuos trasplantados tiene 2 tipos de efectos (Figura 25):

- **efectos directos:** causados como consecuencia de la invasión viral (injurias celular y tisular) dando lugar al síndrome viral o enfermedad por CMV, o a enfermedad invasiva.
- **efectos indirectos:** causados por la respuesta inflamatoria con producción y liberación de citoquinas o por alteraciones en la respuesta inmune y respuesta in-

flamatoria del hospedero. La replicación viral del CMV produce una situación de inmunosupresión debido a las alteraciones funcionales que causa en los linfocitos y monocitos, alterando la capacidad de respuesta y la producción de citoquinas. Estas alteraciones en la respuesta inmune pueden explicar la frecuente asociación de CMV con otras infecciones (bacterianas o fúngicas) o de desarrollo de infecciones oportunistas (IO) como neumonía por *P. jirovecii* y aspergillosis invasiva. La infección por CMV también se ha asociado a activación de otros herpesvirus como HSV, VZV, EBV, HHV-6 o HHV-8. Otros efectos indirectos del CMV, relacionados con la inmunoactivación que el virus produce en el hospedero, es el desarrollo del **rechazo del injerto**. Esta relación parece ser bidireccional. Los mecanismos potenciales incluyen sobreexpresión de las moléculas de los antígenos mayores de histocompatibilidad, factores de crecimiento, y citoquinas inflamatorias que aumentan la expresión de antígenos de HLA de clase I.

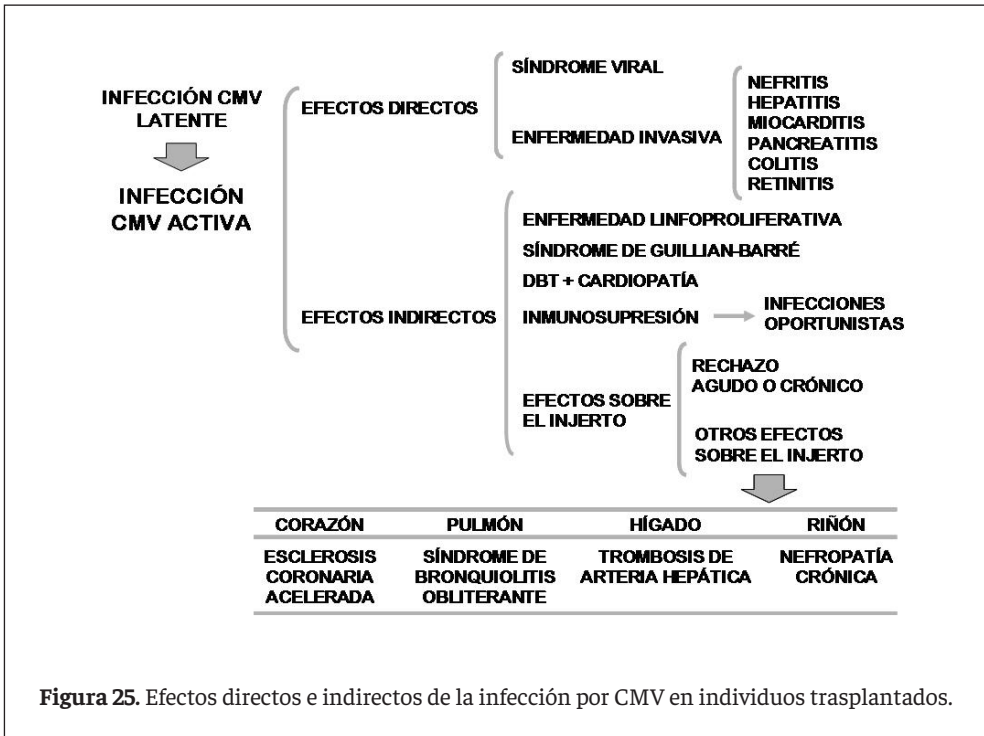


Figura 25. Efectos directos e indirectos de la infección por CMV en individuos trasplantados.

En el trasplante renal, hay evidencia de la influencia de la infección por CMV en la pérdida del injerto. La enfermedad por CMV se ha asociado con las 2 principales causas de *pérdida tardía del injerto*: i) la enfermedad cardiovascular y ii) el rechazo crónico del injerto. Para ello se debe monitorear la posible infección por CMV por métodos moleculares.

Como la incidencia de enfermedad por CMV es especialmente elevada en el paciente D+/R-, se recomienda realizar medidas preventivas para la infección por CMV. Para prevenir la infección por CMV en el paciente trasplantado hay 2 aproximaciones posibles:

- **tratamiento anticipado:** consiste en monitorizar periódicamente con técnicas diagnósticas moleculares sensibles (preferentemente CVP-CMV) para detectar la presencia de CMV. Si las pruebas son positivas, a partir de un punto de corte definido según el tipo de trasplante y la técnica de diagnóstico utilizada, se inicia un tratamiento antiviral hasta la negativización de la prueba y resolución clínica.
- **profilaxis:** consiste en la administración de un fármaco antiviral de forma continua durante el periodo de mayor riesgo tras el trasplante (6 meses post-trasplante). El tratamiento anticipado ha mostrado efectos beneficiosos en la evolución del injerto y en la supervivencia del paciente. La aparición de un fármaco oral como el valganciclovir, con una buena biodisponibilidad oral y el desarrollo de técnicas diagnósticas sensibles, ha permitido adoptar esta medida en los grupos de menor riesgo de infección o enfermedad por CMV como es el grupo de D+/R+.

6.3.3.3. Infección por CMV en la mujer embarazada

- **Embarazada seropositiva para CMV antes de la concepción:** representan el 50-70% de los casos en países industrializados y presentan un riesgo de transmisión de CMV al RN de aproximadamente 1%. Por ello, no es necesario el monitoreo de la infección en estas pacientes.
- **Embarazada seronegativa para CMV dentro de los 6 meses previos a la concepción:** este grupo es susceptible de infección primaria por CMV. La detección de Acs IgG a-CMV deberá ser realizada al menos al 2° - 4° mes del embarazo. Si se observa seroconversión, se establece el diagnóstico de infección primaria por CMV y se podría determinar el diagnóstico prenatal de infección congénita.
- **Embarazadas con status serológico pre-concepción desconocido:** en esta situación es necesario realizar el dosaje de Acs IgG a-CMV.

El diagnóstico de infección primaria en la mujer gestante y su utilidad práctica representa un reto no resuelto por las técnicas de laboratorio debido a que:

- el riesgo de complicaciones significativas para el RN es muy bajo en caso de una reactivación materna o de una primoinfección fuera del primer trimestre de embarazo.
- no es posible identificar los casos concretos con riesgo de presentar complicaciones graves en el nacimiento, ni siquiera dentro de las que adquieren la infección durante el primer trimestre
- es difícil, en la práctica, determinar el momento preciso de adquisición de la infección primaria en la madre.
- probablemente, muchos fetos gravemente afectados por el virus conducen a aborto espontáneo.

En consecuencia, **se recomienda el screening sistemático de Acs IgG a-CMV en la embarazada** y en base al resultado obtenido, seguir el algoritmo diagnóstico detallado en la Figura 26. Además, es recomendable conservar un suero obtenido durante el embarazo, con el fin de ayudar en el diagnóstico diferencial de una hipotética infección congénita clínicamente manifiesta en el RN

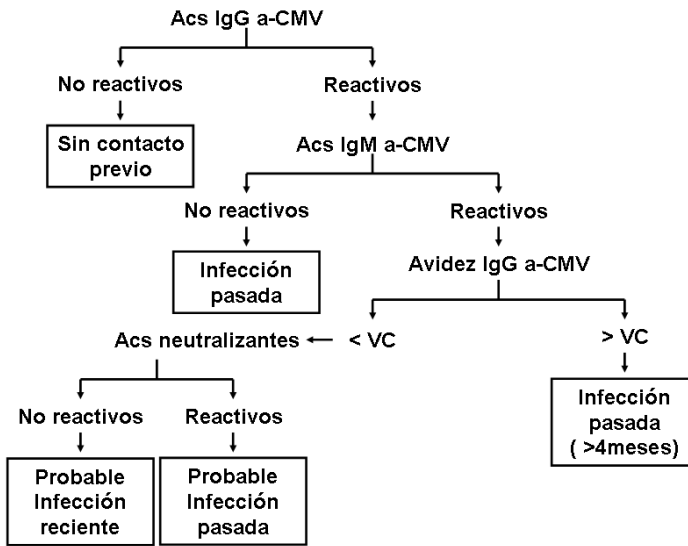


Figura 26. Algoritmo diagnóstico de infección por CMV en embarazadas

6.3.3.4. Infección congénita por CMV. La infección por CMV es la principal causa viral de enfermedad neurológica congénita. En contraste a la susceptibilidad del SNC en desarrollo, el CMV no es una amenaza particular para el cerebro maduro, excepto en condiciones de inmunosupresión. Se ha demostrado que *el CMV tiene predilección intrínseca por las células cerebrales en desarrollo* que parece estar relacionada con la unión del virus a moléculas de superficie y de transporte que se expresan en células cerebrales inmaduras, pero no en las maduras. Las células neuronales progenitoras de las que se derivan los tipos celulares más importantes del SNC son permisivas a la infección por CMV. La infección de las células precursoras se asocia con alteración de la proliferación celular y con aumento de las tasas de muerte celular. Esta hipótesis coincide con la observación de que el CMV tiende a infectar preferentemente las zonas ventriculares y subventriculares del cerebro fetal, donde se localizan las células neuroepiteliales indiferenciadas. Se desconocen los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se comprometen de manera aislada las células del nervio auditivo. De la totalidad de los pacientes que nacen infectados con CMV, sólo el 10% presenta signos y síntomas de la enfermedad en el momento del nacimiento. Se han des-

crita manifestaciones neurológicas en un 55% de los pacientes sintomáticos, e incluyen microcefalia, calcificaciones intracraneanas, coriorretinitis, y convulsiones. Los cambios radiológicos a nivel del SNC incluyen microcefalia con polimicrogiria (malformación cerebral caracterizada por excesivos pliegues corticales y surcos poco profundos), disminución del volumen de la sustancia blanca, gliosis, calcificaciones cerebrales de predominio periventricular, retraso en la mielinización e hipoplasia cerebelosa.

El 90% de los pacientes tienen una infección clínicamente silente en el momento del nacimiento. De este grupo, 10 – 15 % tendrán pérdida auditiva, problemas de comportamiento o hiperactividad en etapas más tardías.

- **Diagnóstico prenatal de la infección por CMV:** Una vez diagnosticada la infección primaria por CMV en la embarazada, se puede acceder al diagnóstico prenatal de la infección. *El 70% de los casos confirma ausencia de infección congénita.* El CMV se transmite al feto cuando los leucocitos maternos infectados atraviesan la barrera placentaria y llegan a la circulación fetal por medio de los vasos del cordón umbilical. Otra posibilidad es que el virus infecte primero la placenta y posteriormente el líquido amniótico. Las células amnióticas infectadas podrían ser ingeridas por el feto, después de lo cual el virus replicaría en la orofaringe e invadiría la circulación fetal para diseminarse a los órganos blanco. El epitelio tubular dentro del riñón es el sitio de mayor replicación del CMV. Mediante este mecanismo de infección, el feto excretaría virus por la orina dentro del líquido amniótico. Por lo tanto, *el líquido amniótico es la muestra de elección para realizar el diagnóstico prenatal de la transmisión de CMV obtenido por amniocentesis entre las 21-23 semanas de gestación.* Sin embargo, esta práctica genera un riesgo al feto y, sumado a la baja probabilidad de desarrollo de enfermedad por CMV, hace poco recomendable su práctica.
- **Diagnóstico postnatal de infección por CMV:** El *método de referencia* para el diagnóstico de infección congénita por CMV es *el aislamiento del virus en fibroblastos humanos en las primeras 2 semanas de vida.* Sin embargo, por incapacidad de la mayoría de los laboratorios diagnósticos en implementar esta práctica, se ha reemplazado por los ensayos de *PCR cualitativa* con una sensibilidad cercana al 100%. La determinación del ADN-CMV en *orina del RN por PCR* en el momento del nacimiento parece ser tan sensible y específica como la detección en plasma y no es invasiva. La determinación de Acs IgM a-CMV en el RN presenta una sensibilidad del 70,7%, por lo que la utilidad de ésta última en el diagnóstico de infección congénita por CMV es limitada.

El tratamiento con medicamentos antivirales específicos como ganciclovir y foscarnet no ha demostrado modificar significativamente el curso de la enfermedad neurológica establecida ni el riesgo de desarrollar hipoacusia en etapas posteriores.

Lo habitual es que la necesidad de un diagnóstico diferencial se presente *más allá de los 3 meses de vida* donde la positividad de una PCR o de una determinación de Acs IgM a-CMV no conduce a diferenciar si se trata de una infección congénita o perinatal (lo más frecuente y con escasas repercusiones, por otra parte). Si se dispone de

sueros maternos obtenidos durante la gestación y tras el parto, es posible que nos aclaren la situación, pero sólo si se demuestra seroconversión o presencia de Acs IgM a-CMV en la gestación (confirma la adquisición congénita) o la seronegatividad tras el parto (la excluye).

6.4. HERPESVIRUS HUMANOS TIPO 6 y 7

El **Herpesvirus Humano tipo 6** (HHV-6) fue aislado por primera vez a partir de linfocitos de sangre periférica en pacientes con síndromes linfoproliferativos, 2 de ellos coinfectados con el HIV-1. Se diferencian 2 subespecies o variantes denominadas, respectivamente, A y B. El HHV-6 es un *virus linfotrópico y citopático* que ha sido implicado en numerosos cuadros clínicos y también como cofactor en la progresión del SIDA. Actualmente, se lo considera el agente etiológico del *exantema súbito (roseola infantum)*, la manifestación clínica de la *infección primaria*. También es responsable de hepatitis activa en pacientes con un cuadro semejante a la mononucleosis infecciosa. No está clara su implicación en otros cuadros como el síndrome de fatiga-crónica, diversos síndromes linfoproliferativos, encefalitis, etc. Tras la infección primaria (en la primera infancia), el HHV-6 persiste en diversas células y tejidos, como las glándulas salivales. Es muy probable que la saliva ocupe un papel central en la transmisión. La consecuencia final es la elevada seroprevalencia en los adultos (> 70%).

En **pacientes inmunocompetentes**, el cuadro clínico más frecuente asociado a HHV-6 es el *exantema súbito en niños* y, muy raramente, el síndrome mononucleósido y la hepatitis. En muchos casos, la confirmación diagnóstica es innecesaria. Cuando no es así, se lleva a cabo por serología, mediante técnicas de IFI y de EIA. La aparición de *Acs IgM a-HHV-6* se asocia a la fase aguda de la infección. Los *Acs IgG a-HHV-6* aparecen algo después, siendo diagnósticas la seroconversión o la presencia de títulos elevados en una sola muestra.

En **pacientes inmunodeprimidos**, la infección por HHV-6 puede diagnosticarse por serología en ciertos casos, siguiendo los criterios anteriores. A causa de la escasa respuesta de Acs que puede presentarse en estos pacientes, es posible que debamos recurrir a otras técnicas, como la amplificación por PCR sobre suero, plasma o LCR.

El **Herpesvirus Humano tipo 7** (HHV-7) se aisló en 1989 a partir de linfocitos de sangre periférica, en condiciones de activación de células T, células para las que presenta tropismo. Presenta homología genómica con el HHV-6, lo que determina reacciones cruzadas entre ambos virus, pero no protección de uno frente al otro. La seroprevalencia es muy elevada (> 80%) en adultos. El HHV-7 se ha aislado de saliva en un porcentaje elevado de adultos sanos seropositivos, lo que indica que es un habitante frecuente en esta localización y permite delinear sus mecanismos de transmisión aunque representa una dificultad añadida a la hora de conocer su significación clínica. Se le ha implicado en el síndrome de fatiga crónica, así como en algunos procesos febriles y en cuadros exantemáticos infantiles. Así, al no estar bien definida su significación clínica, *no se recomienda su investigación rutinaria*.

6.5. VIRUS EPSTEIN-BARR

6.5.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EBV

La *infección primaria* por EBV es habitualmente asintomática en la infancia, mientras que se manifiesta como *mononucleosis infecciosa (MI)* en dos terceras partes de los adolescentes. Además, el EBV está implicado cada vez más en la patogénesis de diferentes *neoplasias*, como son la forma endémica del linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y los síndromes linfoproliferativos postrasplante. También se han relacionado los linfomas tipo Hodgkin y no-Hodgkin del SNC en SIDA. Recientemente se le ha implicado en la patogénesis de tumores de músculo liso en inmunodeprimidos y en carcinoma gástrico.

La infección se adquiere por transmisión oral (saliva) y, tras una fase de multiplicación en las células de la orofaringe, se produce la infección de los linfocitos B, en los que se inicia una fase de latencia. En los ciclos líticos se produce replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos virus, mientras que en fase de latencia se producen sólo algunas proteínas y no se desarrollan viriones. En la fase de latencia, el EBV inmortaliza a las células infectadas lo que podría intervenir en la patogénesis de algunos tumores.

6.5.2. DIAGNÓSTICO DE MI

Característicamente, la MI se presenta con un cuadro febril de magnitud variable de varios días de duración (2 a 3 semanas), faringitis asociada a exudado en ~30% de los casos y adenopatías cervicales anteriores y posteriores. Durante la fase prodrómica se observa decaimiento, anorexia, fatiga, cefalea y fiebre. Los síntomas alcanzan habitualmente su mayor intensidad al final de la 1ª semana y declinan progresivamente durante las próximas semanas (1-3 semanas). La frecuencia de esplenomegalia es variable con detección al examen físico en más de 17% de los pacientes y en estudios por imágenes en cerca de 100%. El exantema ocurre en aproximadamente en 5% de los pacientes pudiendo ser de tipo macular, petequial, escarlatiniforme, urticarial o eritema multiforme.

Los pacientes afectados presentan *linfocitosis* >50% y un *recuento de linfocitos atípicos (células irritativas)* >10%. Sin embargo, la sensibilidad de estos criterios es limitada y no supera el 66 y 74%, respectivamente. La especificidad es cercana a 80 y 90%, respectivamente. Más de 50% de los casos tiene *neutropenia* y otro 3% presenta *anemia hemolítica*, en ambos casos de tipo leve.

La infección aguda por EBV se establece en linfocitos B, provocando la estimulación y producción de una diversidad de Acs dirigidos contra el propio EBV y otros antígenos no relacionados tales como eritrocitos de otras especies mamíferas (sin exposición previa), o plaquetas. Los Acs dirigidos a antígenos de otras especies se denominan *Acs heterófilos* y pueden ser detectados mediante pruebas de aglutinación utilizando eritrocitos de cordero (*reacción de Paul-Bunnell*) o mediante una diversidad de sistemas comerciales que utilizan pruebas de aglutinación con eritrocitos o partículas de látex. Los preparados disponibles difieren en su sensibilidad y especificidad,

presentando en general la mejor la sensibilidad con eritrocito de caballo. Estos Acs aparecen progresivamente durante la primera semana de enfermedad por lo que su positividad es mayor después de este período (Figura 27). Los falsos positivos son infrecuentes y explicados por casos de linfoma, hepatitis viral o enfermedades autoinmunes. *La determinación de Acs heterófilos es precoz y sensible en la MI, pero no específica, y tiene el inconveniente de ser negativa al menos en un 50% de los niños menores de 5 años, lo cual hace que se requiera la detección de Acs contra antígenos específicos. Los Acs heterófilos aparecen en el 90% de los enfermos adultos con MI por EBV.* Por lo tanto, la presencia de linfocitosis > 50%, linfocitosis atípica > 10% y Acs heterófilos positivos mediante cualquier técnica disponible, permiten reconocer acertadamente los casos de MI (Figura 27).

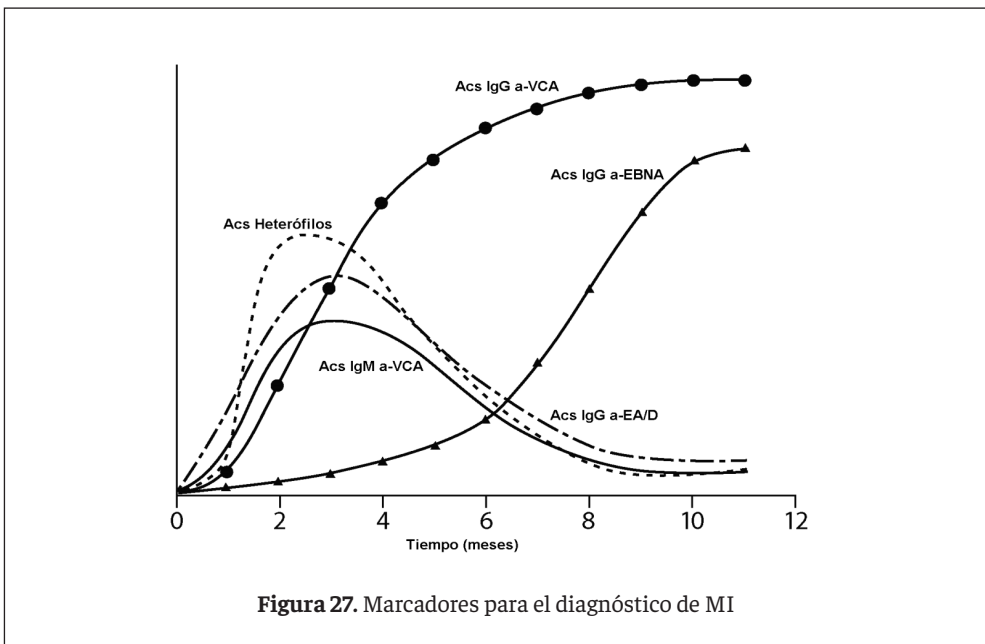


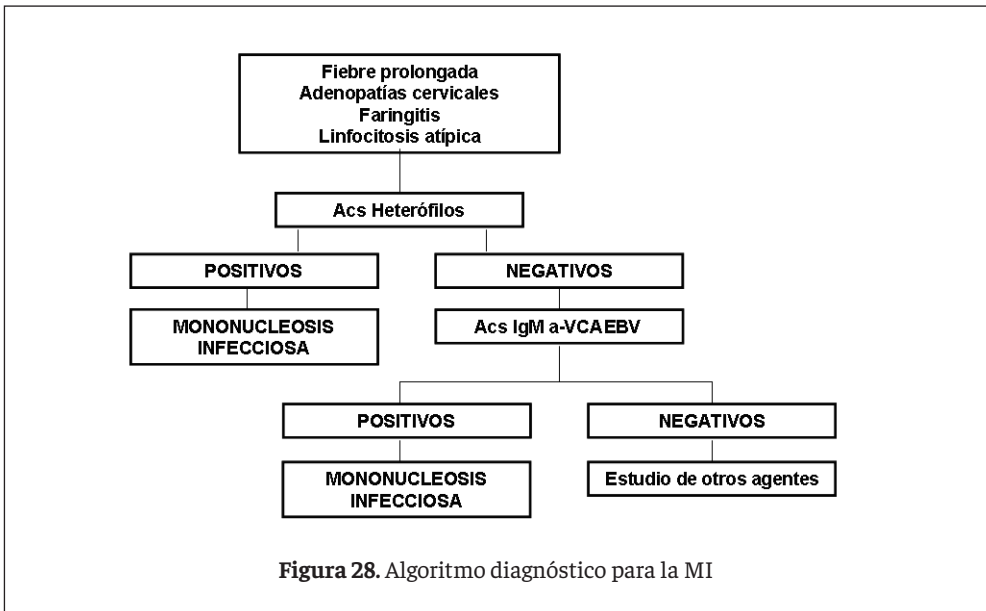
Figura 27. Marcadores para el diagnóstico de MI

Los Acs IgM contra el antígeno de la cápside viral (Acs IgM a-VCA) se desarrollan durante el período de incubación y están presentes al inicio de la enfermedad. *En casos de Acs heterófilos negativos, la solicitud de Acs IgM a-VCA permite detectar un porcentaje adicional de casos.*

Para confirmar en forma inequívoca un cuadro agudo de MI, la presencia de Acs IgM a-VCA debe estar asociada a la ausencia de Acs contra los antígenos nucleares del EBV (Acs a-EBNA) y presencia de Acs IgG contra los antígenos tempranos patrón difuso (Acs a-EA/D). La infección antigua para EBV se establece principalmente por la detección de Acs IgG a-VCA asociada a la presencia de Acs a-EBNA.

La ausencia de Acs heterófilos y de Acs IgM a-VCA, permite descartar razonablemente MI

por EBV y obliga a plantear otra etiología, principalmente el **síndrome mononucleósido por CMV**. Este síndrome afecta a adolescentes y adultos, aunque se presenta en un rango más amplio de edad y más del 40% de los casos ocurre a partir de los 30 años. La presencia de faringitis, adenopatías o esplenomegalia es infrecuente. La fiebre habitualmente es más prolongada y en algunos casos puede alcanzar los 4 meses de duración. Aproximadamente el 30% de los casos de MI no asociados a EBV son provocados por CMV (5-7%). El diagnóstico de *síndrome mononucleósido por CMV* debe plantearse en aquellos casos donde se ha descartado una infección aguda por EBV (Figura 28).



La **IFI** es el procedimiento recomendado para la detección de Acs IgG e IgM a-VCA, Acs IgG a-EA/D, Acs IgG a-EA/R y Acs IgG a-EBNA. Se ha desarrollado diversos **EIAs** para la detección de estos Acs a-EBV específicos mencionados anteriormente. Unos emplean extractos crudos de células infectadas por el EBV o proteínas virales purificadas mediante cromatografía de afinidad como antígenos de la reacción, y otras proteínas recombinantes o péptidos sintéticos.

6.5.3. DETECCIÓN DEL EBV EN NEOPLASIAS

En las *neoplasias asociadas al EBV* pueden ser útiles las *pruebas serológicas*, las *técnicas de inmunohistoquímica* y los *métodos de biología molecular*. Todas ellas tropiezan con la dificultad de la alta prevalencia de la infección y con la necesidad de cofactores externos para desarrollar su capacidad transformante.

En el *linfoma de Burkitt*, el *carcinoma nasofaríngeo* y en pacientes inmunodeprimidos se encuentran títulos altos de Acs a-VCA y a-EA. La respuesta de Acs a-EA está dirigi-

da al EA/R en el linfoma de Burkitt y en los individuos inmunodeprimidos, y contra al EA/D en el carcinoma de nasofaringe.

La mayor parte de los enfermos con *carcinoma nasofaríngeo* desarrollan respuesta de Acs de clase IgA a diferentes proteínas del EBV. Las pruebas serológicas más utilizadas en el carcinoma de nasofaringe son la determinación de Acs IgA a-VCA y a-EA, presentando la primera una sensibilidad cercana al 100% y la segunda una especificidad también cercana al 100%. El carcinoma nasofaríngeo es uno de los tumores más fácilmente tratables si se realiza un diagnóstico precoz por lo que, dada la fiabilidad de las determinaciones serológicas, se está realizando detección en masa en las zonas endémicas de este tumor.

La *PCR para detectar el ADN-EBV* posee escasa aplicación diagnóstica en la práctica diaria. Se ha utilizado para la investigación de la implicación patogénica en determinados procesos linfoproliferativos y para confirmar su papel en otros ya conocidos, así como para diferenciar los subtipos virales. Es posible detectar ADN viral en los linfocitos de pacientes seropositivos sin enfermedad por el EBV. La asociación entre síntomas y cantidad de genomas del EBV presentes en la muestra, fundamentó la utilidad de las técnicas cuantitativas de PCR para el seguimiento de pacientes posttrasplantados. Está pendiente de confirmación el empleo de la PCR como marcador precoz en los síndromes linfoproliferativos asociados al EBV. En estos momentos, la aplicación queda técnicamente establecida en el diagnóstico de la afectación del sistema nervioso central en pacientes con SIDA a partir de muestra de LCR y en muestras de tejido procedentes de tumores para la detección del ARNm de proteínas tempranas de la replicación del EBV.

6.6. HERPESVIRUS HUMANO TIPO 8 (HHV-8)

6.6.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección por HHV-8 es asintomática en la mayoría de los casos pero puede progresar a diversos trastornos linfoproliferativos. La epidemia de HIV-1 evidenció la aparición frecuente de un tumor angioproliferativo de la piel, denominado **Sarcoma de Kaposi** (SK), en los individuos infectados. Esto condujo al descubrimiento de un nuevo herpesvirus, que posteriormente se demostró que se asociaba con todas las formas clínico-epidemiológicas de SK. El virus se caracterizó rápidamente como asociado a los herpesvirus y fue clasificado como el HHV-8. Pronto se reconoció también que estaba asociado con algunos tipos poco frecuentes de linfomas en pacientes con SIDA: el *linfoma primario de cavidades* (PEL) y la *enfermedad de Castlemán* (MCD).

Actualmente, el diagnóstico del SK requiere de una evaluación clínica e histológica, **demostrando la infección de HHV-8 en la lesión por técnicas moleculares**. Se utiliza la amplificación de genes K, específicos del virus. La sensibilidad es fundamental ya que el virus se encuentra en bajo número de copias debido a su estado de latencia. La mayoría de los reportes indican sensibilidades de 1-100 copias/reacción.

Los métodos utilizados para **la detección de Acs a-HHV-8** abarcan EIA e IFI. Sin embargo, como no todas las personas infectadas presentan todos los Acs a-HHV-8 al mismo tiempo existe falta de concordancia entre los ensayos serológicos. Este fenómeno de reactividad parcial a Acs es mucho más aparente en poblaciones con bajo riesgo de infección, como dadores de sangre.

Bibliografía

- Cole S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nurs Clin North Am* 2020;55(3):337-345.
- Omarova S, Cannon A, Weiss W, Bruccoleri A, Puccio J. Genital Herpes Simplex Virus-An Updated Review. *Adv Pediatr* 2022;69(1):149-162.
- Samies NL, James SH. Prevention and treatment of neonatal herpes simplex virus infection. *Antiviral Res* 2020;176:104721.
- Hammad WAB, Konje JC. Herpes simplex virus infection in pregnancy - An update. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2021;259:38-45.
- Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(3):281-290.
- Nagel MA, Niemeyer CS, Bubak AN. Central nervous system infections produced by varicella zoster virus. *Curr Opin Infect Dis* 2020;33(3):273-278.
- Gershon AA, Breuer J, Cohen JL, Cohrs RJ, Gershon MD, Gilden D, Grose C, Hambleton S, Kennedy PG, Oxman MN, Seward JF, Yamanishi K. Varicella zoster virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15016.
- Schmader K. Herpes Zoster. *Ann Intern Med* 2018;169(3):ITC19-ITC31. Erratum in: *Ann Intern Med* 2018;169(7):516.
- Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr* 2017;43(1):38.
- Leber AL. Maternal and congenital human cytomegalovirus infection: laboratory testing for detection and diagnosis. *J Clin Microbiol* 2024;62(4):e0031323. Erratum in: *J Clin Microbiol* 2024;62(9):e0116424.
- Limaye AP, Babu TM, Boeckh M. Progress and Challenges in the Prevention, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2020;34(1):e00043-19.
- Leung AKC, Lam JM, Barankin B. Infectious Mononucleosis: An Updated Review. *Curr Pediatr Rev* 2024;20(3):305-322.
- Le J, Durand CM, Agha I, Brennan DC. Epstein-Barr virus and renal transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2017;31(1):55-60.
- Ru Y, Chen J, Wu D. Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) after hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2018;101(3):283-290.
- Baldwin KJ, Cummings CL. Herpesvirus Infections of the Nervous System. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2018;24(5, Neuroinfectious Disease):1349-1369. Doi: 10.1212/CON.0000000000000661
- Iftode N, Rădulescu MA, Aramă ȘS, Aramă V. Update on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) - review. *Rom J Intern Med* 2020;58(4):199-208.
- Cano P, Seltzer T, Seltzer J, Peng A, Landis J, Pluta L, Dittmer DP. Viral Load Measurements for Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV/HHV8): Review and an Updated Assay. *J Med Virol* 2024;96(12):e70105.

Capítulo 7

ERUPTIVAS VIRALES

Micaela **Cámpora**
 María Alejandra **Sánchez**
 Diego **Chouhy**
 Germán R. **Perez**

GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES ERUPTIVAS CAUSADAS POR VIRUS

El **exantema** es una erupción eritematosa difusa, de extensión y distribución variable, habitualmente autolimitada, formada por lesiones de características morfológicas variables (máculas, pápulas, vesículas o pústulas). Las principales enfermedades relacionadas a los exantemas víricos se detallan en la Tabla 9.

TABLA 9. ENFERMEDADES EXANTEMÁTICAS MÁS FRECUENTES

ENFERMEDAD	CARACTERÍSTICAS	ETIOLOGÍA
SARAMPIÓN (1° ENFERMEDAD)	Exantema generalizado maculopapular morbiliforme rojizo confluyente. Progresión cráneo-caudal. Descamación fina.	Virus del Sarampión (Familia <i>Paramyxoviridae</i> Género <i>Morbillivirus</i>)
RUBEOLA (3° ENFERMEDAD)	Exantema generalizado MP confluyente. Progresión cráneo-caudal. De 3 días de duración.	Virus de la Rubeola (Familia <i>Matonaviridae</i> Género <i>Rubivirus</i>)
ERITEMA INFECCIOSO (5° ENFERMEDAD)	Rubefacción facial en ambas mejillas (1° fase). Exantema reticular generalizado con mayor extensión en brazos, muslos y nalgas (2° fase).	Parvovirus B19 (Familia <i>Parvoviridae</i> Género <i>Erythroparvovirus</i>)
EXANTEMA SÚBITO (6° ENFERMEDAD)	Exantema generalizado macular o maculopapular morbilliforme rosado tenue con afectación principal en tronco.	Herpesvirus Humano tipo 6 Herpesvirus Humano tipo 7 (Familia <i>Herpesviridae</i>)
EXANTEMA ENTEROVÍRICOS	Exantema macular o MP y descendente, peteiquial o purpúrico, generalmente con afectación palmo-plantar.	Virus Coxsackie y Echovirus (Familia <i>Picornaviridae</i> Género <i>Enterovirus</i>)
VIRUELA SÍMICA	Lesiones profundas y delimitadas con umbilicación central y progresión de la lesión (similar a la lesión herpética).	Virus mpox (Familia <i>Poxviridae</i> Género <i>Orthopoxvirus</i>)

Los exantemas virales generalmente suelen ser la manifestación de una primoinfección. Su aparición puede preceder de una serie de síntomas generales (fiebre, artralgias o adenopatías). Aunque la clasificación de estos exantemas no es fácil puede realizarse en base a las características clínicas de las lesiones (TABLA 10).

El carácter benigno y autolimitado de la mayoría de las enfermedades virales exantemáticas, hace que habitualmente no sea fundamental conocer de forma precisa el virus causante. Sólo en determinadas situaciones concretas, como el embarazo, la inmunosupresión o situaciones de riesgo, puede ser necesario identificar el agente etiológico responsable.

TABLA 10. AGENTES VIRALES SEGÚN EL TIPO DE LESIÓN EXANTEMÁTICA	
ERITEMATOSA	ADV, CMV, EV, EBV, HSV-1, PV-B19, Virus de la Rubeola (RbV)
PETEQUIAL	ADV, EV, HBC, virus del Sarampión.
HEMORRÁGICO	Virus Junín, Virus Ébola, Hantavirus.

El mecanismo por el cual aparecen los exantemas en el curso de las infecciones víricas puede ser variado. Actualmente se consideran fundamentalmente 3 posibles mecanismos patogénicos diferentes:

1. **Invasión directa de la piel por vía hematógena** (varicela, viruela y algunas infecciones por enterovirus). Puede producir un “rash” incluso en ausencia de respuesta inmune por parte del hospedero. En estos casos, las lesiones suelen ser vesiculosas o incluso ulcerosas.
2. **Interacción entre el propio virus y la respuesta inmune** (sarampión, rubéola). En estos casos, puede aislarse el virus a partir de la piel, aunque intervengan factores inmunológicos en la aparición del exantema.
3. **Presencia de anticuerpos circulantes** (infección por PV-B19) sin que sea precisa la presencia del virus causante en la piel.

7.1. PARVOVIRUS B19

En 1985 se demostró que el Parvovirus B19 (PV-B19) es el agente etiológico responsable del **Eritema Infeccioso** (EI), megaloeritema epidémico o “quinta enfermedad”.

El PV-B19 es un virus desnudo de simetría isométrica con genoma de ADN monocatenario lineal no segmentado de 5,6 Kb. Según la nueva clasificación del ICTV, el PV-B19 está incluido en el género *Erythrovirus* de la familia *Parvoviridae*.

En la actualidad, el espectro de cuadros clínicos en los que se implica al PV-B19 se ha ampliado, e incluye: producción de abortos o hidropesía fetal no inmune, artritis, anemia crónica en individuos inmunodeprimidos, crisis aplásica transitoria, eritroblastopenia transitoria de la infancia, púrpura vascular, púrpura trombocitopénica, hemofagocitosis, encefalitis, miocarditis, costochondritis, linfadenitis mesentérica, gastroenteritis aguda, pseudoapendicitis, vasculitis aguda, poliarteritis nudosa, queratolisis exfoliativa, bronquitis, bronquiolitis, laringitis, síndrome de *distress* respiratorio y otros.

La primoinfección ocurre más frecuentemente entre 5-15 años (70%); sólo un 10% de los casos tiene lugar en edades inferiores y un 20% en superiores. La prevalencia aumenta desde el 2-10% en niños < 5 años, el 40-60% en los adultos y > 90% en los ancianos.

Las infecciones por PV-B19 son, en su mayoría, asintomáticas. En contagios demostrados serológicamente, sólo el 35% presentó manifestaciones clínicas.

El mecanismo de transmisión es, fundamentalmente, a través de las secreciones respiratorias, de persona a persona, tras contacto íntimo. Sin embargo, los altos niveles de viremia que se alcanzan durante la infección, incluso en individuos asintomáticos, hacen posible la transmisión a través de transfusiones sanguíneas y de inmunocomponentes (factores VIII y IX, albúmina e incluso inmunoglobulinas). La frecuencia de viremia a títulos altos en donantes oscila entre 1/20.000 - 1/40.000 unidades de sangre durante un período epidémico, por lo que resulta poco común esta fuente de infección. Es importante conocer que, cuando están presentes las manifestaciones clínicas, ya no existe riesgo de contagio.

7.1.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Gracias al estudio realizado por Anderson en voluntarios pediátricos, a los que inoculó el virus por vía intranasal, se conocieron los cambios clínicos, hematológicos, virológicos y serológicos asociados a la infección por PV-B19 (Figura 29).

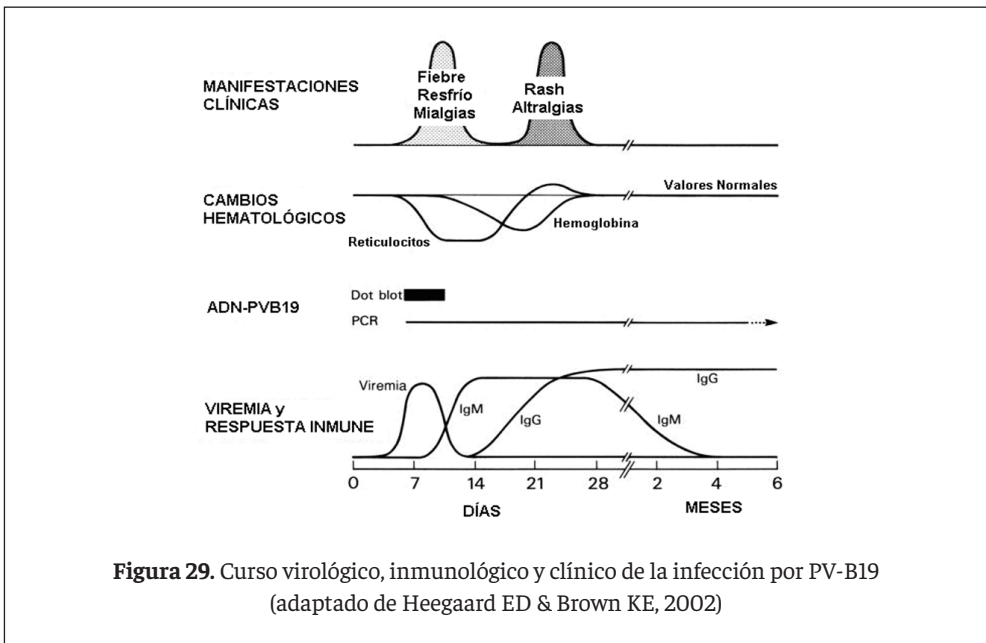


Figura 29. Curso virológico, inmunológico y clínico de la infección por PV-B19 (adaptado de Heegaard ED & Brown KE, 2002)

En la **infección aguda por PV-B19**, tras el período de incubación, que oscila entre 5-15 días, se presenta una *primera fase* que dura de 3-10 días cuyos síntomas clínicos son inespecíficos y relacionados con la viremia, como fiebre, malestar, escalofríos, adeno-

patías, faringoamigadalis y cefalea. Los parámetros hematológicos (hemoglobina, leucocitos, reticulocitos y trombocitos) disminuyen, aunque generalmente sin trascendencia clínica. El examen de médula ósea revela la presencia de proeritroblastos gigantes vacuolados característicos. La viremia se detecta al 6º día tras la inoculación, es máxima al 9º y desaparece hacia el día 16. Los Acs IgM específicos son positivos en el 90% de los casos a los 2-3 días del comienzo de los síntomas. En esta primera etapa de viremia es cuando también se produce la eliminación respiratoria del virus, detectándose el mismo en faringe, y por consiguiente, es cuando el enfermo se encuentra en el período de máxima contagiosidad (Figura 30A).

Una *segunda fase*, que aparece pasados 7-15 días de la primera, se caracteriza por la presencia de una erupción maculo-papular pruriginosa, con o sin artralgia. Los parámetros hematológicos se recuperan, especialmente los reticulocitos, y serológicamente se detectan Acs IgM e IgG específicos. Con la aparición de la erupción o la artralgia desaparece la infectividad del enfermo (Figuras 29 y 30A).

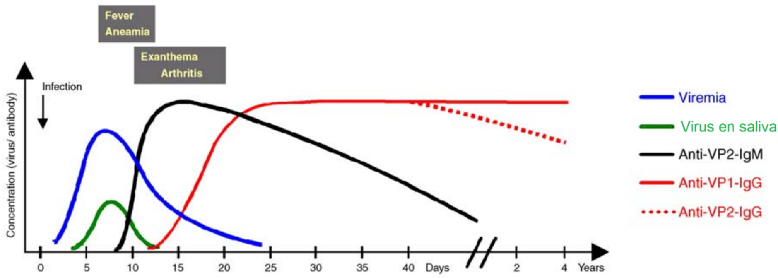
En la **infección persistente por PV-B19**, la viremia puede continuar durante varios meses y años después de la infección aguda con niveles de 10^3 a 10^6 copias/ml en sangre o líquido sinovial. En pacientes inmunocompetentes con infecciones persistentes, los Acs IgG específicos a-VP1 y a-VP2 se pueden detectar preferentemente en combinación con los Acs a-NS1 (Figura 30B). Por lo general, la producción de los Acs a-NS1 sigue a la de los Acs IgG a-VP1/VP2 y comienza aproximadamente entre 3 y 4 semanas después de la infección.

Desde la aplicación de la PCR, se sabe que, en la fase aguda, se alcanzan concentraciones superiores a 10^{12} partículas virales/ml de sangre, que bajan drásticamente en el periodo de convalecencia (10^3 - 10^4 /ml) pero que pueden mantenerse a niveles detectables, incluso en los inmunocompetentes, durante periodos prolongados de tiempo (hasta 164 semanas) aún en presencia de IgG y ausencia de IgM y síntomas. Se desconoce si la persistencia del virus depende de factores del hospedero o del mismo virus, y si estas partículas son infecciosas.

En la patogenia de la enfermedad están involucrados 2 mecanismos diferentes que darán lugar a las diversas manifestaciones clínicas:

- **Primer mecanismo:** resultado de la *citotoxicidad del virus* sobre las células precursoras eritroides. Tras la unión de la cápside viral con el antígeno P de las células eritroides, se producen grandes inclusiones intranucleares, con condensación cromática y vacuolización citoplasmática que indican apoptosis.
- **Segundo mecanismo:** condicionado por la *respuesta inmune del hospedero*, de manera que el exantema y las artralgias son el resultado de la formación de inmunocomplejos.

A. Parámetros serológicos en infecciones agudas por PV-B19



B. Parámetros serológicos en infecciones persistentes por PV-B19

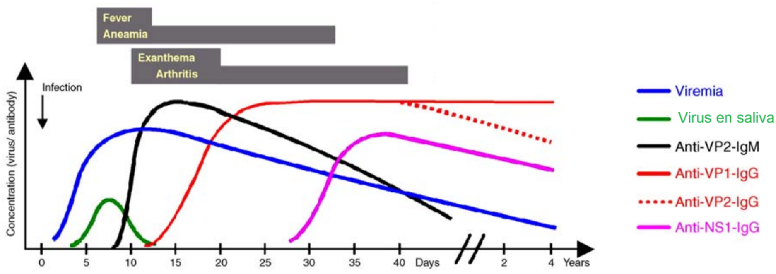


Figura 30. Parámetros serológicos en infecciones agudas (A) o persistentes (B) por PV-B19 (adaptado de von Landenberg P et al, 2007)

7.1.2. INFECCIÓN EN LOS PACIENTES INMUNOCOMPETENTES

El EI o quinta enfermedad es la principal y más común manifestación de la infección por PV-B19 propia de los niños en edad escolar. Constituye una entidad benigna y es moderadamente contagiosa. Tras los síntomas iniciales inespecíficos, aparece una erupción eritematosa en las mejillas (signo del cachetazo) y un exantema tipo “encaje” que afecta a tronco y extremidades que generalmente respeta las palmas y las plantas. El exantema es pruriginoso hasta en un 70% de los casos y se resuelve en 2 semanas, aunque puede persistir durante meses e incluso recurrir. El proceso no requiere tratamiento. Las complicaciones son raras: artritis, anemia hemolítica, neumonitis, signos de encefalopatías y otros.

En los adultos (Figura 31A), los síntomas constitucionales (cefaleas, dolor faríngeo, mialgias, artralgias y molestias gastrointestinales) son más frecuentes y graves. Aunque también pueden presentar los síntomas clásicos del EI, los adultos son más pro-

pensos a la artropatía, principalmente de muñecas, tobillos y rodillas. Se ha descrito descamación palmar y plantar asociada a la artritis y en el 50% de los casos prurito en los dedos de las manos y pies. En algunos enfermos, especialmente en las mujeres, los signos artríticos duran meses e incluso años.

El PV-B19 ha sido identificado como causa de miocarditis y pericarditis en niños y adultos, siendo incluso causante del rechazo de un trasplante cardíaco; también se le ha implicado en algún caso de hepatitis y de síndrome de fatiga crónica.

7.1.3. INFECCIÓN DURANTE EL EMBARAZO

La infección por PV-B19 en la embarazada con pérdida fetal puede ocurrir aún en ausencia de síntomas maternos. La necesidad de una mayor producción de hematíes y la incapacidad del sistema inmune fetal para controlar la infección ocasiona una eritroblastosis fetal con el consiguiente aborto o hidropesía fetal no inmune. La **hidropesía fetal no inmune** es el cuadro clínico considerado actualmente como la principal manifestación de la infección por PV-B19 en la embarazada. Los estudios de prevalencia demuestran que entre el 25-75% de las embarazadas son seropositivas. La tasa de transmisión vertical ronda el 30% y la incidencia de pérdida fetal oscila, según los estudios, entre el 1,7 y el 9%.

Consecuencias de la infección por PV-B19 según el trimestre de gestación:

- **Infección en el 1° trimestre de gestación:** corresponde al periodo de mayor mortalidad, ya que los Acs maternos transferidos pasivamente al feto son insuficientes para eliminar el virus, que continúa replicándose durante semanas. Esto conduce al aborto a las 4-6 semanas de la infección materna, generalmente en el 3° o 4° mes de gestación.
- **Infección en el 2° trimestre de gestación:** se asocia predominantemente a **hidropesía fetal no inmune**. La aplasia de las células precursoras eritroides provoca una anemia grave con fallo cardíaco, edema generalizado e incluso la muerte del feto, que se produce tardíamente tras varias semanas de la infección materna (hasta 12 semanas). Algunos autores, además de la anemia, apuntan a la existencia de otros mecanismos: lisis eritrocitaria, miocarditis y afectación hepática como causas de la hidropesía y muerte. Se ha comprobado una elevación tanto de la alfa-fetoproteína materna como de la gonadotropina coriónica materna en el caso de una afectación fetal por el PV-B19. Sin embargo, ninguno de los 2 parámetros ha demostrado ser un marcador útil para evaluar la mala evolución del feto. Los exámenes periódicos por ultrasonidos pueden ser de utilidad para demostrar el edema fetal y la ascitis, incluso siete semanas antes de la muerte fetal. Conviene destacar que no todos los casos de hidropesía conducen a la pérdida fetal. En efecto, publicaciones recientes describen casos de fetos hidróticos con infección confirmada por PV-B19 que curaron espontáneamente.
- **Infección en el 3° trimestre de gestación:** muy excepcionalmente supone riesgo para el feto.

7.1.4. INFECCIÓN EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS

Aquellos pacientes que presentan anemia hemolítica crónica, ya sea hereditaria o adquirida (anemia de células falciformes, talasemia, esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica autoinmune, déficit de piruvato quinasa, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de HEMPAS), e incluso anemia por déficit de hierro y vitaminas, o por pérdida aguda de sangre, pueden presentar un cuadro de *crisis aplásica transitoria* (CAT) por PV-B19. Al igual que en el feto, la mayor necesidad de producción eritrocitaria da lugar a una infección masiva de las células precursoras nucleadas, con el consiguiente bloqueo en la eritropoyesis (Figura 31B).

Los síntomas son los relacionados con la anemia aguda (palidez, debilidad, letargia) y generales, compatibles con los de un síndrome pseudogripal. Hay reticulocitopenia periférica, disminución de la hemoglobina, neutropenia, trombocitopenia e incluso pancitopenia. El examen de médula ósea revela proeritroblastos gigantes vacuolados. Los parámetros hematológicos se recuperan en unas 3 semanas e incluso en algunos individuos se recuperan posteriormente la aparición del exantema. **El episodio de CAT es único en la vida**, ya que la adquisición de IgG neutralizantes protege de futuras re-infecciones.

Aunque la presentación puede ser esporádica, son más frecuentes los brotes epidémicos de CAT por PV-B19, que coinciden con los de EI en el resto de la población. En ocasiones, la infección puede presentarse en enfermos hematológicos sin producir crisis, mientras que otras veces se llega al diagnóstico de una anemia de base, previamente desconocida, tras la presentación de un episodio de CAT.

7.1.5. INFECCIÓN EN PACIENTES CON HIV/SIDA O INMUNODEFICIENCIAS CONGÉNITAS

Desde que en 1987 se detectara un caso de infección por el PV-B19 en un niño con síndrome de Nezelof (producción deficiente de linfocitos T originada por la ausencia de la enzima purina nucleosido fosforilasa), se han ido incrementando las publicaciones en otras inmunodepresiones congénitas, así como en pacientes con infección por HIV-1, leucemias, trasplantados y enfermedades malignas. En todos ellos se produce una infección persistente por PV-B19 con supresión de la médula ósea, manifestándose como una anemia crónica con o sin neutropenia o trombocitopenia, en general, anemia pura de serie roja (Figura 31C). Cabe destacar que, en estos enfermos, generalmente no se evidencia exantema ni artralgia.

La viremia puede persistir durante meses e incluso años a títulos bajos, mientras que las manifestaciones clínicas parecen asociadas a viremias medias-altas o a incrementos en la CV ($>10^7$ copias de genoma/ml).

Aunque la viremia en estos pacientes no alcanza los niveles detectados en los casos de CAT, se aconseja también el aislamiento respiratorio.

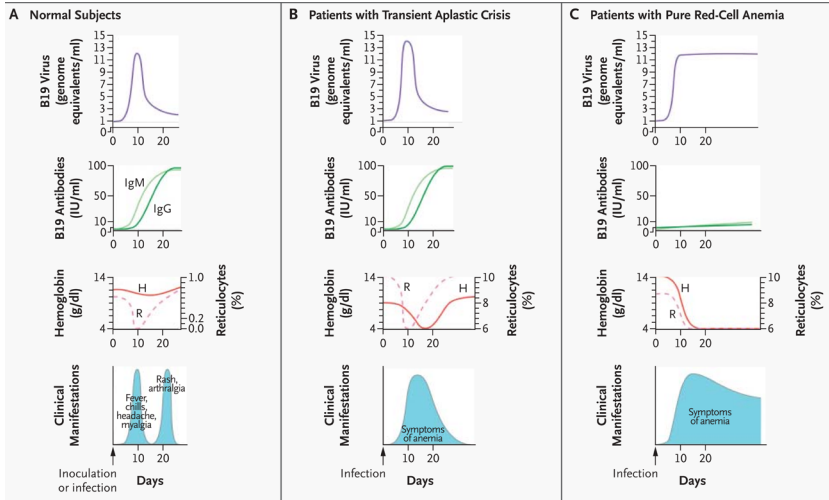


Figura 31. Curso virológico, inmunológico y clínico para la CAS y anemia por PV-B19 (tomada de Young NS and Brown KE, 2004)

7.1.6. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El diagnóstico de la infección por PV-B19, resuelve gran número de exantemas atípicos, síndromes mononucleósicos y artropatías, además de identificar los casos de EI. La detección de Acs específicos es el sistema habitual para el diagnóstico de la infección reciente, estado inmune o estudios de seroprevalencia, pero no siempre es de utilidad en los casos de infección persistente en los individuos inmunodeprimidos y en la afectación fetal.

El diagnóstico serológico de la infección por el PV-B19 puede realizarse principalmente mediante IFI y EIA de captura de IgM o formato indirecto. Los EIA emplean como antígeno la proteína VP2, con o sin VP1 (ambas proteínas se expresan de forma recombinante en *E.Coli*, baculovirus, células de ovario de hámster, entre otros), utilizando generalmente sistemas de captura para los Acs IgM. Para la IFI se utilizan células de insectos infectadas con baculovirus que expresan la VP1.

En los **individuos inmunocompetentes** (Figura 31A), los Acs IgM se detectan ya al 3° día del inicio de los síntomas en el 90% de los casos de EI, alcanzan su pico a las 2-3 semanas y comienzan a declinar en 1-2 meses, desapareciendo a los 3-6 meses (a veces se extiende hasta el mes 9). En caso de sospecha de CAT (Figura 31B), puede requerirse la detección por métodos moleculares del ADN-PV-B19 en plasma. Los Acs IgG aparecen días después de los Acs IgM y siguen detectables de por vida.

En **embarazadas**, la infección por PV-B19 debe investigarse en presencia de sintomatología (exantema, artralgias) o en caso de anomalías ecográficas sugerentes. En este caso se investigará la presencia de Acs IgM e IgG (TABLA 11). La presencia de Acs IgM a-PV-B19 indica infección reciente y se requiere monitorización fetal. En ciertos casos, la determinación de Acs IgM en gestantes con ecografía sugestiva de *hidrops fetal* puede ser negativa en un elevado porcentaje de casos, por lo tanto, es necesario investigar la infección en el feto.

Tabla 11. ACCIONES ANTE EL ESTATUS SEROLÓGICO DE LA EMBARAZADA

Acs IgM	Acs IgG	ESTADO	ACCIÓN
negativo	positivo	Infección pasada	Sin riesgo fetal
positivo	negativo	Infección reciente	Seguimiento fetal con ultrasonido
positivo	positivo		
negativo	negativo	Sin contacto previo	Excluir periodo ventana serológico

En el **feto**, la demostración de anticuerpos IgM en sangre fetal no es fiable, ya que presenta una sensibilidad muy baja. Además, el PV-B19 no crece en cultivo. Por lo que **el diagnóstico prenatal de la infección fetal se basa en la detección del ADN-PV-B19 por PCR en muestras de suero fetal o líquido amniótico.**

En el **recién nacido**, para el diagnóstico neonatal de infección congénita el **mejor método de diagnóstico es la detección de ADN-PV-B19 por PCR en una muestra de sangre del cordón**, que confirma o excluye la infección.

En **pacientes inmunosuprimidos, el uso de técnicas moleculares para la detección de ADN-PV-B19 en muestras de médula ósea** se presenta como una excelente prueba diagnóstica, otorgando además una alta sensibilidad y elevada especificidad. La mayoría de estas técnicas de amplificación del genoma de PV-B19 utilizan el gen NS1 como gen target de amplificación.

7.2. VIRUS DE LA RUBÉOLA

El **virus de la rubéola** (RbV), pertenece al género *Rubivirus dentro de la familia Matonaviridae*. Se trata de un virus envuelto, con simetría isométrica que contiene un genoma de ARN monocatenario lineal con polaridad positiva no segmentado de 9,7 Kb.

Clínicamente, produce un cuadro exantemático agudo en niños y adultos, aunque en la mayoría de los casos se da de forma inaparente. RbV se transmite por contacto con secreciones nasofaríngeas, sobre todo en la primera semana tras la aparición del exantema. Cuando la infección se adquiere en el transcurso del embarazo, principalmente en el primer trimestre de la gestación, puede producir diversas malformaciones congénitas. Estas observaciones fueron descritas por vez primera en 1941 por Sir Norman Gregg, un oftalmólogo australiano quien observó un aumento de casos de catarata congénita tras una epidemia de rubéola.

El desarrollo de técnicas diagnósticas se ha dirigido, según las diferentes manifestaciones clínicas, hacia:

- la determinación de la inmunidad frente a la rubéola.
- el diagnóstico de rubéola postnatal.
- el diagnóstico de la rubéola congénita.

7.2.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA RUBÉOLA

El **aislamiento viral** es difícil y se realiza a partir de secreciones faríngeas, orina, líquido amniótico y placenta, en cultivos de células Vero, RK-13 o AGMK. La presencia del virus se detecta por destrucción completa de la monocapa celular y la confirmación se realiza por neutralización con Acs específicos, IFD o RT-PCR. Su uso como herramienta diagnóstica queda restringido a laboratorios de referencia y a casos de análisis de rubéola congénita en muestras en hisopados nasofaríngeos y sangre del cordón umbilical en el recién nacido.

Las **técnicas EIA** que detectan Acs en la fase inicial de la enfermedad son adecuadas tanto para:

- el diagnóstico de la infección
- conocer el estado inmunitario del paciente

Los Acs de clase IgG pueden durar de por vida, mientras que los Acs de clase IgM suelen detectarse hasta los 2 meses después del comienzo del exantema. En las reinfecciones puede observarse un incremento del título de Acs IgG, o la reaparición, aunque débil, de los Acs IgM. Hay que tener en cuenta la posible reacción cruzada con otros virus (ej: PV-B19, EBV o CMV) que puede originar lecturas con valores bajos de Acs IgM que son falsamente positivos. La medición de la avididad de los Acs por su antígeno permite distinguir una reinfección de una infección aguda.

7.2.2. SITUACIONES QUE REQUIEREN DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR RbV

7.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD FRENTE AL RbV: Se aplica a las gestantes, en edad fértil en las que no se conoce su estado inmunitario y a personas vacunadas para valorar la eficacia de la vacuna. Se realiza mediante técnicas de EIA o IFI que nos permitan detectar Acs IgG a-RbV.

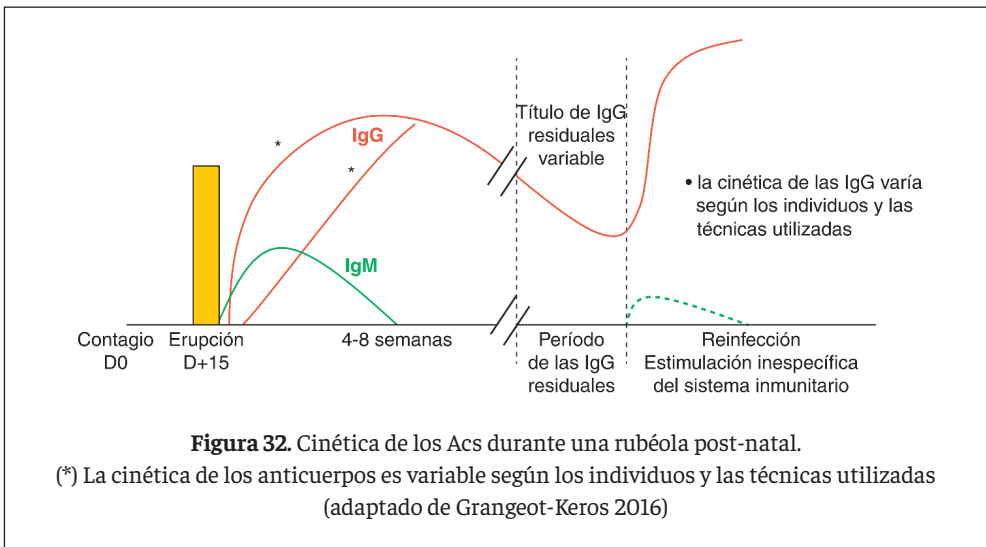
En las mujeres en edad fértil no embarazadas y con serología negativa deberá indicarse la vacunación contra la rubéola, la cual está absolutamente contraindicada en mujeres embarazadas ya que la vacuna contiene virus vivo y atenuado.

7.2.2.2. DIAGNÓSTICO DE LA RUBÉOLA POSTNATAL: Tiene un periodo de incubación de 12 a 23 días y en la mayoría de los casos se desarrolla de forma asintomática. El periodo prodrómico puede durar de 1 a 7 días, con síntomas tan leves que pueden pasar desapercibidos. La fiebre es discreta, con malestar general y cefaleas. El catarro de vías superiores es constante con estornudos y conjuntivitis leve. El enantema (erupción de la superficie mucosa) no es frecuente, pero en el paladar blando puede haber pequeñas manchas rojas de aspecto petequiral (manchas de Forcheimer), que

pueden confluir en una más grande o extenderse a nasofaringe, pero no son patognomónicas. Lo más típico de este periodo es la adenitis retroauricular, cervical posterior y suboccipital.

El periodo exantemático a veces aparece de forma súbita, sobre todo en los niños, y suele durar 3 días. Las adenopatías son de tamaño variable, duras y ligeramente dolorosas a la presión. Las complicaciones no son frecuentes. La artralgia en dedos de las manos, muñecas y rodillas aparece en un tercio de las mujeres y parece estar relacionada con la presencia de inmunocomplejos circulantes, siendo menos frecuentes en los niños y en los hombres. Las reinfecciones por el virus son generalmente asintomáticas y sólo son detectables por un incremento en el título de Acs.

La sospecha de Rubéola Postnatal se produce ante un cuadro de infección aguda exantemática o en la sospecha de contacto en una gestante. Para efectuar correctamente un diagnóstico de infección de rubeola postnatal es conveniente conocer perfectamente la cinética de los Acs (Figura 32). Los Acs IgG a-RbV aparecen, en general, 8 días después de la erupción. Los Acs IgM específicas aparecen en los 3 días siguientes a la erupción y desaparecen, en general, en 4-8 semanas, según los individuos y las técnicas utilizadas. Hay que tener muy en cuenta que en el primer día de la erupción, las IgM están ausentes con mucha frecuencia.



7.2.2.3. DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA CONGÉNITA: Es una enfermedad neonatal por infección crónica del embrión y persistencia del virus en diversos tejidos del feto, hasta varios meses después del nacimiento. Lo más probable es que la rubéola materna provoque en la fase de viremia una infección de las vellosidades coriales o de la placenta y produzca una viremia fetal generalizada. Los efectos del RbV sobre el feto dependen del momento de la infección.

Cuanto más joven es el feto, más severa es la enfermedad:

- el riesgo fetal durante los 2 primeros meses de gestación es del 40 al 60% pudiéndose producir múltiples defectos congénitos y/o aborto espontáneo
- durante el tercer mes de gestación hay un 30-35% de posibilidades de desarrollar un defecto único como sordera o cardiopatía; durante el cuarto mes hay un 10% de riesgo de producir un solo defecto, y a partir de la semana 20 sólo muy rara vez se produce daño fetal (sólo sordera).

Entre las malformaciones congénitas por **acción teratógena del virus** se describen:

- malformaciones cardíacas (persistencia del ductus arterioso, comunicación interventricular, estenosis pulmonar),
- lesiones oculares (opacificaciones de la córnea, cataratas),
- microcefalia con retraso mental, sordera, retraso del crecimiento, meningocele, criptorquidia, hipospadias, etc.

Entre las manifestaciones viscerales se destacan: retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, miocarditis necrosante, neumonía intersticial, diabetes mellitus, panencefalitis esclerosante subaguda, etc.

En ocasiones, algunos niños infectados por el RbV durante la gestación son considerados normales al nacimiento, presentando síntomas de retraso intelectual y motor al alcanzar la edad escolar.

Los niños con rubéola congénita eliminan enormes cantidades de virus en sus secreciones respiratorias, intestinales y orina hasta la edad de 1 o 2 años, con lo que pueden transmitir y mantener la infección. Se da la paradoja de que a pesar de tener altas concentraciones de Acs neutralizantes, siguen eliminando virus durante un periodo de tiempo prolongado. Curiosamente, estos Acs pueden desaparecer transcurridos los 3 ó 4 años, lo que indica que la infección intrauterina, desde el punto de vista inmunológico, es diferente a la adquirida después del nacimiento (Figura 33).

La infección congénita se produce durante la primoinfección de la madre, aunque excepcionalmente se han descrito algunos casos de infección congénita en situaciones de reinfección

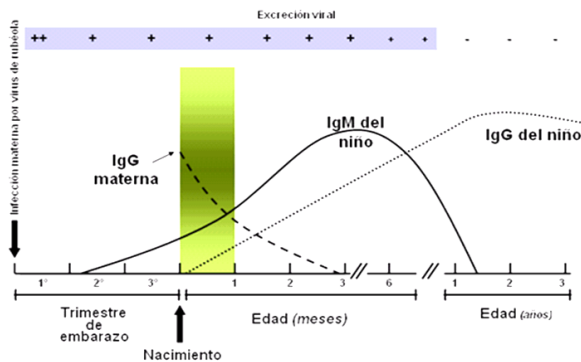


Figura 33. Respuesta inmunitaria del niño con Síndrome de Rubéola Congénita (adaptado de Rosales-Santiago, 2011)

7.2.2.4. DIAGNÓSTICO PRENATAL DE LA RUBEOLA CONGÉNITA: La *presencia de Acs IgM específica en la sangre fetal* indicaría que se ha producido una infección fetal, pero es necesario confirmar que no existe mezcla de la sangre fetal con la materna. Esta prueba tiene su máximo rendimiento sobre la semana 22 de gestación, aunque un resultado negativo no descarta la infección.

Otra alternativa para realizar el diagnóstico de infección fetal es el *estudio del ARN viral en líquido amniótico o de vellosidades coriónicas* mediante RT-PCR entre las semanas 17 y 21 de gestación. En estos procedimientos, además del riesgo en la obtención de la muestra, no siempre se logran resultados confiables sobre la infección del feto, ya que es posible detectar genoma viral aun cuando el feto no fue infectado. En otras ocasiones, por el contrario, puede no detectarse el genoma viral en la placenta de fetos infectados.

DIAGNÓSTICO POSTNATAL DE LA RUBEOLA CONGÉNITA: El CDC publicó en 1985 los criterios necesarios para clasificar un caso como de rubéola congénita. Estos criterios resumidos son los siguientes:

- *la detección al nacimiento de IgM específica en sangre de cordón o en los primeros días de vida extrauterina.* Si el resultado es positivo quedará confirmada la infección.
- *mantenimiento de los títulos de IgG más allá de los primeros 8 meses de vida.* Debido a la transferencia pasiva de IgG a-RbV de la madre al feto se realiza el estudio de la cinética de Acs en los primeros 8 meses posteriores al nacimiento. En este caso, los a-RbV del niño persistirán un mayor tiempo que los a-RbV de la madre.
- *detección de ARN viral en el recién nacido mediante RT-PCR en hisopados nasofaríngeos y sangre del cordón umbilical.*

7.2.2.5. RUBÉOLA EN LA EMBARAZADA: Existen 2 situaciones claramente diferenciadas con planteamientos diagnósticos distintos:

1- Determinación de la inmunidad frente a rubéola en la gestante, sin sospecha clínica ni epidemiológica de padecer la enfermedad. El objetivo de este estudio es conocer si la gestante está protegida de una posible infección por el RbV. Se recomienda *la determinación cualitativa de Acs IgG específicos a-RbV en la primera consulta de control del embarazo.* Se desaconseja expresamente la evaluación cuantitativa de los resultados, ya que no proporciona ninguna información adicional.

Alrededor del 15% de todas las mujeres en edad fértil no tienen inmunidad para la rubéola. Lo ideal sería determinar los anticuerpos IgG a-RbV en todas las mujeres y vacunar antes de embarazarse a aquellas susceptibles. La presencia de Acs refleja contacto previo con el virus, y por tanto inmunidad, haciendo innecesaria la realización de nuevos controles en embarazos sucesivos.

Si la mujer embarazada es seronegativa, deberá adoptar las precauciones necesarias para evitar la exposición al virus y debe ser vacunada frente a la rubéola en el post-parto lo antes posible.

2- Sospecha clínica de infección aguda durante el embarazo. Este caso puede plantearse ante la existencia de una clínica compatible en la embarazada, o por exposición a

un sujeto con infección aguda por RbV. La presencia de Acs IgG e IgM específicas en una paciente nos hace sospechar la presencia de primoinfección, sin embargo, debemos tener en cuenta varios aspectos:

- Los Acs IgM pueden tener reacciones heterólogas entre RbV y otros virus como EBV, CMV, PV-B19 y VS (por reacciones cruzadas o por estimulación policlonal de linfocitos de memoria). Por tanto, es necesario confirmar su presencia, siendo la técnica de EIA de captura la que presenta mejor especificidad y sensibilidad.
- Los Acs IgM pueden aparecer durante las reinfecciones, pero en títulos bajos y durante poco tiempo.
- En un pequeño porcentaje de personas, los Acs IgM puede mantenerse positivos en suero hasta 6 meses. El **estudio de la avidez de la IgG** diferencia si la IgG es de aparición reciente (baja avidez se asocia a infección primaria aguda) o si hay ausencia de infección primaria (IgG de alta avidez). Esta determinación nos puede ayudar a valorar la presencia de IgM y puede facilitar la diferenciación entre primoinfección y reinfección.

Todos los resultados serológicos deben ser interpretados junto con el cuadro clínico de la embarazada, en el caso de que lo haya para poder obtener información concreta sobre la posible fuente de infección.

7.3. VIRUS DEL SARAMPIÓN

El sarampión es una enfermedad altamente contagiosa caracterizada por fiebre, tos y conjuntivitis y posterior aparición de una erupción macopapular generalizada. La introducción del sarampión en poblaciones vírgenes y la transmisión endémica a poblaciones con inadecuado cuidado médico producen altas tasas de mortalidad.

A pesar del desarrollo de una vacuna a virus vivos atenuados exitosa, el sarampión sigue siendo la mayor causa de mortalidad en niños, particularmente en países en desarrollo.

El **virus del sarampión** est incluido en el género *Morbillivirus* de la subfamilia *Orthoparamyxovirinae* en la familia *Paramyxoviridae* según los nuevos criterios taxonómicos del ICTV. Los miembros del género *Morbillivirus* se caracterizan por formar cuerpos de inclusión tanto intracitoplasmáticos como intranucleares en la célula infectada constituidos por estructuras similares a la nucleocápside. La envoltura tiene 2 glicoproteínas de la superficie transmembrana: hemaglutinina (HA), que contiene el sitio de unión al receptor, y la proteína de fusión (F). La nucleocápside tiene simetría helicoidal y contiene el ARN con polaridad negativa de 15,9 Kb y el complejo enzimático P/L que contiene todas las funciones para la replicación y transcripción del genoma. El genoma no es segmentado, lo cual le confiere estabilidad genética.

7.3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

7.3.1.1. SARAMPIÓN CLÁSICO: El Sarampión es típicamente una infección de la infancia diseminada por vía respiratoria. Se caracteriza por un período latente de 10 a 14 días y un período prodrómico de 2 a 3 días de fiebre, tos, y conjuntivitis seguido por una erupción macopapular característica que pueden ser visibles en la mucosa bucal. El pródromo termina cuando comienza la erupción que inicia en la cara y se extiende al tronco y a las extremidades. El comienzo de la erupción coincide con la aparición

de la respuesta inmune y la iniciación de la eliminación del virus. La recuperación es acompañada por inmunidad de por vida a la reinfección. Las complicaciones incluyen pneumonitis severa (produce una enfermedad pulmonar crónica), otitis media y laringotraqueobronquitis, reactivación de tuberculosis, enfermedades gastrointestinales (asociados con una bacteria secundaria), enfermedades neurológicas, ceguera en niños (principalmente en áreas con ausencia de vitamina A), meningoencefalitis y panencefalitis esclerosante subaguda.

7.3.1.2. SARAMPIÓN ATÍPICO: Se da en niños que recibieron pocos Acs maternos o que fueron vacunados pero no generaron una respuesta inmune adecuada. Difiere del sarampión típico porque se presenta con un tiempo más prolongado de fiebre, lesiones inusuales en la piel y neumonitis severa. Una hipótesis de la patogénesis incluye una anomalía de la respuesta inmune celular. Las complicaciones neurológicas más severas del Sarampión y sus características principales se describen en la Figura 34.

Enfermedad	Estado inmunológico	Edad de infección	Virus en cerebro	Incidencia	Patología	Curso de la infección
Encefalomielit Aguda Diseminada (ADEM)	Normal	> 2 años	No	1:1000	Inflamación Desmielinación	Monofásica en semanas
Encefalitis con cuerpos de inclusión de Sarampión (MIBE)	Deficiente	Cualquiera	Si	-----	Cuerpos de inclusión	Progresiva en meses
Panencefalitis Esclerosante Subaguda (SSPE)	normal	< 2 años	Si	1:10 ⁶	Inflamación Cuerpos de inclusión	Progresiva en meses

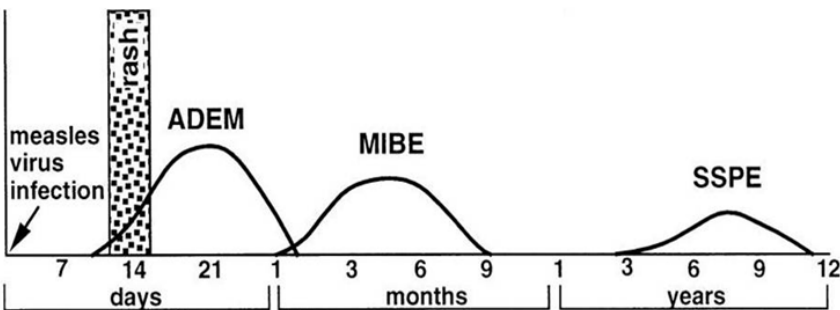


Figura 34. Complicaciones neurológicas del Sarampión
(adaptado de Griffin DE, 2013)

7.3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DEL VIRUS DEL SARAMPIÓN

La presentación clínica del Sarampión clásico es generalmente suficiente para hacer el diagnóstico, pero al ser una **infección de denuncia obligatoria** debemos confirmar los casos sospechosos mediante técnicas de laboratorio e informarlos a las redes de vigilancia epidemiológicas correspondientes. Además, no todos estos signos y sín-

tomas pueden estar presentes en el Sarampión y muchos se comparten con otras enfermedades. El diagnóstico diferencial se realiza con RbV, PV-B19, HHV-6 y HHV-7. Los Acs IgM e IgG se producen durante la respuesta inmunitaria primaria y se pueden detectar en el suero pocos días después de la aparición del exantema. La detección de Acs IgM e IgG se realizan por técnicas de inmunoenzimáticas como ELISA, CLIA o IFI.

En el caso de las técnicas de ELISA para Acs IgM, el 90% de casos de Sarampión son positivos a los 3 días de iniciado el exantema. Las concentraciones de Acs IgM alcanzan su punto máximo después de 7 a 10 días y luego disminuyen rápidamente; rara vez son detectables después de las 6 a 8 semanas. Las concentraciones de Acs IgG alcanzan su punto máximo hacia las 4 semanas y persisten mucho tiempo después de la infección. También se producen Acs de clase IgA sérica e secretora.

La reexposición al virus genera una fuerte respuesta inmunitaria de reconocimiento, con un rápido aumento de los Acs IgG, que previene la enfermedad clínica.

Las técnicas directas como aislamiento de una muestra clínica o la detección del genoma viral por técnicas RT-PCR **no** se realizan en forma sistemática con fines diagnósticos, sino que se utilizan con fines epidemiológicos para conocer la cepa circulante y para confirmar los resultados obtenidos con las técnicas serológicas.

7.4. VIRUS DE LA PAROTIDITIS

El **virus de la parotiditis** (MuV) está incluido en el género *Orthorubulavirus* de la subfamilia *Rubulavirinae* en la familia *Paramixoviridae* según los nuevos criterios taxonómicos del ICTV. Los viriones son pleomórficos y aproximadamente esféricos. La envoltura tiene 2 glicoproteínas de superficie; hemaglutinina-neuroaminidasa (HA-NA), que contiene el sitio de unión al receptor, y la proteína de fusión (F). La estructura interior espiral o nucleocápside es similar a la del virus del Sarampión. La nucleocápside contiene el genoma de ARN simple hebra con polaridad negativa no segmentado de 15,3 Kb y el complejo enzimático P/L con todas las funciones para la replicación y transcripción del genoma.

Durante el período de incubación, MuV se multiplica sobre la mucosa respiratoria, y se disemina por drenaje a los nódulos linfáticos y luego al plasma. MuV se excreta por saliva desde los 6 días antes del comienzo de la parotiditis y finaliza cuando aparece localmente los Acs IgA específicos, a los 5 días después del comienzo de los síntomas.

Los pacientes infectados son capaces de diseminar el virus por vía respiratoria por un intervalo de 7 a 10 días. La desaparición de la viremia en plasma coincide con el desarrollo de los Acs los cuales pueden ser detectados en suero a los 11 días después de la infección, sintomática o asintomática.

7.4.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El cuadro clínico habitual es la **parotiditis (o paperas)**, que tiene un período de incubación de 18 días. Al comienzo de la infección puede haber fiebre moderada que se va unos días después. Lo más característico de la enfermedad es la tumefacción (hinchazón) de una o ambas parótidas que producen dolor al abrir la boca, hablar o masticar. Una complicación importante es la **epidídimo-orquitis**, que suele observar-

se en el 30-40% de las infecciones que afectan a hombres jóvenes y puede producir **atrofia testicular**, la cual raramente se asocia a esterilidad.

Además de los testículos en varones, otros órganos pueden estar involucrados sintomáticamente durante las paperas, que se detallan a continuación:

- Riñones: la replicación en el tejido renal es más prolongada que en las glándulas parótidas y continúa después de la aparición de Acs neutralizantes en suero.
- SNC: es un sitio común de diseminación del virus (con o sin signos asociados de parotiditis). El virus se puede recuperar de LCR y raramente la infección del SNC es fatal.
- Páncreas
- Tiroides
- Ovarios
- Bazo
- Corazón.

7.4.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DEL VIRUS DE LA PAROTIDITIS

Habitualmente el diagnóstico es clínico. Sin embargo, otras causas de parotiditis deben ser consideradas: tumores, infecciones supurativas (incluyendo una micobacteria atípica) y otros virus como PIV, Flu-A, Coxsackievirus A que sin causar parotiditis provocan síntomas en otros órganos viscerales o SNC. En estos casos, es necesaria la confirmación del diagnóstico, así como durante una epidemia o en los casos atípicos.

En la mayoría de los casos, se utiliza la detección de Acs IgM de parotiditis en suero por técnicas de EIA (formato captura de IgM) o IFI. La presencia de Acs IgG específicos indica exposición reciente o anterior al virus, o bien respuesta a vacuna. Alternativamente, la aplicación de técnicas de detección directa por aislamiento viral y detección del genoma por técnicas de RT-PCR quedan relegados a:

- casos con complicaciones graves por este virus,
- identificación de la cepa circulante como información epidemiológica.

Las muestras de elección para buscar el genoma viral por técnicas de biología molecular son saliva, LCR u orina. Las muestras deben ser obtenidas, en lo posible, dentro de la primera semana desde la aparición de los síntomas.

La **vacuna TRIPLE VIRAL** protege contra las infecciones de los virus del *Sarampion*, *Rubéola* y *Parotiditis*. Contiene *virus vivos atenuados* preparados en cultivos celulares de embriones de pollo (virus del sarampion y virus de la parotiditis) o preparados en fibroblastos diploides de pulmón humano (virus de rubéola). En Argentina, la vacuna **Triple Viral** está incluida en el Calendario de Vacunación: *1° Dosis a los 12 meses de edad y 2° Dosis a los 5 años*.
(Tomado de <https://www.argentina.gob.ar/salud/vacunas/doble-triple-viral>).

7.5. VIRUS DE LA MPOX (VIRUELA SÍMICA)

La **mpox** (antes denominada viruela símica, viruela del mono o monkeypox) es una enfermedad infecciosa que puede causar erupción dolorosa, inflamación de los ganglios linfáticos, fiebre, dolores de cabeza, musculares y de espalda, entre otros. Si bien la mayoría de las personas se recuperan por completo, algunas enferman de gravedad. Está causada por el **virus mpxv** (MPXV) que pertenece al género *Orthopoxvirus* de la subfamilia *Chordopoxvirinae* en la familia *Poxviridae* según los nuevos criterios taxonómicos del ICTV. Es un virus con genoma ADN de doble cadena lineal con extremos en horquilla cerrados covalentemente (sin extremos libres 3' o 5') que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) de 10 kb en cada extremo. Los genes están muy cercanos con regiones intergénicas de no más de 100 pb.

Filogenéticamente, se han descrito 2 clados distintos del virus: clado I (contiene los subclados Ia e Ib) y el clado II (contiene los subclados IIa y IIb). En 2022 comenzó un brote mundial del MPXV clado IIb que sigue activo en algunos países de África. Sin embargo, están aumentando los brotes por subclados Ia e Ib, detectándose en agosto de 2024, el clado Ib fuera de África.

Se desconoce el reservorio natural del virus, pero varios mamíferos pequeños, como las ardillas y los monos, son vulnerables al virus.

7.5.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

MPXV se transmite de persona a persona principalmente por contacto estrecho piel con piel (al tocarse o tener relaciones sexuales), boca con boca o boca con piel (al besarse), cara a cara (al hablar o respirar cerca mediante la generación de partículas respiratorias infecciosas). También se puede contraer la mpxv a partir de objetos contaminados (ropa de vestir o de cama), heridas cortopunzantes (salones de tatuajes). *Durante el embarazo o el parto, el virus puede transmitirse al bebé.*

Los signos y síntomas suelen comenzar 1 semana después de la exposición, pero pueden extenderse hasta 3 semanas. La duración de síntomas es de 2 a 4 semanas, pero pueden prolongarse en las personas inmunodeprimidas.

Los síntomas frecuentes de la mpxv incluyen:

- erupción cutánea: en general, inicia en la cara y se extiende por todo el cuerpo, hasta llegar a las palmas de las manos y a las plantas de los pies. La erupción comienza como una mancha que se convierte en vesícula llena de líquido que puede picar o doler, para luego secarse y cubrirse de costras que acaban cayéndose.
- fiebre
- dolor de garganta, de cabeza, musculares, de espalda
- fatiga
- ganglios linfáticos inflamados.

Los pacientes pueden transmitir la enfermedad mientras no hayan cicatrizado todas las lesiones y se haya renovado la piel. Algunas personas pueden estar infectadas y no presentar síntomas.

Los niños, las embarazadas y los inmunodeprimidos presentan mayor riesgo de enfermar gravemente y de fallecer a causa de las complicaciones derivadas de la mpxv

Dichas complicaciones incluyen neumonía, infección de la córnea con pérdida de visión, dolor o dificultad para tragar líquidos, vómitos y diarrea que causan deshidratación o malnutrición, sepsis, encefalitis, miocarditis, proctitis, balanitis o uretritis.

7.5.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

En general, es importante considerar el diagnóstico diferencial con otros agentes que producen manifestaciones cutáneas: VZV, VS, HSV-1, HSV-2, sarna (*Sarcoptes scabiei*), sífilis (*Treponema pallidum*). Por ello, las pruebas de laboratorio son fundamentales para recibir el tratamiento adecuado lo antes posible y evitar que la enfermedad se agrave y se siga propagando.

La prueba de laboratorio indicada es la detección del ADN-MPXV por métodos moleculares, en general por PCR. Las muestras óptimas son aquellas tomadas directamente de las lesiones cutáneas (piel, líquido o costras) por hisopado. En ausencia de lesiones cutáneas, las muestras pueden obtenerse mediante un hisopado nasofaríngeo o hisopado anal. *No se recomiendan los análisis de sangre.* La detección de Acs no suelen ser útiles.

En el marco de la prevención combinada del HIV-1 y otras ITS, la evaluación de una persona con sospecha o confirmación de mpox debe ser una oportunidad para ofrecer en forma sistemática los servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento del HIV-1 y otras ITS, y para articular el manejo de la mpox en las personas con diagnóstico de HIV-1 conocido a los servicios de atención de enfermedad avanzada por HIV-1.

Bibliografía

- Ostrander B, Bale JF. Congenital and perinatal infections. *Handb Clin Neurol* 2019;162:133-153.
- Megli CJ, Coyne CB. Infections at the maternal-fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. *Nat Rev Microbiol* 2022;20(2):67-82.
- P. Anderson. Assessment and development of executive function (EF) during childhood, *Child. Neuropsychol* 2002;8(2):71–82. <https://doi.org/10.1076/chin.8.2.71.8724>.
- Gigi CE, Anumba DOC. Parvovirus B19 infection in pregnancy - A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2021;264:358-362.
- Dittmer FP, Guimarães CM, Peixoto AB, Pontes KFM, Bonasoni MP, Tonni G, Araujo Júnior E. Parvovirus B19 Infection and Pregnancy: Review of the Current Knowledge. *J Pers Med* 2024;14(2):139.
- Algwaiz G, Alharbi A, Alsehaim K, Alahmari A, El Fakih R, Aljurf M. Hematologic Manifestations of Parvovirus B19 Infection. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2023;16(4):316-322.
- Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004;350(6):586-97.
- Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):485-505.
- Von Landenberg P, Lehmann HW, Modrow S. Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev* 2007;6(5):278-85.
- Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* 1941;3:35-46.

- Winter AK, Moss WJ. **Rubella**. *Lancet*. 2022 Apr 2;399(10332):1336-1346.
- Martínez-Quintana E, Castillo-Solórzano C, Torner N, Rodríguez-González F. Congenital rubella syndrome: a matter of concern. *Rev Panam Salud Publica* 2015;37(3):179-86.
- Rosales-Santiago LA, Aguilar-Arguello C, Alvarez-Molina MC, Ulloa-Patiño P. Rubéola congénita, análisis de un caso con lesión hepática. *Salud en Tabasco* 2011;17(3):77-80.
- Grangeot-Keros L, Bouthry E, Vauloup-Fellous C. Rubéola. *EMC - Pediatría* 2016;51(2):1-10.
- Centers for Disease Control (CDC). Rubella and congenital rubella syndrome-United States, 1984-1985. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1986;35(9):129-35.
- Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, et al. and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Paramyxoviridae*. *J Gen Virol* 2019;100:1593–1594.
- Laksono BM, de Vries RD, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL. Measles Virus Host Invasion and Pathogenesis. *Viruses* 2016;8(8):210.
- Griffin DE. Measles virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al, eds. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- Su SB, Chang HL, Chen AK. Current Status of Mumps Virus Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Vaccine. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(5):1686.
- Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaed M, Tombuloglu G, AlRubaish AA, Mahmoud A, Sma-jlović S, Ćordić S, Rabaan AA, Alsuhaime E. Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. *J Infect Public Health* 2023;16(4):531-541.
- Lim CK, Roberts J, Moso M, Liew KC, Taouk ML, Williams E, Tran T, Steinig E, Caly L, Williamson DA. Mpox diagnostics: Review of current and emerging technologies. *J Med Virol* 2023;95(1):e28429.
- Elsayed S, Bondy L, Hanage WP. Monkeypox Virus Infections in Humans. *Clin Microbiol Rev* 2022;35(4):e0009222.

Capítulo 8

VIRUS RESPIRATORIOS

Ana Laura **Cavatorta**

Silvia **Marchiano**

Micaela **Cámpora**

María Rosa **Marano**

GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

Las **infecciones respiratorias agudas** (IRAs) son patologías que afectan el tracto respiratorio desde la faringe hasta los pulmones, afectando uno o más sitios anatómicos y con una evolución de menos de 15 días.

Las IRAs se clasifican según el sitio anatómico (la epiglotis como punto de separación) en:

- **IRAs altas:** rinoфаринgitis, faringoamigdalitis, sinusitis, otitis media.
- **IRAs bajas:** laringitis, laringotraqueobronquitis (crup), bronquitis, bronquiolitis y neumonía.

Existen numerosos virus capaces de ingresar por la mucosa del tracto respiratorio, replicar en él y producir cuadros respiratorios de distinta gravedad. Al menos 20 virus son causantes de infección respiratoria en humanos: algunos son conocidos hace mucho tiempo como el **virus Influenza A / B** (Flu-A / Flu-B), el **Virus Respiratorio Sincicial** (RSV), el **Adenovirus** (ADV), los **Rinovirus** (RNV) y los **virus Parainfluenza 1, 2 y 3** (PIV-1 / PIV-2 / PIV-3), mientras que otros se descubrieron en el siglo XXI por métodos moleculares como el **Metapneumovirus humano** (hMPV), el **Bocavirus** (BCV) y algunos **Coronavirus** (HCoV-299E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV-1 o SARS-CoV-2).

Cabe destacar que también se han descrito casos de coinfección con más de un agente viral en este tipo de patologías.

Por otro lado, se deben diferenciar a los virus respiratorios propiamente dichos de otros, tales como:

- Virus que ingresan por el tracto respiratorio, replican en mucosa pero se diseminan por viremia a otros órganos, como RbV, virus del Sarampión, MuV y MPXV
- Virus que no causan enfermedad respiratoria pero pueden dar síntomas respiratorios y luego son capaces de excretarse a través de las mucosas durante largos períodos, como ADV, CMV y EBV.

Por cuestiones de salud pública, para todos los virus antes mencionados, se realiza mayor seguimiento y se presta particular atención a la circulación de aquellos que tienen genoma ARN (por ejemplo, Flu-A y SARS-CoV-2) ya que son los que tienen mayor variabilidad genética y por ello son capaces de causar pandemias.

8.1. PRINCIPALES VIRUS RESPIRATORIOS DE IMPORTANCIA DIAGNÓSTICA

8.1.1. VIRUS INFLUENZA

La **gripe estacional** es una infección vírica aguda causada por Flu-A o Flu-B. Los virus **Flu-A** se clasifican en subtipos en función a las diferentes combinaciones de las 2 proteínas de la superficie del virus (HA y NA). En la actualidad circulan y afectan al ser humano los subtipos H1N1 y H3N2. El subtipo A (H1N1) circulante (denominado A (H1N1)_{pdm09}) fue el agente que causó la pandemia de 2009 y posteriormente sustituyó al subtipo A estacional que había circulado hasta 2009.

La **gripe pandémica** es un tipo de gripe que se repite cada varias décadas y se propaga rápidamente por todo el mundo. La primera pandemia de gripe de este siglo fue causada por la emergencia de un nuevo subtipo triple reasortante porcino/aviar/humano de Flu-A (H1N1).

Entre los virus que infectan aves domésticas o salvajes, hay nuevos subtipos (H5N1 o H7N9) que surgieron de reasociaciones genéticas, las cuales les confieren mayor poder de infectividad y virulencia, produciendo alta letalidad en aves e incluso se podrían asociar con infección humana grave con gran potencial pandémico y alta tasa de mortalidad. El aumento en la detección de la influenza aviar A (H5N1) entre mamíferos, que están biológicamente más cercanos a los humanos que las aves, genera preocupación ya que el virus pueda adaptarse para infectar a los humanos con mayor facilidad. Se han reportado varios eventos de muerte masiva en aves silvestres causados por virus de la cepa A (H5N1), y un número creciente de casos en mamíferos, tanto terrestres (incluyendo animales de compañía), como acuáticos, causando morbilidad y mortalidad. También hay que considerar que debido a los cambios climáticos que modifican los patrones de migración de las aves, pueden aparecer cepas muy patógenas en nuevas áreas.

Dada la inestabilidad y plasticidad del ARN de su genoma, Flu-A puede tener una evolución particular e impredecible, lo que hace necesario su vigilancia epidemiológica permanente.

Si un paciente presenta síntomas de Enfermedad tipo Influenza (ETI), Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) o Infección Respiratoria Aguda Grave Inusitada (IRAGI) con antecedente de viaje hacia zonas con circulación de estos subtipos, se deben considerar para el diagnóstico enviando muestras a los Centros de Referencia.

Los virus **Flu-B** circulantes pueden dividirse en 2 grupos o linajes (B/Yamagata y B/Victoria) y no se clasifican en subtipos.

La gripe es una enfermedad con una elevada tasa de morbimortalidad en los grupos de alto riesgo, y es por ello por lo que se promueven los beneficios de la prevención a través de la vacunación.

8.1.1.1. VACUNA ANTIGRIPAL: fue incorporada en el año 2011 al Calendario Nacional de Vacunación, con el propósito de reducir las complicaciones, hospitalizaciones, secuelas y muertes en la población de riesgo. La OMS ha implementado una red de monitoreo de los virus Flu-A y Flu-B en más de 80 países que permite indicar las cepas de

los virus en circulación en cada país para la preparación de las vacunas antigripales de la siguiente temporada, aumentando la probabilidad de que éstas sean más efectivas. Así, desde 1999, el hemisferio sur utiliza una fórmula propia, recomendada por la OMS a partir de la vigilancia centinela.

Las vacunas antigripales contienen antígenos de superficie HA y NA de forma que los Acs que genera el paciente van dirigidos contra estas proteínas y son los responsables de la protección contra la infección, contribuyendo a la mejoría de la enfermedad. Para la preparación de la vacuna los virus son cultivados en huevos fertilizados de gallinas sanas e inactivados con formaldehído. Las vacunas antigripales se actualizan todos los años de acuerdo con la vigilancia epidemiológica y suelen diferir entre el hemisferio norte y el sur. La vacunación representa el mayor soporte para la prevención de la gripe. Existen dos tipos de vacunas:

– **A virus vivos atenuados:** estas vacunas se producen con virus recombinantes a partir de cepas de virus atenuados adaptadas a la propagación en frío y los antígenos HA y NA de las cepas recomendadas para la vacuna anual. Tienen una buena respuesta inmunológica y pueden administrarse por vía intranasal generando inmunidad a nivel de mucosas, lo que las transforma en un elemento de relevante importancia. Esta vacuna es segura y efectiva para personas adultas sanas.

– **A virus inactivados:** esta vacuna se produce en cultivos celulares de embrión de pollo a partir de 3 cepas de virus gripal (2 cepas de Flu-A y 1 de Flu-B) que se fraccionan (subvirión), se inactivan y purifican. No ofrece riesgo para embarazadas ni para individuos inmunodeprimidos debido a que no producen viremia.

Se recomienda que toda la población se vacune anualmente. Existen grupos que deben vacunarse obligatoriamente debido a que son más propensos a tener complicaciones si contraen la infección.

– **Grupos de alto riesgo:**

- Mayores de 65 años
- Niños y adultos con enfermedades crónicas tales como patologías pulmonares, cardíacas, metabólicas, renales, anemias crónicas, hemoglobinopatías, inmunosupresión.
- Personas que viven en instituciones cerradas, como geriátricos, colegios de internados, cuidado de enfermos crónicos, etc.
- Embarazadas. El riesgo de hospitalización por complicaciones de gripe es 4 veces más alto en esta población que en las mujeres no embarazadas. La vacuna inactivada es segura en cualquier estadio del embarazo.
- Niños de riesgo entre los 6 meses y los 2 años: niños prematuros, con peso menor a 1,5 Kg y especialmente con displasia broncopulmonar.
- Portadores de HIV-1.
- Viajeros hacia zonas epidémicas.

– **Grupos que pueden transmitir la gripe a personas en riesgo:**

- Médicos, enfermeras u otro personal sanitario.
- Empleados de geriátricos e instituciones de cuidado de enfermos crónicos.
- Enfermeras o voluntarias que atienden a pacientes en su domicilio.
- Miembros de la familia de un enfermo de alto riesgo.

La vacuna se debe administrar todos los años durante el otoño o previo a éste. A partir de su aplicación, el nivel de anticuerpos llega a su máxima protección hacia la 2° semana y permanecerá en ese nivel durante 1 año.

La eficacia de la vacuna puede variar dependiendo de quién la recibe. Al menos 2 factores juegan un papel importante a la hora de determinar las probabilidades de protección:

- las características de la persona que recibirá la vacuna (edad y estado de salud).
- la similitud o “coincidencia” entre los virus incluidos en la vacuna y los que circulan en la comunidad.

La eficacia clínica en los adultos sanos < de 65 años es del 70 al 90%. Si bien en grupos de mayor edad la eficacia es menor, especialmente en mayores de 70 años, la vacuna previene complicaciones secundarias y reduce el riesgo de hospitalización y muerte por gripe.

8.1.1.2. USO DE ANTIVIRALES PARA INFLUENZA: El **oseltamivir** es la droga antiviral de elección para el tratamiento de las infecciones por Flu-A o Flu-B. Su acción se basa en la inhibición de las NA presentes en el virus y que son las encargadas de liberar al virus de las células infectadas y por lo tanto asegurar su diseminación a otros hospederos.

Si bien la mayor efectividad del tratamiento se ha demostrado con la administración precoz del mismo (idealmente dentro de las 48 h del inicio de los síntomas), hay evidencia disponible de que, en pacientes con alto riesgo de complicaciones o en pacientes con enfermedad grave o progresiva, se obtienen beneficios aun comenzando el tratamiento más tardíamente. Asimismo, existe evidencia de que el tratamiento antiviral en embarazadas infectadas en cualquier trimestre es beneficioso para la prevención de insuficiencia respiratoria y muerte, incluso en la administración tardía (3 a 4 días del inicio de los síntomas) de iguales dosis que las mujeres no embarazadas.

8.1.2. VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

Es considerado como uno de los patógenos más importantes en las infecciones graves del tracto respiratorio inferior en pediatría. Este virus tiene distribución mundial y presenta un patrón estacional. En nuestro país la epidemia anual comienza en el otoño y culmina en la primavera.

El RSV es un virus envuelto de simetría isométrica con un genoma de ARN simple hebra sentido negativo no segmentado de 15 Kb. Perteneció al género *Orthopneumovirus* dentro de la familia *Pneumoviridae*.

El **RSV** infecta tanto a niños como a adultos. El espectro de manifestaciones clínicas varía de episodios leves con afectación de la vía aérea superior en cualquier grupo etario a un compromiso severo del tracto respiratorio inferior con bronquiolitis, neumonía o falla respiratoria aguda principalmente en menores de edad. Algunos niños con ciertas condiciones de riesgo como prematurez, enfermedad pulmonar crónica, cardiopatía congénita, entre otros, presentan un riesgo incrementado de morbilidad y mortalidad debido a infección por RSV. Es el principal agente causal de bronquiolitis en lactantes.

8.1.2.1. VACUNACIÓN CONTRA EL RSV: En marzo 2024 comenzó en todo el país la estrategia de vacunación contra el RSV para embarazadas con el objetivo de proporcionar, a través del pasaje transplacentario de Acs, protección contra la bronquiolitis durante los primeros 6 meses de vida, que es el momento de mayor vulnerabilidad para padecer cuadros severos por la infección por este virus. Los estudios indican que la eficacia contra enfermedad severa es del 81,8% en los primeros 90 días de vida. Consiste en la aplicación de 1 dosis entre las semanas 32 y 36 de gestación, antes del inicio y durante la temporada de circulación del VSR. Esta estrategia fue incorporada al Calendario Nacional de Vacunación (CNV) con carácter gratuito y obligatorio, y contribuiría a disminuir:

- la mortalidad infantil neonatal y postnatal en nuestro país, al reducir la infección por este virus en niñas y niños menores de 6 meses de vida.
- los altos porcentajes de ocupación en salas de internación general, camas de terapia intensiva pediátrica y neonatal causados por el virus, así como el consiguiente incremento en los costos del sistema de salud.

8.1.2.2. USO DE ANTIVIRALES PARA RSV: el **palivizumab** es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el RSV que se ha implementado en Argentina con el objetivo de reducir la morbilidad secundaria a la enfermedad respiratoria aguda grave por RSV en niños de alto riesgo.

8.1.3. VIRUS PARAINFLUENZA 1/2/3 (PIV-1/2/3)

Este grupo de virus afectan principalmente a los niños pequeños, pero también pueden infectar a personas adultas. Generalmente causan infecciones leves en el tracto respiratorio superior tales como rinitis y rinofaringitis. Sin embargo, en algunos niños pueden ocasionar cuadros más graves que requieren hospitalización y mayores cuidados como el crup (laringotraqueobronquitis obstructiva), bronquiolitis, bronquitis y neumonía.

8.1.4. ADENOVIRUS (ADV)

Al igual que los demás virus respiratorios, los ADV se encuentran distribuidos mundialmente y causan una gran variedad de enfermedades en el ser humano. En los niños causan infecciones respiratorias altas y bajas, y son la tercera causa más común de infección respiratoria baja en menores de 5 años.

8.1.5. METAPNEUMOVIRUS HUMANO (hMPV)

Es un agente etiológico que debe considerarse en el abordaje diagnóstico del niño con bronquiolitis o infección del tracto respiratorio superior e inferior, particularmente en aquellos con inmunofluorescencia negativa por RSV, ADV, Flu-A/B y PIV-1/2/3.

El hMPV se considera el segundo agente etiológico en enfermedades agudas del tracto respiratorio. Los sujetos considerados de alto riesgo son los niños menores de 5 años, con mayor incidencia en infantes de 6 meses de edad. También se han encon-

trado aislados en personas de edad adulta. Muchos estudios han reportado al hMPV en coinfección con otros patógenos como RSV, BCV, RNV, CoV, etc.

Cuando se presenta de forma sintomática, las infecciones causadas por hMPV se presentan con fiebre (< 38 °C), tos, hipoxia, sibilancias, rinorrea, disnea, linfopenia con monocitosis. En adultos inmunocomprometidos son comunes los dolores de cabeza, la adenopatía cervical, la faringitis y el herpes labial recurrente.

8.1.6. CORONAVIRUS (CoV)

Los miembros de los género Alfa-CoV (229E y OC43) y Beta-CoV (NL63 y HKU1) de la familia *Coronaviridae* que infectan a humanos de cualquier grupo etario causan hasta el 30% de todas las IRAs. Sin embargo, 2 nuevos Beta-CoV, el Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el Coronavirus asociado al síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), causan neumonitis viral grave, lo que provoca hospitalización y muerte con tasas de mortalidad general del 10% y 30%, respectivamente. Las personas mayores y las que padecen enfermedades subyacentes, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas o cáncer, tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad grave. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas por el virus experimentarán una enfermedad respiratoria de leve a moderada y se recuperarán sin requerir tratamiento. Produce síntomas que incluyen fiebre, tos, dificultad respiratoria, dolor muscular y fatiga.

La pandemia de COVID-19 fue causada por el virus SARS-CoV-2. La OMS declaró una emergencia de salud pública de importancia internacional el 30 de enero de 2020, condición que mantuvo hasta el 5 de mayo de 2023, cuando decretó el fin de la emergencia sanitaria. Existen varias vacunas contra la COVID-19 validadas para su uso, éstas disminuyen la probabilidad y severidad de la infección, aunque los vacunados pueden contagiar el virus. Para la actualización de las cepas vacunales, se realiza un constante seguimiento epidemiológico de las cepas circulantes a nivel mundial.

8.2. DIAGNÓSTICO DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS

A pesar de que el rol desempeñado por los virus como desencadenantes de infecciones respiratorias está ampliamente demostrado, el diagnóstico clínico no permite asegurar cuál es el agente etiológico causante de la infección por varias razones:

- **el número de agentes que pueden estar involucrados es muy amplio**, es decir, muchos virus pueden causar cuadros clínicos similares.
- **la edad de los pacientes determina un patrón diferente de infecciones y de gravedad**. El mismo virus puede causar desde una infección leve del tracto respiratorio superior a una neumonía fatal. Los niños menores de 5 años, y en especial los menores de 2 años, son los más afectados tanto en morbilidad como en gravedad de las infecciones causadas por virus respiratorios. Tanto en pacientes pediátricos como en los ancianos la respuesta inmunológica a estas infecciones puede ser deficiente y por lo tanto desencadenar complicaciones que pueden llegar a ser graves.
- **existe un factor importante de estacionalidad** en los países de clima templado.
- **elevado potencial para causar epidemias de algunos virus**.

Por todo esto el diagnóstico rápido y específico es muy importante para el manejo individual del paciente proporcionándole el tratamiento que corresponda según el caso y para evitar la diseminación del virus, indicando al paciente las conductas higiénicas a seguir y aislándolo con el fin de que no se propague el virus.

La importancia del diagnóstico etiológico de las IRAs también se basa en que el manejo de estas infecciones tiene un alto costo directo e indirecto en las familias, servicios de salud y la comunidad en general por las siguientes razones:

- Aunque el principal origen de las IRAs es viral y un alto porcentaje de ellas es autolimitado, son la primera causa de indicación de antibióticos en el mundo, lo cual puede llevar al desarrollo de resistencias a antimicrobianos.
- La tasa de morbilidad en niños es muy alta y un mismo niño puede tener entre 4 y 6 episodios al año aumentando así la demanda de atención médica. En Argentina la principal causa de consulta e internación es la enfermedad respiratoria en todas las edades.
- Algunos casos, sobre todo en niños menores de 2 años y más aún en menores de 6 meses, pueden ser cuadros clínicos severos requiriendo hospitalización, con el gasto que esto genera para las familias y el sistema sanitario.

Las metodologías utilizadas para el diagnóstico de los virus respiratorios pueden agruparse en 2 grandes grupos:

- **en métodos directos:** detección de antígenos y ácidos nucleicos virales en células de la mucosa del tracto respiratorio superior.
- **métodos indirectos:** detección de Acs dirigidos contra los antígenos virales en suero o plasma.

Los métodos directos son los de elección en este tipo de infecciones ya que lo importante en este tipo de patologías es tomar decisiones rápidas y efectivas.

8.2.1. MÉTODOS DIRECTOS

Su éxito depende fundamentalmente de que la muestra clínica sea la adecuada, obtenida en el momento preciso y procesada en las condiciones requeridas para la técnica elegida.

TOMA DE MUESTRA

Por su carácter de infecciones localizadas, las enfermedades respiratorias virales presentan el máximo de replicación viral en la fase inicial de la evolución de la infección en las células de las mucosas del aparato respiratorio superior. Por ello, las muestras obtenidas del tracto respiratorio superior son adecuadas para detectar tanto infecciones altas como bajas. La mejor muestra es aquella obtenida dentro de los **primeros 5 días de sintomatología** siendo **óptima a las 48 horas**. Así, se obtienen muestras con alta concentración de células infectadas y secreciones respiratorias ricas en partículas virales.

La edad del paciente es fundamental para la elección del tipo de muestra óptima:

- En los **neonatos**, la muestra adecuada es el **aspirado nasofaríngeo** (ANF) obtenido por medio de vacío con una sonda conectada a un recolector de mucus (jeringa) e introducida por una de las narinas hasta una determinada extensión.

- En los **niños y adultos**, se prefiere el **hisopado nasofaríngeo** (HNF). Otras muestras respiratorias pueden ser empleadas, pero presentan menor rendimiento.

CONSERVACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

- **Si la muestra se va a utilizar para aislamiento viral en cultivo celular**, se recolecta en un medio de transporte virológico adecuado: estéril, tamponado a pH neutro, adicionado de sustancias proteicas (gelatina, albúmina u otras) y con alta concentración de mezcla de antibióticos y fungicidas para eliminar el crecimiento de bacterias u hongos. Conservar, sin congelar, entre 4°C y 8°C, hasta su procesamiento o derivación. En caso de ser necesaria su conservación por varios días se recomienda congelar a -70°C. La temperatura de -20°C no es recomendada para la mayoría de los virus respiratorios, siendo destruidos al congelar y descongelar.
- **Si la muestra se va a utilizar para métodos inmunológicos diagnósticos**, se recolecta en un medio estéril, tamponado a pH neutro. Si la muestra se procesa en el día de su obtención puede conservarse, sin congelar, entre 4°C y 8°C. o guardar como ímprints fijadas con acetona en frío (detección de antígeno por IFD).
- **Si la muestra se va a utilizar para métodos moleculares diagnósticos**, se recolecta en un medio de transporte molecular que lisa las células y estabiliza los ácidos nucleicos. En estas condiciones, puede conservarse a temperatura ambiente hasta 48 horas. En caso de ser necesaria su conservación por varios días se puede mantener entre 4°C y 8°C o congelar a -20°C.

La muestra debe ser procesada en **CSB nivel 2**, y siempre deben estar acompañadas por su ficha epidemiológica. Es importante destacar que esa muestra habitualmente será compartida con otras áreas de microbiología.

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

Se realiza por medio de métodos rápidos para el diagnóstico de virus respiratorios. No se necesita la presencia de virus infectivo. Se realiza directamente en la muestra clínica del paciente y sus resultados son obtenidos en horas. Por estas razones permite la intervención en el tratamiento de los pacientes, por ejemplo, limitando el uso de antibióticos, en el criterio de internación y en el manejo de los contactos o de la comunidad, especialmente en el caso de brotes epidémicos. Las condiciones más importantes para obtener un resultado preciso con estas técnicas residen en la calidad y manejo de la muestra adecuada. *El antígeno viral debe estar presente en cantidad suficiente en la muestra clínica.* Las metodologías usadas son:

- **IFD:** Esta técnica aplicada a la detección de antígeno viral en células epiteliales del tracto respiratorio superior es la que aporta mejores resultados prácticos para la mayoría de los virus respiratorios. Las células de los ANF o HNF deben lavarse cuidadosamente en solución tamponada para evitar su destrucción, con varios ciclos de centrifugación a baja velocidad, y deben ser depositadas en portaobjetos adecuados, secadas al aire y fijadas posteriormente con acetona en frío. Se dispone de kits comerciales para la detección simultánea de RSV, Flu-A, Flu-B, PIV-1/2/3, ADV y hMPV en formato de *screening*, así como para detectarlos individualmente. Es importante mencionar que este método no tiene igual desempeño para todos los virus respiratorios. Así, para RSV la sensibilidad es muy buena debido a

la alta carga viral presente en las células del tracto respiratorio superior, pero para los ADV, la sensibilidad disminuye, detectándose aproximadamente el 50% de las muestras positivas provenientes de ANF. Además de la rapidez de la técnica, una ventaja importante de la IFD es que las improntas, una vez fijadas, pueden ser enviadas a centros distantes y mantenerse a bajas temperaturas durante largo tiempo, lo que permite realizar estudios virológicos en centros médicos que no cuentan con microscopio de fluorescencia y/o personal especializado, posibilitando el estudio de un gran número de pacientes.

- **EIA:** su uso es limitado debido a la menor posibilidad de obtener reactivos comerciales y a la necesidad de muestras con concentraciones altas de antígeno viral, por lo que el período útil para la toma de muestra clínica es más corto que en la IFD. Además, en aquellos sistemas que utilizan peroxidasa para el revelado de la reacción puede producirse interferencia con la presencia de peroxidasa endógenas celulares en las muestras, lo que puede dar lugar a resultados equívocos si no son eliminadas previamente. Las ventajas fundamentales de las técnicas de EIA son la posibilidad de procesar un gran número de muestras, realizar una lectura visual, y de no necesitar infraestructura adicional.

- **Inmunocromatografía:** Existen en el mercado distintas pruebas rápidas con distintos formatos (tiras reactivas o *cassettes*) para la detección de algunos de los virus respiratorios. Actualmente se dispone de kits para la detección de Flu-A/B, CoV, RSV de manera separada o simultánea. Sus principales ventajas son la sencillez de la metodología, la alta sensibilidad y la rapidez para obtener un resultado, esta última permite su utilización en centros de salud ambulatorios y servicios de emergencia, de esta manera se expande significativamente la capacidad de diagnóstico, disminuyendo así la demanda en los sistemas de salud. Con respecto a su sensibilidad, es muy buena en periodo pre-sintomáticos (1 a 3 días previos) y hasta 5 a 7 días post-síntomas. Pero debido a la sensibilidad variable de la técnica, un resultado negativo no descarta la infección y en una persona con signos y síntomas compatibles con este tipo de patologías se requiere realizar pruebas complementarias para definir las medidas sanitarias a tomar.

Utilizando esta metodología no es posible evaluar la calidad de la muestra obtenida, lo cual es una gran desventaja ya que la toma de muestra es un paso clave en el diagnóstico de virus respiratorios. Por otro lado, los costos de los kits son muy variables y pueden llegar a ser mayores que la Inmunofluorescencia.

Este tipo de métodos tuvo una gran difusión durante la pandemia COVID-19 para la detección de antígenos del SARS-CoV-2.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES: los ensayos moleculares han revolucionado la detección de los virus respiratorios al ofrecer métodos rápidos, sensibles y específicos para identificar patógenos virales en muestras clínicas. Este avance es crucial dado el impacto significativo de las infecciones respiratorias en la salud pública, especialmente en epidemias y pandemias. Los métodos tradicionales de diagnóstico de virus respiratorios son útiles, pero tienen limitaciones en términos de tiempo de respuesta y sensibilidad. En ese sentido, la aplicación de los ensayos moleculares en la práctica clínica ha mejorado significativamente la capacidad de diagnóstico tem-

prano y preciso de virus respiratorios. Esto es crucial para la gestión de brotes y la implementación de medidas de control de infecciones en entornos de atención médica. También son fundamentales para la vigilancia epidemiológica y la investigación de virus respiratorios emergentes. La capacidad de identificar rápidamente nuevos virus y variantes es esencial para la preparación ante posibles pandemias y para desarrollar estrategias de vacunación efectivas.

Se han desarrollado ensayos moleculares *multiplex* (paneles) que permiten la detección simultánea de múltiples virus respiratorios. Los beneficios clave de los paneles moleculares incluyen alta sensibilidad y especificidad, capacidad para identificar múltiples virus en una sola prueba, y la rápida obtención de resultados, lo que ayuda a guiar el tratamiento y el manejo de los pacientes de manera más eficiente. Estas pruebas son particularmente útiles en entornos clínicos donde es crucial identificar rápidamente el virus causante de una enfermedad respiratoria para proporcionar el tratamiento adecuado y controlar la propagación de enfermedades infecciosas.

Un ejemplo es el FilmArray®, una plataforma molecular automatizada (*point-of-care*) para la detección rápida de 20 patógenos respiratorios en una sola prueba en muestras clínicas. Es un sistema completamente automatizado que no requiere manipulación manual compleja de las muestras. Esto simplifica el proceso de prueba y reduce el potencial de error humano. Proporciona resultados en aproximadamente 1 hora, lo cual es significativamente más rápido que otros métodos diagnósticos.

8.2.2. MÉTODOS INDIRECTOS

La detección de Acs específicos es poco usada en infecciones respiratorias, siendo útiles casi exclusivamente con fines epidemiológicos. El diagnóstico puede realizarse mediante la búsqueda en suero de Acs de clase IgM específicos en muestras de pacientes con más de 10 días de evolución, donde la IFD en muestras respiratorias pierde sensibilidad diagnóstica. Hay disponibles distintas metodologías, entre ellas: IFI, EIA e inmunocromatografías.

8.3. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VIRUS RESPIRATORIOS

En Argentina, todos los años se verifica un progresivo aumento de los casos de IRAs en la época invernal. Dicho aumento se asocia con un incremento en la demanda de atención, del número de hospitalizaciones y de la mortalidad por causas respiratorias.

La vigilancia epidemiológica de las IRAs resulta esencial para detectar precozmente el ascenso estacional del número de casos en cualquier época del año y lugar del país, la identificación de los grupos poblacionales afectados y la frecuencia, distribución y características de los agentes etiológicos involucrados.

Dicha información permite direccionar las acciones de promoción, prevención y control, fortaleciendo la capacidad de respuesta de los servicios de atención en particular, y del sector salud en su conjunto.

Los objetivos de la vigilancia de virus respiratorios son: monitorear tendencias de la incidencia de las IRAs, identificando los períodos epidémicos en diferentes unidades territoriales, detectar y caracterizar los eventos respiratorios inusuales, estimar la participa-

ción de agentes etiológicos virales seleccionados en la morbilidad y mortalidad por IRAs, registrar y analizar los factores de riesgo o determinantes asociados a los casos graves, inusitados y fatales, identificar y caracterizar los virus respiratorios circulantes (en particular Flu-A/B, SARS-CoV-2 y RSV), disponer de la caracterización de los virus Flu-A que potencialmente puedan ser considerados para la composición vacunal, estimar la carga de enfermedad grave por infecciones respiratorias agudas, particularmente asociadas a Influenza, SARS-CoV-2 y RSV, contribuir con las estimaciones de efectividad e impacto de las intervenciones, apoyar la planificación de medidas de prevención y control, de la prestación de los servicios de salud y de la participación comunitaria, orientar la formulación de las políticas y las directrices para la prevención y control de las infecciones respiratorias agudas bajo vigilancia y difundir periódicamente la situación epidemiológica y las medidas recomendadas de acuerdo a la misma.

Para lograr una buena vigilancia epidemiológica se dispone de una red nacional de laboratorios y de la notificación obligatoria de casos en un *Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentina* (SISA) el cual nos permite contar con la información actualizada de todo el país, a través de un único banco de datos integrado y un sistema web de gestión descentralizada.

La vigilancia de las infecciones respiratorias agudas en Argentina incluye a la enfermedad tipo influenza, bronquiolitis en menores de 2 años, neumonías e infección respiratoria aguda grave.

Los agentes virales bajo vigilancia normalmente son SARS-CoV-2, RSV, ADV, PIV-1/2/3/4, Flu-A/B y hMPV. Últimamente la vigilancia se está centrando principalmente en los Flu-A/B, SARS-CoV-2 y RSV: los casos de estos virus deben ser notificados obligatoriamente en el SISA y el resto de los virus respiratorios deben informarse en eventos agrupados.

8.3.1. VIGILANCIA GENÓMICA DE SARS-CoV-2

Debido a la variabilidad genética que presenta este virus, el Ministerio de Salud de la Nación decidió incluir en la vigilancia epidemiológica la caracterización genómica de las cepas de SARS-CoV-2 que están circulando. Se deben estudiar:

- todas las muestras que cumplan con la definición de caso de ETI y que hayan resultado detectables para SARS-CoV-2 por RT-qPCR en las Unidades de Monitoreo Ambulatorio de SARS-CoV-2 y de otros virus respiratorios.
- las muestras que cumplan con la definición de caso de IRAG y que hayan resultado ser detectables para SARS-CoV-2 por RT-qPCR en las Unidades Centinela de cada provincia.

Las muestras por estudiar deberán ser seleccionadas según los siguientes criterios:

- pertenecer a la población general
- diferentes grupos de edad y sexo
- en lo posible responder a una unidad geográfica definida
- deben presentar un valor de Ct < 28 en la RT-qPCR.

8.3.2. VIGILANCIA GENÓMICA DE FLU-A/B

Debido a la inestabilidad y plasticidad del ARN viral, el virus Flu-A puede tener una evolución particular e impredecible, lo que hace necesario su vigilancia epidemiológica permanente. La OMS estableció una red mundial de vigilancia de la gripe con la finalidad de conocer las características de distribución mundial, su estacionalidad y controlar la aparición de nuevas variantes de impacto en la salud humana. Para realizar la caracterización genómica se deben enviar al Laboratorio Nacional de Referencia todas las muestras con resultados positivos para Flu-A/B con Ct < 28 por RT-qPCR.

8.4. INFECCIONES VIRALES RESPIRATORIAS EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS

Los agentes virales que producen infecciones respiratorias son una causa importante de morbi-mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos. Su impacto epidemiológico varía según el tipo de virus, el grado de inmunosupresión y el contexto geográfico.

Entre los receptores de trasplantes y los pacientes oncohematológicos, la neumonía viral a menudo conduce a una enfermedad respiratoria grave y a la muerte. Las infecciones virales de las vías respiratorias inferiores en pacientes inmunocomprometidos se han atribuido generalmente al HSV-1/2 y CMV. En los últimos años, Flu-A/B, PIV-1/2/3/4, RSV y el RNV también se han reconocido como causas de infecciones graves, especialmente en pacientes sometidos a tratamiento por neoplasias hematológicas y trasplante de células madre hematopoyéticas. Estos pacientes tienen una mayor tendencia a desarrollar neumonía grave y se ha informado de una tasa de mortalidad de hasta el 25-70%. Estos pacientes pueden experimentar una diseminación viral prolongada que potencialmente resulte en una mayor duración de la infección, una mayor tasa de transmisión nosocomial y una mayor tasa de mortalidad que en los huéspedes inmunocompetentes.

La prevalencia de agentes virales en pacientes inmunodeprimidos varía según los siguientes factores:

- **Tipo de inmunosupresión:** los receptores de trasplantes de médula ósea y de pulmón tienen mayor riesgo de infecciones por CMV, RSV y ADV, mientras los pacientes con HIV-1 tienen mayor riesgo de infecciones por CMV y VZV.
- **Contexto geográfico:** la prevalencia de ciertos virus (como el RSV) varía según la región y el clima.
- **Estacionalidad:** virus como Flu-A/B, RSV y PIV-1/2/3/4 tienen picos estacionales.
- **Medidas de prevención:** la vacunación y el uso de antivirales profilácticos reducen la prevalencia de ciertos virus (ej. Flu-A/B, CMV).

Bibliografía

- Steller KA. Molecular Testing for Respiratory Viruses. *Diagnostic Molecular Pathology* 2017;123–37. Doi: 10.1016/B978-0-12-800886-7.00011-X.
- Hanson KE, Azar MM, Banerjee R, et al. Molecular Testing for Acute Respiratory Tract Infections: Clinical and Diagnostic. Recommendations from the IDSA’s Diagnostics Committee. *Clin Infect Dis* 2020;71(10):2744-2751.
- Ministerio de salud República Argentina. Infecciones respiratorias agudas. Guía para la vigilancia epidemiológica y recomendaciones para la prevención y control. 2024.
- Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, et al. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol* 2021;93(8):4638-4646.
- Carter T, Iqbal M. The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses* 2024;16(2):316.
- Chauhan RP, Gordon ML. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes* 2022;58(4):255-269.
- Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* 2021;62(11):961-968.
- Erkihun M, Ayele B, Asmare Z, Endalamaw K. Current Updates on Variants of SARS-CoV-2: Systematic Review. *Health Sci Rep* 2024;7(11):e70166.
- Li X, Mi Z, Liu Z, Rong P. SARS-CoV-2: pathogenesis, therapeutics, variants, and vaccines. *Front Microbiol* 2024;15:1334152.
- Nam HH, Ison MG. Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ* 2019;366:l5021.
- Soni A, Kabra SK, Lodha R. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Update. *Indian J Pediatr* 2023;90(12):1245-1253. doi: 10.1007/s12098-023-04613-w.
- Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev* 2017;30(1):277-319.
- Hon KL, Leung AKC, Wong AHC, Dudi A, Leung KKY. Respiratory Syncytial Virus is the Most Common Causative Agent of Viral Bronchiolitis in Young Children: An Updated Review. *Curr Pediatr Rev* 2023;19(2):139-149.
- Oppenlander KE, Chung AA, Clabaugh D. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: Rapid Evidence Review. *Am Fam Physician* 2023;108(1):52-57.
- Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, Hu L, Su Y, Ren J, Yu F, Du L, Jiang S. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol* 2020;92(4):408-417.
- Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48(5-6):217-49.

Capítulo 9

INFECCIONES VÍRICAS GASTROINTESTINALES Y ENTEROVIRUS

Ana Laura **Cavatorta**
Elisa M. **Bolatti**
María Rosa **Marano**

GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES CAUSADAS POR VIRUS

La **gastroenteritis aguda** se define como la inflamación y/o disfunción intestinal producida por un agente infeccioso o sus toxinas. Se encuentra entre las enfermedades más frecuentes del ser humano, solamente superadas por las infecciones respiratorias agudas de etiología viral.

La gastroenteritis aguda se caracteriza por un síndrome diarreico acompañado, o no, de vómitos y dolor abdominal. El proceso es más frecuente y grave en los niños que en el adulto sano.

Las diarreas son un síntoma común a varias enfermedades y motivo frecuente de consulta médica. Es un problema de Salud Pública en los países en desarrollo, por su alta carga de morbilidad y mortalidad. En muchos países puede verse un patrón estacional.

La definición precisa de diarreas es difícil de dar, ya que la frecuencia de las deposiciones varía de acuerdo con patrones socioeconómicos y culturales establecidos y las condiciones higiénicas desempeñan un papel fundamental. Son más frecuentes en los países donde predominan las condiciones de vida desfavorables, con hacinamiento, falta de agua potable y deficiente cobertura de los servicios de salud. **Definiremos diarrea como el aumento brusco en el número de las deposiciones, un aumento en el volumen usual o un cambio en la consistencia de las heces.**

Según su duración se clasifican en:

- **Diarreas Agudas:** menos de 2 semanas de duración
- **Diarreas Persistentes:** entre 2 y 4 semanas de duración
- **Diarreas Crónicas:** más de 4 semanas de duración

La patogenia de la mayor parte de los episodios de diarrea se puede explicar mediante alteraciones secretorias, osmóticas o de la motilidad, o bien por cualquier combinación de ellas. Por lo tanto:

- **Alteraciones secretorias:** causan diarrea secretoria que suele ser provocada por algún secretagogo (Ej: Toxina del cólera) que se une a un receptor de la superficie intestinal.
- **Alteraciones osmóticas:** causan diarrea osmótica que aparece tras la ingestión de solutos insuficientemente absorbidos. El soluto puede ser cualquier sustancia que normalmente no se absorbe bien (Ej: magnesio, fósforo o azúcares, alcoholes o sor-

bitol no absorbidos) o bien que presenten dificultades en su absorción por algún trastorno del intestino delgado (Ej: lactosa en el déficit de lactasa o glucosa en la diarrea por rotavirus).

- **Alteraciones de la motilidad:** pueden ser por aumento de la motilidad (Ej: Síndrome de Intestino Irritable, Tirotoxicosis), retardo de la motilidad (Ej: crecimiento bacteriano excesivo) o defecto de la permeabilidad intestinal (Ej: Enfermedad Celiaca).

Generalmente el comienzo de las diarreas agudas es brusco, la mayor parte de los episodios remiten espontáneamente y duran de 3 a 7 días, no obstante, el personal médico debe tener en cuenta los **grupos de alto riesgo:**

- Niños a los que se ha suspendido la lactancia materna exclusiva.
- Personas que viven en condiciones de hacinamiento.
- Niños y personal que coexisten en círculos u otra institución infantil.
- Inmunodepresión (ancianos, pacientes que reciben tratamiento con esteroides e inmunodepresores, portadores de HIV-1, etc).

9.1. VIRUS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS

La **microscopía electrónica** (ME) demostró al principio de la década de 1970 la existencia de partículas víricas en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis aguda, principalmente en niños. Desde entonces se ha avanzado mucho en el conocimiento de estas infecciones intestinales, superando dificultades determinadas por las propias características biológicas de los virus implicados, principalmente su difícil, y a veces imposible, adaptación al cultivo en líneas celulares. Todos los agentes víricos causantes de gastroenteritis agudas son fácilmente detectados cuando se encuentran en elevadas concentraciones en las heces por ME. La ventaja de la ME es que permite encontrar cualquier virus, sin que el procedimiento limite la identidad del agente detectado. La mayoría de los virus son fácilmente reconocibles por su morfología, y pueden detectarse virus que en muchos laboratorios no se investigan por otras técnicas. Sin embargo, **la ME no es un método de rutina utilizado en los laboratorios diagnósticos.**

Los principales virus productores de gastroenteritis en el ser humano son **Rotavirus, Calicivirus, Astrovirus y Adenovirus.** Otros virus, tales como los CoV, torovirus y picornavirus, son también causantes de diarrea, pero con menor trascendencia epidemiológica.

En general, *el diagnóstico de las gastroenteritis víricas se realiza mediante la detección de antígenos virales o por métodos moleculares basados en la detección de genes específicos en muestras de heces.*

9.1.1. ROTAVIRUS (familia *Reoviridae*)

Son virus no envueltos de unos 70 nm de diámetro y simetría icosaédrica, que poseen genoma ARN bicatenario lineal segmentado constituido por 11 segmentos. Los Rotavirus (RoV) son clasificados desde un punto de vista inmunológico, en 7 serogrupos (A, B, C, D, E, F y G) con base, fundamentalmente, a las características antigénicas de la proteína principal de la cápside VP6, la cual es altamente inmunogénica pero los anticuerpos que induce no son neutralizantes.

El RoV-A es el agente etiológico más importante de las diarreas en niños pequeños, aunque los miembros de los grupos B (RoV-B) y C (RoV-C) se han identificado en diarreas en humanos. Es importante resaltar el hecho de que, dadas las importantes diferencias antigénicas, **los métodos comerciales de detección sólo son capaces de detectar al RoV-A** por lo que casi la totalidad de la información epidemiológica a nivel global se refieren a este serogrupo.

Los RoV-A se clasifican de 2 formas (Figura 35):

- **Serotipos:** en base a las variantes antigénicas del virus (diferencias en las proteínas de la superficie viral que pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico) dado por las proteínas VP7 (serotipo G) y VP4 (serotipo P).
- **Genotipos:** en base a las variantes genéticas del virus (diferencias en la secuencia del genoma viral) de los genes que codifican VP7(genotipo G) y VP4 (genotipo P).

Para VP7, los serotipos y genotipos son concordantes para VP7: los serotipos P se denominan con la P seguida de un número para tipo y los genotipos P se denominan con la P y el número entre corchetes.

Para VP4, los serotipos y genotipos son discordantes: resultando dificultosa la estandarización.

Por ello, en la actualidad la clasificación del RoV se basa en determinar los genotipos de RoV-A con fines epidemiológicos, mediante la amplificación en simultáneo de regiones específicas de los genes VP4 y VP7 seguida de secuenciación de estos fragmentos.

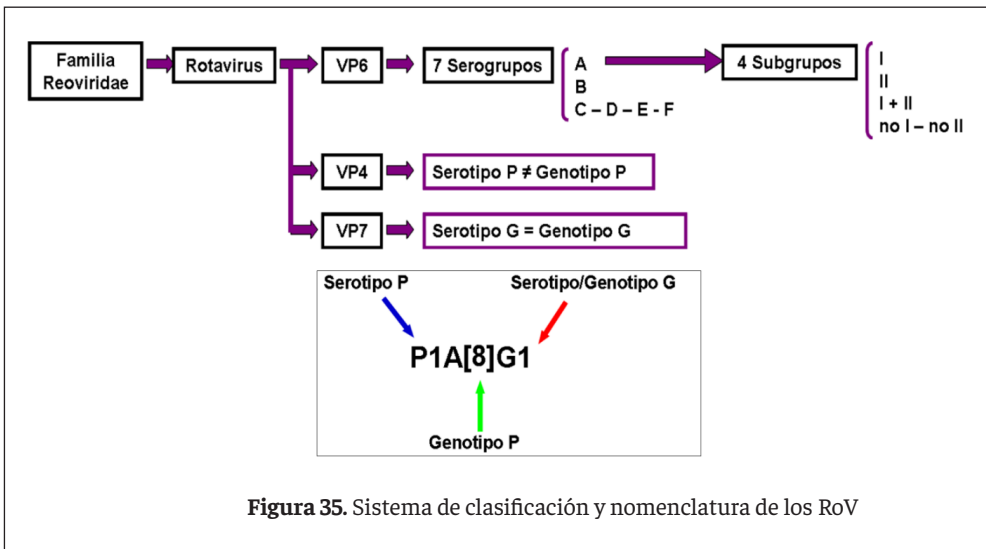


Figura 35. Sistema de clasificación y nomenclatura de los RoV

Hasta el presente en los RoV-A provenientes de distintas especies, se han descrito 27 genotipos G y 37 genotipos P, siendo el tipo G1P[8] el más frecuentemente aislado a partir de muestras humanas. En nuestro país G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8] y G12P[8] han sido los genotipos detectados con mayor frecuencia.

Los métodos de diagnóstico disponibles comercialmente para la detección de RoV en materia fecal son fáciles y rápidos de utilizar y se basan en la detección de antígenos específicos a través de Acs monoclonales o antisueros hiperinmunes. **El diagnóstico de las infecciones por RoV-A se hace habitualmente detectando la presencia de antígeno vírico en muestras de heces, con frecuencia la proteína VP6.** Los formatos de los **métodos inmunológicos** utilizados son EIA convencional (en placa o en tubo), EIA de membrana (*Dot-blot*), aglutinación con látex o inmunocromatografía.

Las **metodologías moleculares** para el diagnóstico de RoV-A en formato RT-qPCR utilizan cebadores específicos del gen que codifica la proteína no estructural NSP3 que permite detectar RoV de serogrupos diferentes. Los kits diagnósticos disponibles en el mercado permiten la detección conjunta de RoV con otros patógenos causantes de diarreas. Estos sistemas o paneles integran la preparación de la muestra, la amplificación, detección y análisis en un sistema único.

9.1.2. ADENOVIRUS ENTÉRICOS (SERTIPOS 40 y 41)

Estos ADV, denominados “fastidiosos” por ser difíciles de cultivar en las líneas celulares habituales, se caracterizan por su marcado tropismo intestinal. Los ADV de los serotipos 40 y 41 constituyen el 59% de los ADV encontrados en las heces y son causantes de 2 a 22% de las diarreas virales en todo el mundo. No presentan un patrón estacional de aparición e infectan más frecuentemente a niños de entre 3 o 4 años. La transmisión es por vía fecal-oral y la diarrea no se acompaña de deshidratación ni de fiebre alta, aunque, a diferencia de RoV, suele ser de mayor duración (4 a 23 días).

El diagnóstico de las infecciones por ADV entéricos se establece habitualmente por detección antigénica mediante EIA, aglutinación de látex o inmunocromatografía o por detección del ADN-ADV40/41 mediante qPCR.

9.1.3. ASTROVIRUS (familia *Astroviridae*)

Son virus no envueltos de unos 35 nm de diámetro y simetría icosaédrica, que poseen genoma ARN monocatenario lineal de polaridad positiva de aproximadamente 7 kb. Producen un 2-8% de las gastroenteritis infantiles en forma de casos esporádicos y brotes de diarrea en comunidades, hospitales y guarderías. También se han asociado de manera importante con diarrea en adultos inmunocomprometidos. La severidad de la enfermedad es menor que RoV y hay un aumento de la incidencia en el invierno.

Se han descrito ocho serotipos, de los que el serotipo 1 es el más común, pero, debido a la existencia de reacciones cruzadas antigénicas, es posible la detección de todos ellos mediante el empleo de Acs específicos de grupo que son capaces de reconocer un epítipo común a todos los serotipos humanos. El diagnóstico puede establecerse por EIA comercial y fundamentalmente por RT-qPCR, lo cual ha permitido aumentar el número de casos detectables y secuenciar el genoma para genotipificar y realizar análisis filogenéticos.

9.1.4. CALICIVIRUS HUMANOS (familia *Caliciviridae*)

Son virus no envueltos de unos 27-40 nm de diámetro y simetría icosaédrica, que poseen genoma ARN monocatenario lineal de polaridad positiva de aproximadamente 8 Kb en cuyo extremo 5' está unido a una proteína VPg y en su extremo 3' tiene un tracto poli(A). Hay 2 géneros que revisten importancia en humanos:

- **género Sapporovirus**: comprende los Saporovirus (SaV)
- **genero Norovirus**: siendo el **virus Norwalk** el virus prototipo. Los Norovirus (NoV) se dividen en 10 genogrupos (GGI a GGX), de los cuales 5 infectan a los humanos (GI, GII, GIV, GVIII y GIX), e incluyen varios *clusters* genéticos. Los virus de los Gs I y GII son los mayormente asociados a brotes de gastroenteritis agudas y, en particular, el genogrupo GII.4 es el de mayor circulación en el mundo. Se ha observado que, en diversos países, la introducción de la vacuna contra RoV modificó la distribución de los enteropatógenos y, particularmente se ha descrito una disminución en la prevalencia de RoV a expensas de un aumento de actividad por NoV.

Debido a su variabilidad genética y a que no producen inmunidad a largo plazo, un individuo puede sufrir varias infecciones por calicivirus durante su vida, sobre todo por NoV. Así, estos últimos afectan a personas de cualquier edad y causan principalmente brotes de gastroenteritis ya que su transmisión está íntimamente relacionada al consumo de alimentos y aguas contaminadas, mientras que los SaV suelen estar asociados a gastroenteritis esporádicas en niños menores de 5 años.

La segunda vía más importante de transmisión de NoV es la ambiental, ésta ocurre cuando alimentos o superficies entran en contacto con aguas o sustancias que contienen partículas viables de NoV. Esto es, ya sea a través del agua usada para consumo humano, o bien por medio del agua empleada en cultivos vegetales, abonos, cultivos de moluscos bivalvos filtradores o en la preparación de los alimentos. Cocinar parcial o totalmente reduce la viabilidad de los NoV, sin embargo, no elimina de forma absoluta las vías de circulación viral de manera que los alimentos pueden contaminarse en cualquier etapa de producción desde el cultivo, transporte, manipulación o preparación

El diagnóstico de estas infecciones se realiza mediante la detección del ARN viral por técnica de RT-qPCR, utilizando distintos pares de oligonucleótidos. La información proporcionada por estos estudios ha permitido reconocer a los calicivirus como la principal causa de gastroenteritis epidémica.

Se han desarrollado sistemas PCR-*multiplex* que permiten identificar los patógenos gastrointestinales más comunes, entre ellos ADV entéricos, Astrovirus, NoV (genogrupos I y II), RoV-A y SaV (I, II, IV y V). Estos paneles integran la preparación de la muestra (heces), la amplificación, la detección y análisis en un sistema único.

9.1.5. ENTEROVIRUS (EV)

Los EV humanos constituyen el género *Enterovirus* de la subfamilia *Ensavirinae* dentro de la Familia *Picornaviridae* según los nuevos criterios del ICTV. Poseen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, que se divide en 4 regiones codificantes de proteínas estructurales y otras 2 regiones no codificantes reguladoras. Sus 4 proteínas estructurales que forman la cápside VP1, VP2, VP3 y VP4 se sintetizan

como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína VPg.

De manera análoga a lo observado con otros virus ARN, los EV exhiben un grado alto de variabilidad genómica, que no es homogénea y varía de acuerdo con la región observada. El género *Enterovirus* se clasifica en especies, las cuales a su vez se subclasifican en diversos serotipos, de acuerdo con la comparación de las secuencias nucleotídicas y la reconstrucción filogenética de la región VP1, que es la que contiene la información específica de serotipo y puede ser usada para la identificación de los EV. Los EV más representativos de este género incluyen: **Poliovirus** (tipo 1,2 y 3), **Coxsackievirus** (tipos A y B) y **Echovirus**.

El ser humano es el único reservorio conocido de los EV y su transmisión es, fundamentalmente, por vía fecal-oral y respiratoria. Se dan casos de transmisión por fómites o moscas, aunque la más frecuente es la vía directa, de persona a persona, existiendo gran número de portadores sanos. Los virus se eliminan por las heces y se pueden detectar en aguas residuales. Pueden presentarse en forma endémica o en brotes epidémicos, siendo más frecuente en verano y otoño, en niveles socioeconómicos bajos y en lactantes y niños.

El virus penetra en el organismo por vía oral o nasofaríngea, con un periodo de incubación que oscila entre 2 y 30-40 días. Se multiplica localmente en el tejido linfóide de la faringe (amígdalas); la resistencia al bajo pH les permite atravesar la barrera ácida estomacal, replicar en las placas de Peyer del intestino delgado y eliminarse por materia fecal. Posteriormente, se disemina por vía sanguínea (viremia primaria) para luego alcanzar otros tejidos diana, como la piel, miocardio, meninges, páncreas, hígado, etc. (viremia secundaria) en donde se replica. Los síntomas pueden ser el resultado directo de la destrucción de células diana en los tejidos (como ocurre en la poliomielitis), o puede deberse a la respuesta inmune frente al virus (como ocurre en el modelo murino de miocarditis por Coxsackievirus B).

La mayoría de las infecciones son controladas por el sistema inmune del paciente, debido a la existencia de anticuerpos neutralizantes y, como consecuencia, no se produce la segunda viremia y el individuo cursa una infección asintomática. Los Acs IgG, IgM e IgA aparecen con bastante rapidez en el curso de la infección. La inmunidad es, predominantemente, humoral, específica de serotipo y duradera (los Acs persisten durante toda la vida).

La clínica de la infección por EV es heterogénea, y puede producir desde infecciones asintomáticas hasta cuadros de parálisis grave, además de meningitis, encefalitis, exantemas, enfermedades cardíacas, conjuntivitis, enfermedad mano-pie-boca, síndromes febriles inespecíficos, diabetes, infecciones respiratorias y herpangina, entre otros.

La confirmación etiológica de una infección por EV es en muchos casos compleja debido a, entre otras cosas, el comportamiento biológico de estos virus, a su epidemiología y a la limitación de los métodos diagnósticos. Si bien se puede demostrar que una persona ha sido infectada con un EV, no siempre se puede concluir que ese virus sea el agente causal de la enfermedad actual. Los síntomas producidos por estos virus son con frecuencia muy poco específicos y, por lo tanto, el diagnóstico inicial de

EV queda relegado hasta que se excluyen otras etiologías. De esta manera, las muestras enviadas al laboratorio son muchas veces inadecuadas ya sea por su incorrecta conservación o por el tiempo transcurrido hasta obtenerlas.

Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas, **la realización de un diagnóstico preciso depende fundamentalmente de la recolección de la muestra adecuada, tomada en tiempo y forma, con respecto al inicio de los síntomas.** Las muestras adecuadas se relacionan con el cuadro clínico y la metodología de elección es la detección del ARN viral por RT-qPCR (**amplificación de la región 5'UTR** que permite detectar a la mayoría de los EV por ser una parte conservada del genoma).

Los métodos de secuenciación del extremo 3' del genoma viral que codifica para la proteína VP1, permiten determinar el serotipo de un aislamiento, su origen y su evolución en la naturaleza.

La detección de Acs IgG tiene más valor para estudios epidemiológicos de seroprevalencia que para el diagnóstico clínico. La detección de Acs IgM específicos se ha utilizado con éxito en el estudio de brotes epidémicos.

Bibliografía

- Lugo R.J., Agustinelli S.P., Sánchez Pascua G.L. Índices de Riesgo en relación a la transmisión de gastroenteritis aguda a partir de alimentos contaminados con Norovirus. *Rev Chil Nutr* [Internet] 2021;48(2): 266-275.
- Troeger C, Khalil IA, Rao PC, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr* 2018;172(10):958-965. Erratum in: *JAMA Pediatr* 2022;176(2):208.
- Du Y, Chen C, Zhang X, et al. Global burden and trends of rotavirus infection-associated deaths from 1990 to 2019: an observational trend study. *Virol J* 2022;19(1):166.
- Degiuseppe JI, Soto MT, Barrios Mathieur C, et al and Red Argentina de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. Enteric viruses other than rotavirus and norovirus in children under 5 years of age with gastroenteritis in Argentina, 2010-2021. A descriptive study. *Arch Argent Pediatr* 2024;122(4):e202310148.
- Degiuseppe JI, Martelli A, Barrios Mathieur C et al. Genetic diversity of rotavirus A in Argentina during 2019-2022: detection of G6 strains and insights regarding its dissemination. *Arch Virol* 2023;168(10):251.
- Amimo JO, Raev SA, Chepngeno J, et al. Rotavirus Interactions With Host Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol* 2021;12:793841.
- Hartman S, Brown E, Loomis E, Russell HA. Gastroenteritis in Children. *Am Fam Physician* 2019;99(3):159-165. Erratum in: *Am Fam Physician* 2019;99(12):732.
- Desselberger U. Viral gastroenteritis. *Medicine (Abingdon)* 2017;45(11):690-694.
- Hung PJ, Chen CC. Diagnostic accuracy of rotavirus antigen tests in children: A systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* 2023;28(2):72-79.
- Meier JL. Viral Acute Gastroenteritis in Special Populations. *Gastroenterol Clin North Am* 2021;50(2):305-322.
- Srivastava P, Prasad D. Human Norovirus Detection: How Much Are We Prepared? *Foodborne Pathog Dis* 2023;20(12):531-544.

Capítulo 10

VIRUS DE IMPORTANCIA REGIONAL

Claudia **Elena**
María Rosa **Marano**
Germán R. **Perez**

10.1. ARBOVIRUS Y SU IMPORTANCIA EN LA SALUD HUMANA

El término **arbovirus** (del inglés “*arthropod-borne viruses*”) se refiere a virus transmitidos por vectores artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas y jejenes) y abarca un grupo diverso de virus que incluye a varias familias y géneros, como los *Orthoflavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus*.

En las Américas, los arbovirus más importantes son el **virus del dengue** (DENV), el **virus Zika** (ZIKV) y el **virus Chikungunya** (CHIKV), todos transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti*, ampliamente distribuido en la región. Otros arbovirus, como el **virus de la fiebre amarilla** (YFV), el **virus del Nilo Occidental** (WNV), y el **virus de la encefalitis de San Luis** (SLEV), así como los alfavirus responsables de la encefalitis equina, tienen una distribución geográfica más limitada. Además, otros arbovirus, como el **virus Oropouche** (OROV) y el **virus Mayaro** (MAYV), han provocado brotes en ciertos países y tienen el potencial de reemerger.

Las enfermedades causadas por arbovirus representan un serio problema de salud pública a nivel mundial, ya que su prevención y control dependen del manejo de los vectores, lo que complica su contención, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. El aumento de casos de infección en América Latina está impulsado por diversos factores ambientales y socioeconómicos. La deforestación, el cambio climático y la expansión urbana crean hábitats ideales para estos vectores, aumentando la interacción entre mosquitos y humanos y, por ende, la transmisión de los arbovirus.

10.2. VECTOR Y MODO DE TRANSMISIÓN DEL DENV, ZIKV y CHIKV

Los mosquitos del género *Aedes*, especialmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, son los principales vectores responsables de la propagación de los virus DENV, ZIKV y CHIKV. Las hembras de *Ae. aegypti* se destacan como los mosquitos vectores más eficientes debido a sus hábitos domésticos, que les permiten satisfacer todas sus necesidades vitales en el entorno humano. Las hembras requieren sangre humana para la reproducción y depositan sus huevos en recipientes que acumulan agua limpia, lo cual es crucial para su control, ya que cualquier objeto que recoja agua de lluvia puede servir para la reproducción del mosquito.

El ciclo de transmisión comienza cuando una persona infectada con el virus, durante el período de viremia es picada por un mosquito vector. En el mosquito, el virus se replica en diversos órganos, incluyendo el tubo digestivo, los ovarios, el tejido nervioso y el cuerpo graso. Posteriormente, el virus se difunde en la cavidad corporal y alcanza las glándulas

salivales, donde se establece una infección persistente. El período de incubación en el mosquito (**período de incubación extrínseca**) es de aproximadamente 8 a 12 días, y el mosquito permanece infectante durante el resto de su vida.

Cuando un mosquito infectado pica a una persona sana, regurgita saliva cargada de virus en la sangre del nuevo hospedero. En los seres humanos, el virus circula libre en el plasma y entra en contacto con células susceptibles (**período de incubación intrínseca**).

DENV, ZIKV y CHIKV se transmiten principalmente por la picadura de mosquitos infectados y siguen un patrón de transmisión similar al descrito. Sin embargo, para DENV se ha documentado la transmisión de persona a persona durante el periodo de viremia a través de la exposición a sangre infectada (transfusiones, lesiones por agujas o accidentes de laboratorio) y a órganos o tejidos infectados (trasplantes).

Una característica distintiva del ZIKV es su capacidad para ser transmitido *verticalmente* de madre a hijo durante el embarazo, lo que puede provocar malformaciones congénitas como la *microcefalia*. La transmisión vertical se ha documentado para DENV y CHIKV, aunque con menor frecuencia en comparación con el ZIKV. Además, el ZIKV puede ser transmitido sexualmente. Las manifestaciones clínicas del CHIKV incluyen síntomas graves como artralgias y fiebre, que pueden durar meses y afectar la calidad de vida del paciente.

El rol del mosquito como vector es crucial en la transmisión de DENV, ZIKV y CHIKV, pero las diferencias en la transmisión vertical, la posibilidad de transmisión sexual y los efectos clínicos específicos de cada virus subrayan la necesidad de una vigilancia epidemiológica y un control vectorial adaptados a cada uno.

En Argentina, el DENV tiene una mayor prevalencia y presenta brotes más frecuentes en comparación con el ZIKV y CHIKV. *Ae. aegypti* es el mosquito vector predominante, y su presencia está bien documentada en todo el país. Sin embargo, la presencia de *Ae. albopictus* como vector ha sido registrada en provincias del norte del país y podría mantener el ciclo del virus en ambientes silvestres, utilizando a los monos como reservorios.

10.3. VIRUS DENGUE (*Orthoflavivirus denguei*)

DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* y se clasifica dentro del género *Orthoflavivirus* (antes denominado *Flavivirus*). Recientemente, el ICTV implementó cambios en la clasificación de esta familia, renombrando algunas especies. Por ejemplo, aunque el nombre del virus del dengue y su abreviatura "DENV" permanecen sin cambios, la especie ahora se denomina *Orthoflavivirus denguei*. De manera similar, el YFV se clasifica como *Orthoflavivirus flavi* y el ZIKV como *Orthoflavivirus zikaense*.

DENV es un virus envuelto con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que se traduce en un precursor polipeptídico el cual es procesado co- y post-traduccionalmente para generar 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Las principales propiedades inmunológicas y antigénicas del DENV están determinadas por la glicoproteína de la envoltura (E) contra la cual se generan los Acs neutralizantes.

DENV circula en 4 serotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que están estrechamente relacionados genéticamente y comparten aproximadamente el 65% de sus genomas, pero son serológicamente distintos. Cada serotipo induce una inmunidad específica de por vida contra el mismo serotipo (homólogo), pero no proporciona inmunidad

cruzada contra los otros serotipos. Todos los serotipos pueden causar una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde infecciones asintomáticas hasta cuadros graves y potencialmente mortales.

10.3.1. CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR DENV (según la OMS)

- **Infección primaria:** se presenta en individuos que están expuestos por primera vez a cualquiera de los serotipos. En esta fase, los títulos de Acs neutralizantes (IgG a-DENV) generalmente no exceden de 1:1280 y son relativamente mono-específicos.
- **Infección secundaria:** en individuos que se infectan por segunda vez con un serotipo diferente al primero. En este caso, los títulos de Acs suelen ser mayores de 1:1280 y son heterólogos, reflejando la presencia de anticuerpos contra múltiples serotipos.

10.3.2. CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LAS FORMAS CLÍNICAS DEL DENGUE (según la OMS)

- **DENGUE:**
 - **Fiebre del Dengue (FD):** enfermedad febril aguda, con síntomas de malestar general, cefalea, dolor retro-ocular y dolor en articulaciones y músculos, y exantemas, sin signos de gravedad.
 - **Casos Graves No Clasificados Como Dengue Grave:** pacientes con síntomas severos pero que no cumplen todos los criterios para ser considerados como Dengue Grave.
- **DENGUE GRAVE:** cuando se cumple al menos uno de los siguientes criterios: *extravasación grave de plasma* (shock hipovolémico o distrés respiratorio por acumulación de líquidos en el pulmón), *hemorragias graves* (sangrados severos) o *afectación de órganos* (hepatitis, encefalitis, miocarditis, etc).
 - **Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD):** caracterizada por hemorragias, trombocitopenia y aumento del hematocrito debido a la pérdida de plasma.
 - **Síndrome de Shock por Dengue:** se presenta con signos de shock hipovolémico (piel fría, pulso débil e hipotensión) debido a la extravasación de líquidos.
 - **Otras Complicaciones Graves:** incluye afectaciones severas de órganos como encefalitis, miocarditis, hepatopatía e insuficiencia renal aguda.

La clasificación actual facilita la identificación y el manejo clínico del dengue, abordando las limitaciones de la clasificación anterior que era demasiado rígida y dependía en gran medida de resultados de laboratorio. Este enfoque ayuda a garantizar una atención más adecuada y oportuna para todos los casos, reflejando mejor la variedad de presentaciones clínicas y mejorando la comunicación entre profesionales de la salud.

10.3.3. ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS. Se debe tomar la *muestra de suero* tan pronto como sea posible después de la aparición de la enfermedad. Los ensayos que se realizarán dependerán del momento de su recolección (Figura 36).

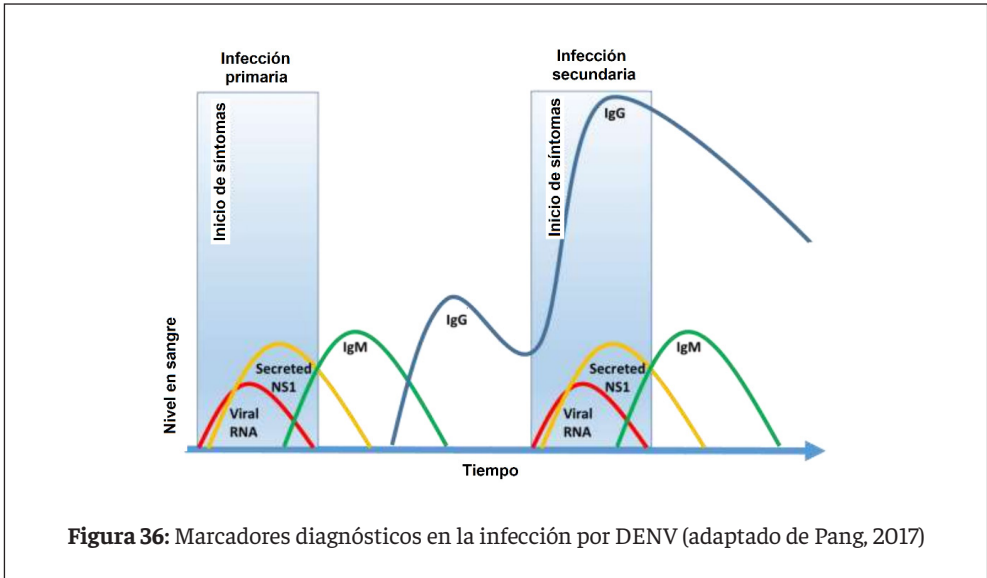


Figura 36: Marcadores diagnósticos en la infección por DENV (adaptado de Pang, 2017)

MUESTRAS DE FASE AGUDA (6 días o menos de aparición de la fiebre). La viremia por DENV coincide con la aparición de los síntomas en pacientes con infección en fase aguda (Figura 36), por lo que los **métodos directos** son los de elección.

- **Detección del ARN-DENV:** en general se realiza por métodos de amplificación basados en RT-qPCR cualitativas que amplifican un gen conservado sobre la región 5'UTR del virus (sin realizar la distinción de serotipo). Se dispone de ensayos que permiten la detección y genotipificación simultánea del DENV así como también de ensayos *multiplex* que permiten la detección simultánea y diferenciación de los arbovirus DENV, ZIKV y CHIKV.
- **Detección del Ag NS1:** la glicoproteína no estructural NS1 ha demostrado ser un biomarcador muy útil en el diagnóstico temprano. Durante la infección, una forma hexamérica de NS1 se libera y se acumula en suero en altas concentraciones. Se encuentran disponibles comercialmente equipos basados en EIA o IC con valores predictivos positivos mayores al 85% en la mayoría de los países endémicos, donde los síndromes febriles por dengue alcanzan hasta un 30% del total de los casos.
- **Aislamiento Viral (solo en laboratorios de referencia):** se emplean células Vero (células de mono verde africano) o células de mosquito C6/36 que son inoculadas con la muestra de suero a investigar. La presencia del DENV se evidencia a través de la observación del efecto citopático sobre el cultivo celular y se confirma a los 10 días post-inoculación con Acs específicos de serotipo por IFI.

MUESTRAS DE FASE CONVALESCIENTE (7 días o más de aparición de la fiebre). En este período se utilizan **métodos indirectos**, para el cual se requiere una mues-

tra de suero en la etapa de convalecencia obtenida al menos 6 días después de la fecha de comienzo de los síntomas. En infecciones primarias, a los dos días de la disminución de la fiebre, se demostró el incremento de Acs IgM a-DENV en prácticamente todos los pacientes, con un pico en la respuesta aproximadamente a las dos semanas. En infecciones no primarias, la respuesta de Acs IgM es variable, en algunas ocasiones está ausente o es muy baja, pero existe un marcado incremento de los Acs IgG.

- **Detección de Acs IgM a-DENV:** se realiza mediante ensayos basados en EIA o IC con elevada sensibilidad y especificidad que permiten detectar los Acs IgM a partir del 5° día del comienzo de los síntomas, permaneciendo en suero hasta 3 meses. La presencia de los Acs IgM a-DENV indica infección reciente y no es indicativo de una infección primaria ya que también son detectados en una infección secundaria (Figura 36). Esta prueba presenta reacción cruzada con otros arbovirus como WNV, SLE y YFV, por lo que es conveniente revisar los antecedentes clínicos del paciente, historial reciente de viaje y vacunación (especialmente contra la Fiebre Amarilla).
- **Detección de Acs IgG a-DENV:** permiten establecer si un individuo estuvo en contacto con DENV. No se recomienda su detección en muestra única para el diagnóstico de dengue en fase aguda. Suele ser útil, en caso de estudiar **muestras pareadas** (una muestra en fase aguda y otra muestra en fase convalescente): si el título de Acs IgG se mantiene entre las muestras, se confirma la infección primaria, mientras que si el título de Acs IgG se incrementan (en general, unas 4 veces), se confirma la infección secundaria.
- **Prueba de neutralización por reducción de placas (solo en laboratorios de referencia):** permite la detección de Acs IgG neutralizantes a-DENV y es considerada de gran utilidad en estudios epidemiológicos por su elevada especificidad lo que permite identificar el serotipo causante de una infección. La prueba se basa en el principio de que los Acs neutralizantes presentes en la muestra de suero del paciente inactivan el virus para que pierda su capacidad de infectar y reproducirse en las células *target*. Se requieren de *muestras pareadas* de sueros en los casos sospechosos de la enfermedad, así como destreza en su ejecución.

10.3.4. CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO Y SELECCIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de dengue requiere considerar la **situación epidemiológica** de la región, y el **momento entre el inicio de los síntomas y la toma de la muestra**. Por lo tanto:

- Si la muestra es obtenida entre los 0 y 3 días de evolución desde el inicio de la fiebre, se deben utilizar métodos directos como Ag NS1, ARN-DENV o aislamiento viral (solo en laboratorios de referencia).
- Si la muestra es obtenida entre los 4 y 6 días de evolución desde el inicio de la fiebre, se deben combinar un método indirecto (Acs IgM) con un método directo como Ag NS1, ARN-DENV o aislamiento viral (solo en laboratorios de referencia).
- Si la muestra es obtenida con 7 o más días de evolución desde el inicio de la fiebre, se deben utilizar métodos indirectos de detección de Acs IgM a-DENV o prueba de neutralización (solo en laboratorios de referencia).

10.3.5. VACUNAS CONTRA EL DENGUE

En abril de 2023, la vacuna **QDENG**[®] (**TAK-003**) del laboratorio Takeda fue aprobada en Argentina por la ANMAT para personas entre 4 y 60 años, con un esquema de 2 dosis separadas por 3 meses y administrada por vía subcutánea. Esta vacuna se comercializa en nuestro país desde octubre de 2023. La vacuna se basa en la cepa viva atenuada DENV-2 PDK-53 caracterizada molecularmente sobre la que se diseñaron otros 3 virus quiméricos recombinantes utilizando su estructura principal, pero con sustitución de los genes prM y E de DENV-2 por los de DENV-1, DENV-3 y DENV-4.

La vacuna **Butantan-DV** es una vacuna *candidata* monodosis que genera protección frente a los 4 serotipos del DENV, producto de la colaboración del Instituto Butantan (Brasil) con NIH (EE. UU.). Se componen de virus atenuados DENV-1, DENV-3, DENV-4 y un virus quimérico que contiene los genes que codifican las envolturas del DENV-2. La atenuación se ha logrado generando un DENV recombinante que se modifica por delección o quimerización antigénica entre 2 DENV relacionados usando las 2 estrategias siguientes:

- introducción de una mutación atenuante por delección de 30 nucleótidos ($\Delta 30$) en 3'UTR de DENV-1 y DENV-4
- sustitución de proteínas estructurales de la candidata a vacuna rDENV-4 $\Delta 30$ atenuada por aquellas de DENV-2 o DENV-3.

10.4. VIRUS ZIKA (*Orthoflavivirus zikaense*)

El ZIKV, al igual que DENV, pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Orthoflavivirus*. Ambos virus tienen un genoma de ARN de sentido positivo que se traduce en una poliproteína, la cual se procesa en 3 proteínas estructurales (cápside, precursor de la membrana y envoltura) y 7 proteínas no estructurales. A pesar de estas similitudes, existen diferencias en las funciones específicas de algunas proteínas.

10.4.1. MODO DE TRANSMISIÓN DEL ZIKV

Además de la **transmisión vectorial** a través de mosquitos infectados (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*), el ZIKV puede ser transmitido por otras vías:

- **Transmisión congénita:** se ha confirmado la presencia de ARN-ZIKV en el líquido amniótico de mujeres embarazadas y en tejidos fetales, así como en cerebros de neonatos con microcefalia que fallecieron poco después del nacimiento. Además, algunos neonatos pueden ser virémicos hasta 4 días después del nacimiento, sugiriendo una posible *transmisión intraparto*. El período embrionario (aproximadamente hasta la semana 9 de edad gestacional) se considera como el de mayor riesgo. En Brasil, se confeccionó un registro de 35 niños con microcefalia. Todas las madres habían vivido o visitado las zonas de transmisión de ZIKV durante el embarazo, y el 72% informó de una enfermedad eruptiva durante el mismo.

- **Transmisión sexual:** ZIKV puede persistir en el semen durante períodos prolongados, lo que plantea un riesgo para la transmisión sexual. Se está investigando cuánto tiempo permanece el virus en los fluidos sexuales y su potencial de transmisión a parejas sexuales. El uso consistente de preservativos puede reducir este riesgo.
- **Transmisión transfusional:** se han reportado casos durante el brote en la Polinesia Francesa, donde el 2,8% de los donantes de sangre resultaron positivos para ZIKV, y algunos informaron síntomas compatibles con fiebre por ZIKV después de la donación. Estos casos destacan la necesidad de una vigilancia rigurosa en el suministro de sangre para prevenir la transmisión del virus.

10.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL ZIKA

El ZIKV suele causar síntomas como fiebre baja, erupción cutánea, dolor muscular, conjuntivitis y dolor de cabeza. La infección durante el embarazo está asociada con malformaciones neurológicas en el feto, como la microcefalia.

El ZIKV ha ganado atención por su expansión global y su asociación con trastornos neurológicos. Como **virus neurotrópico**, afecta las células nerviosas y tejidos del sistema nervioso central, llevando a complicaciones como la microcefalia en lactantes y el síndrome de Guillain-Barré en adultos. El virus ataca las células progenitoras neurales, esenciales para el desarrollo cerebral, interrumpiendo su división y diferenciación, lo que conduce a anomalías del desarrollo y microcefalia. Además, el ZIKV puede dañar neuronas y células gliales, causando inflamación y respuestas inmunitarias que agravan el daño.

ZIKV también se replica en varios tipos de células cerebrales, generando respuestas proinflamatorias que atraen células inmunitarias al sitio de infección, causando más daño a las estructuras cerebrales. Algunos estudios sugieren que el virus se une a receptores específicos en las células progenitoras neurales, activando vías de señalización que inducen la muerte celular y bloquean la división y diferenciación celular.

10.4.3. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Dado que los síntomas iniciales de la infección por ZIKV pueden pasar desapercibidos, suele perderse la oportunidad para la toma de la muestra adecuada. El algoritmo diagnóstico propuesto indica:

- **Detección de ARN-ZIKV cualitativa** por RT-qPCR en:
 - Muestras de *suero* o *LCR* entre los días 1 a 6 de inicio de síntomas
 - Muestras de *orina* hasta los 20 días de comienzo de síntomas
 - Muestras de *placenta* o *leche materna* ante sospecha de transmisión vertical
- **Detección de Acs IgM α -ZIKV** por métodos de ELISA en *suero* o *LCR* de más de 5 días de inicio de síntomas. En caso de positividad, se debe confirmar en una segunda muestra de suero tomada de 10 a 14 días de la primera muestra mediante prueba de neutralización por reducción de placas (en laboratorios de referencia).

10.5. VIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

CHIKV pertenece al género *Alphavirus* (grupo del Nuevo Mundo) dentro de la familia *Togaviridae* cuyo nombre proviene del idioma Makonde (hablado en el sudeste de Tanzania) y significa “*aquel que se encorva*”. CHIKV es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que codifica 2 poliproteínas que se subdividen en 4 proteínas no estructurales (NSP1-4) y 5 proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1). En la superficie del virión, E1 y E2 forman heterodímeros que se trimerizan para constituir las espículas virales. E2 es crucial para la unión al receptor, mientras que E1 facilita la fusión de la membrana.

10.5.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE CHIKV

CHIKV infecta múltiples tipos celulares, incluyendo células dendríticas, macrófagos, fibroblastos sinoviales, células endoteliales y miocitos. También infecta osteoblastos, lo que contribuye a la patología articular y a la enfermedad erosiva observada en pacientes con artritis crónica. La infección por CHIKV se presenta como una enfermedad febril autolimitada conocida como **Fiebre Chikungunya** (CHIKF), caracterizada por un dolor articular severo y mialgia, síntomas que pueden persistir durante semanas e incluso meses. En una proporción baja de casos, pueden ocurrir manifestaciones graves como las complicaciones neurológicas (encefalitis, meningitis) y síndrome de Guillain-Barré. Además, se han documentado casos fatales.

Generalmente, el período de incubación es de 3 a 7 días (rango: 1 a 12 días). Casi el 30% de las personas infectadas pueden no desarrollar síntomas y, en su lugar, adquirir inmunidad permanente.

Durante la fase aguda, los síntomas más comunes incluyen fiebre alta (>39°C), escalofríos, dolor de cabeza, fotofobia y erupción petequeal o maculopapular. Los síntomas articulares afectan a menudo múltiples articulaciones, especialmente manos y muñecas, aunque pueden observarse en articulaciones mayores (rodillas, hombros y columna). Durante el período febril, CHIKV presenta una viremia significativamente más alta en comparación con otros arbovirus, siendo la carga viral un buen predictor de gravedad de la enfermedad. Los síntomas suelen remitir en 7 a 10 días, con mejoría general y disminución del dolor articular.

La afectación articular discapacitante puede extenderse por 2 y 3 meses del inicio de la enfermedad (**forma subaguda de CHIKF**) o persistir por más de 3 meses hasta 2 - 3 años (**forma crónica de CHIKF**), principalmente en adultos mayores (>65 años).

10.5.2. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Se debe sospechar de infección por CHIKV cuando hay epidemiología compatible asociada a la triada de *fiebre, artralgias y erupción cutánea*. El algoritmo diagnóstico propuesto se basa en el momento de obtención de la muestra con relación a la fecha de inicio de los síntomas e indica:

- Si la muestra es obtenida entre los 0 y 8 días de evolución desde el inicio de la fiebre, se deben utilizar **métodos directos** como detección del ARN-CHIKV o aislamiento viral (solo en laboratorio de referencia). Un resultado positivo confirma la infección. Un resultado negativo requiere de una nueva muestra de más de 8 días de evolución desde el inicio de síntomas para la detección de Acs IgM a-CHIKV.
- Si la muestra es obtenida con 9 o más días de evolución desde el inicio de la fiebre, se deben utilizar **métodos indirectos** de detección de Acs IgM a-DENV. Un resultado negativo descarta la infección. Un resultado positivo requiere confirmación por prueba de neutralización (solo en laboratorios de referencia) que detecta Acs IgG a-CHIKV a partir de una nueva muestra obtenida entre los 10 a 15 días de evolución de los síntomas.

10.6. ROBOVIRUS

Los **robovirus** (del inglés, *rodent-borne viruses* o “virus transmitidos por roedores”) pertenecen al género *Orthohantavirus* de la familia *Hantaviridae* (**Hantavirus**) y al género *Mammarenavirus* de la familia *Arenaviridae* (**Arenavirus**). Estos virus, cuyo reservorio natural son los *roedores*, pueden ocasionalmente transmitirse a los humanos, causando diversas enfermedades zoonóticas, incluidas brotes reemergentes de fiebre hemorrágica en humanos, como la FHA causada por el **virus Junín**.

10.6.1. HANTAVIRUS (ORTHOHANTAVIRUS)

Los hantavirus son virus esféricos (diámetro de 120-160 nm) cubiertos por una envoltura lipídica en cuya superficie se encuentran espículas formadas por las glicoproteínas Gn y Gc. Dentro de la envoltura, las nucleocápsides contienen la proteína N y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Su genoma se compone de 3 segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa:

- *segmento L*: codifica la RdRp.
- *segmento M*: codifica un precursor de glicoproteínas que se divide en Gn y Gc.
- *segmento S*: codifica la proteína N que protege el ARN viral. En algunos hantavirus, también codifica una proteína no estructural (NS) que inhibe la producción de interferón en las células del hospedador.

Las regiones no traducidas (UTR) de los segmentos genómicos están conservadas y son complementarias, formando estructuras que facilitan la replicación y transcripción del ARN viral.

10.6.1.1. HOSPEDEROS Y TRANSMISIÓN AL SER HUMANO. Los hantavirus se mantienen y transmiten a través de diversos reservorios de pequeños mamíferos como murciélagos, musarañas y topos y, en particular, *roedores* de las subfamilias *Arvicolinae* y *Murinae* en Eurasia y, *Neotominae* y *Sigmodontinae* en América del Norte y del Sur.

Cada especie de roedor hospedador puede estar infectada de manera persistente y asintomática, eliminando el virus a través de su saliva, orina y heces, lo que permite la transmisión entre roedores. El virus se aerosoliza y puede ser inhalado por el ser

humano. La transmisión al humano generalmente ocurre al ingresar en el hábitat de los roedores, especialmente en áreas peri-domiciliarias de zonas suburbanas o rurales, y durante actividades laborales o recreativas. Esta transmisión es también común en espacios cerrados como galpones o depósitos infestados. En menor medida, otras posibles vías de contagio incluyen el contacto con excrementos o secreciones de ratones infectados a través de las mucosas conjuntival, nasal o bucal, o mediante la mordedura del roedor infectado. Además, existen evidencias epidemiológicas y virológicas de *transmisión persona a persona* en relación con el **hantavirus Andes Sur** (ANDV) en la Patagonia Argentina, lo que hace que las secreciones y otros fluidos humanos deben considerarse potencialmente peligrosos durante la atención de pacientes con infección por hantavirus.

10.6.1.2. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA. Los hantavirus están distribuidos en distintas regiones geográficas y asociados con diversos reservorios hospedadores, lo que influye en la epidemiología y las estrategias de prevención de las enfermedades que causan. *Actualmente, se conocen más de 50 especies de hantavirus, de las cuales al menos 24 especies pueden causar enfermedades en humanos.* Los hantavirus se clasifican en 2 grupos principales según su distribución geográfica, los roedores que los albergan y las variaciones en la gravedad de las enfermedades que suelen provocar:

- **Virus del Viejo Mundo:** virus asociados con roedores presentes principalmente en Europa y Asia (como *Myodes glareolus* y *Apodemus flavicollis*) y al *Síndrome Renal con Fiebre Hemorrágica (HFRS)*. La rata salvaje (*Rattus norvegicus*), un roedor del Viejo Mundo, también se encuentra en áreas urbanas de América del Norte.
 - **Hantaan orthohantavirus (HNTV)** es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica coreana, una forma severa de la HFRS que ha causado numerosas epidemias en la región.
 - **Seoul orthohantavirus (SEOV)**, aunque menos virulento que HNTV, sigue siendo una amenaza en áreas urbanas debido a su asociación con ratas domésticas (*Rattus spp.*) y su distribución mundial.
 - **Puumala orthohantavirus (PUUV)** y **Dobrava-Belgrado orthohantavirus (DOBV)** causan HFRS en Europa, siendo DOBV el más virulento con una tasa de letalidad aproximada del 10%.
- **Virus del Nuevo Mundo:** virus asociados con roedores presentes en América del Norte y del Sur (como *Peromyscus maniculatus* y *Oligoryzomys longicaudatus*) y asociados al *Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS)*. En América, se reconocen más de 20 especies de hantavirus cada una asociada a un reservorio natural específico. Entre ellos se encuentran:
 - **Sin Nombre orthohantavirus (SNV)**, identificado en 1993 como el agente causante de un brote de HCPS en la región de *Four Corners* (EE.UU.). Se ha identificado en áreas donde está presente su hospedador natural (*Peromyscus maniculatus*: ratón ciervo) abarcando gran parte de América del Norte. Presenta una letalidad estimada en 35%.

- **Andes orthohantavirus** comprende al ANDV identificado en Argentina en 1995 y se encuentra en varias regiones endémicas de nuestro país junto a diversas variantes asociadas tales como **virus Andes Orán** (ORNV), **virus Andes Bermejo** (BERV), **virus Andes Buenos Aires** (BAV – nombrado antes como HU39694), **virus Andes Juquitiba** (JUQV), **virus Andes Lechiguanas** (LECV) y **virus Andes Central Plata** (CPV).

El ANDV se ha reportado también en Chile, donde se encuentra en el ratón pigmeo (*Oligoryzomys longicaudatus*) y en el ratón de pastizal de pelo largo (*Abrothrix longipilis*). El ANDV es el *único hantavirus con transmisión documentada de persona a persona* y posee una tasa de letalidad del 25%-37%.

- **Laguna Negra orthohantavirus** comprende al **virus Laguna Negra** (LNV) cuyo reservorio es la laucha de campo (*Calomys laucha*) y se ha detectado en la región noroeste de Argentina, Paraguay y Bolivia.

Si bien las infecciones por hantavirus tienen una baja incidencia, son de importancia para la salud pública por su mortalidad, por el riesgo de la presentación de brotes y por el hecho de que no existe un tratamiento específico, por lo que es imprescindible adoptar ciertas medidas de prevención en las áreas donde viven roedores hospederos.

10.6.1.3. PATOGÉNESIS. Los hantavirus, al ingresar por el tracto respiratorio, infectan principalmente las células endoteliales microvasculares, diseminándose a casi todos los órganos principales. *La infección no causa daño celular directo, pero altera funciones críticas de las células endoteliales*, como la integridad de la barrera vascular y la regulación del tono capilar. Esto puede llevar a una fuga capilar, un mecanismo clave en la patogénesis del HCPS o HFRS que, si bien son entidades separadas, comparten varias características:

- fuerte inflamación y afectación de las células endoteliales vasculares, comportándose como enfermedades sistémicas.
- pueden conducir a la insuficiencia renal.
- casi todos los pacientes con HCPS y más del 50% de los pacientes con HFRS presentan síntomas respiratorios, incluyendo hipoxia y hallazgos radiológicos en radiografías de tórax y/o tomografías computarizadas.

10.6.1.4. FASES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus	Síndrome Renal con Fiebre Hemorrágica
Fase Prodrómica	Fase Febril
<ul style="list-style-type: none"> • Inicio abrupto con fiebre (>38.5°C), astenia, escalofríos, y mialgias. • Síntomas compatibles con abdomen agudo. • A menudo sin síntomas respiratorios superiores. • Laboratorio: presencia blastos (> 10%), trombocitopenia, leucocitosis (>12.000) con desviación a la izquierda, y una velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG) normal o ligeramente elevada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Comienza con fiebre alta, mialgias, dolor abdominal y de espalda. • Dura en promedio 7 días y se caracteriza por una fuerte inflamación, trombocitopenia, y anomalías en la coagulación. • La fuga vascular puede llevar a hipotensión, petequias, epistaxis, menorragia, metrorragia y sangrado gastrointestinal.
Fase Cardiopulmonar	Fase Hipotensiva
<ul style="list-style-type: none"> • Edema pulmonar que puede progresar rápidamente (4 a 24 horas), causando distrés respiratorio. Puede evolucionar a un shock con hipotensión y oliguria. • Laboratorio: plaquetopenia, aumento del hematocrito, leucocitos normales o marcada leucocitosis (>25.000/mm³), hiponatremia, acidosis metabólica, hipoprotrombinemia, aumento del KPTT, creatinina, LDH, CPK, AST/ALT y amilasa. • La estabilización hemodinámica y respiratoria durante las primeras 48 hs de tratamiento, reducen la mortalidad del 60-70% al 20%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipotensión severa, a menudo asociada a shock, que puede durar desde pocas horas hasta 48 horas.
Fase Diurética	Fase Oligúrica
<ul style="list-style-type: none"> • Rápida eliminación del edema pulmonar y la resolución del shock y la fiebre. • Diuresis espontánea. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se caracteriza por insuficiencia renal y oliguria, que puede durar de 3 a 10 días. • Puede asociarse con hipertensión, edema pulmonar y síntomas oculares.
	Fase Diurética
	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida eliminación del edema pulmonar y la resolución del shock y la fiebre. • Diuresis espontánea.
Fase de Convalecencia	Fase de Convalecencia
<ul style="list-style-type: none"> • Duración hasta 2 meses. • Recuperación completa para la mayoría de los pacientes. • Se puede experimentar trastornos visuales, hipoacusia, debilidad muscular extrema y persistencia de miocarditis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Duración hasta 2 meses. • Recuperación completa para la mayoría de los pacientes. • Se puede experimentar trastornos visuales, hipoacusia, debilidad muscular extrema y persistencia de miocarditis.

10.6.15. DEFINICIÓN DE CASO Y DIAGNÓSTICO. La identificación temprana del caso es crucial para mejorar las posibilidades de supervivencia mediante la aplicación oportuna de medidas de apoyo. Por lo tanto, *la detección debe realizarse preferentemente en la fase prodrómica de la enfermedad.*

Se debe considerar la infección por hantavirus en *cualquier paciente que presente fiebre > 38°C de origen desconocido, acompañada de mialgias, escalofríos, astenia, cefalea o dolor abdominal, especialmente si ha tenido contacto con roedores silvestres en las 6 semanas anteriores al inicio de los síntomas.* En áreas endémicas, se debe considerar la infección por hantavirus en *cualquier paciente con un síndrome febril inespecífico.*

Ante un caso sospechoso, al mismo tiempo que se notifica el caso se debe proceder a la toma de muestras para el diagnóstico de laboratorio, incluyendo un **hemograma**. Se solicitará una **radiografía de tórax** como apoyo al diagnóstico y **análisis de orina** en caso de sospecha de síndrome renal.

Ante el caso de un paciente con **hematocrito elevado, trombocitopenia, leucocitosis con desviación a la izquierda, presencia de linfocitos atípicos, infiltrados pulmonares, saturación de oxígeno < 90% y/o proteinuria, albuminuria, hematuria y cilindros hemáticos y leucocitarios** se procede a la confirmación del caso mediante el diagnóstico virológico por:

- **Detección del ARN viral en suero/coágulo:** están basados en reacciones de RT-qPCR, y permiten detectar el genoma viral entre los 7-10 días luego de la aparición de síntomas (*fase prodrómica/febril*) cuando la viremia es alta. El producto de amplificación puede secuenciarse para identificar el hantavirus involucrado por análisis filogenéticos.
- **Detección de Acs IgM o seroconversión de Acs IgG:** estos ensayos EIA suelen utilizar 3 antígenos de hantavirus (Gn, Gc y N) que son los que pueden inducir altos títulos de Acs IgM específicos en el paciente y ser detectables desde el inicio de los síntomas.

Entre los 3 y 6 meses, los títulos de Acs IgM específicos declinan y aparecen los Acs IgG específicos que permanecen elevados por años y persisten de por vida.

La HFRS y el HCPS deben diferenciarse, especialmente en la fase prodrómica, de otras enfermedades febriles presentes en la zona geográfica. Estas incluyen leptospirosis, neumonías atípicas con infiltrados bilaterales, sepsis con síndrome de dificultad respiratoria aguda, endocarditis con edema pulmonar e influenza. La fiebre y la trombocitopenia pueden ser causadas por una variedad de infecciones como el dengue, el síndrome de fiebre grave con trombocitopenia (SFTS), otros arbovirus, septicemia y rickettsias. Las infecciones por hantavirus pueden simular un abdomen agudo u otras enfermedades febriles gastrointestinales como la fiebre tifoidea. En mujeres embarazadas, el dolor abdominal, los problemas urinarios, la hipertensión y el bajo recuento de plaquetas que pueden estar presentes en las infecciones por hantavirus deben diferenciarse del síndrome HELLP (hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, trombocitopenia) y otras complicaciones del embarazo.

10.6.1.6. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN. El tratamiento se enfoca en el manejo efectivo del shock y la insuficiencia pulmonar y/o renal. En presencia de insuficiencia renal, es crucial iniciar diálisis rápida para manejar adecuadamente la acumulación de toxinas y el desequilibrio de líquidos.

Una hidratación inadecuada puede agravar el edema pulmonar. La hipertensión debe ser controlada rigurosamente para prevenir hemorragias intracraneanas. La administración temprana (primeros 4 días de la enfermedad) de Ribavirina intravenosa ha demostrado ser eficaz en reducir la morbilidad y mortalidad.

Teniendo en cuenta el modo de transmisión de infección por hantavirus por inhalación de aerosoles provenientes de las heces, orina y saliva de roedores infectados, las medidas tendientes a evitar el contacto del ser humano con los roedores y sus excretas han demostrado ser las más eficaces. Se deben extremar las medidas de control tendientes a minimizar el riesgo de infestación por roedores, tanto en las viviendas como en los ambientes de trabajo y evitar el contacto de las personas con el reservorio y los ambientes contaminados por sus excretas. Las medidas deben ser reforzadas en inmuebles ubicados en la interfase de áreas rurales y silvestres.

10.6.2. ARENAVIRUS (MAMMARENAVIRUS)

Los arenavirus son virus envueltos pleomórficos (80 a 150 nm) con apariencia granulosa o “arenosa” en microscopía electrónica la cual se debería a ribosomas atrapados en el virión derivados del hospedador. Esto llevó al nombre de la familia (latín *arenosus*: arenoso). Los *mammarenavirus* tienen genomas ARN *bi-segmentados*, y cada segmento codifica 2 proteínas en orientaciones opuestas (*ambisentido*):

- *segmento S* codifica la proteína de la nucleocápside (NP) y el complejo de la glicoproteína (GPC). GPC es cortado por proteasas celulares en 3 subunidades (GP1, GP2 y un péptido señal estable: SSP), que permanecen unidas para formar el complejo de glicoproteína madura (GPC). GP2 está involucrada en la fusión viral y es crucial para la entrada en las células hospedadoras.
- *segmento L* codifica la RdRP (L) y una proteína de unión a zinc o matriz (Z). Los marcos de lectura abiertos en cada segmento están separados por una región intergénica no codificante que se predice que se pliega en estructuras de tallo-bucle.

10.6.2.1. HOSPEDEROS Y TRANSMISIÓN AL HUMANO. Los arenavirus son un grupo de virus que causan infecciones crónicas en roedores nativos de Europa, África, América, y posiblemente otros continentes. Estos roedores portan el virus de manera crónica y asintomática, eliminándolo a través de la saliva, orina y sangre. La *transmisión entre roedores* ocurre tanto *horizontalmente* (entre roedores de la misma generación) como *verticalmente* (de madres a crías).

Los seres humanos adquieren la enfermedad principalmente por la *inhalación de aerosoles* provenientes de las excretas de roedores infectados, que es la vía

más común de transmisión. También puede ocurrir al entrar en contacto con estas excretas a través de pequeñas excoriaciones en la piel o mucosas, o entre personas a través del contacto directo con secreciones de personas infectadas, especialmente durante la fase hemorrágica de la enfermedad. La transmisión de persona a persona es poco común. Las infecciones en humanos pueden desencadenar enfermedades graves como fiebres hemorrágicas.

10.6.2.2. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA. Se distinguen 2 complejos de **arenavirus** según la clasificación serológica y la distribución geográfica, respaldados a nivel filogenético:

- **arenavirus del viejo mundo** (AOW) se encuentran en roedores africanos de la familia *Muridae* y en roedores asiáticos de diversas especies de *Rattus* y *Mus*, así como en musarañas (*Suncus murinus*). Dentro de este complejo se encuentran:
 - **virus de la coriomeningitis linfocitaria** (LCMV), frecuentemente usado para estudiar respuestas inmunitarias antivirales, está distribuido en todo el mundo en ratones comunes (*Mus spp.*), y puede provocar una enfermedad leve en personas inmunocompetentes.
 - **virus Lassa** (LASV), responsable de causar fiebres hemorrágicas severas en humanos, se distinguen 4 linajes establecidos que están ampliamente distribuidos en África Occidental, con 3 linajes adicionales propuestos que han surgido recientemente.
- **arenavirus del nuevo mundo** (ANW) infectan roedores de la familia *Cricetidae*, con la excepción del **virus Tacaribe** que infecta murciélagos *Artibeus*. Las distintas especies forman 4 clados bien definidos:
 - los clados A, B y C están distribuidos en América Latina y el Caribe, y se mantienen en roedores de la subfamilia *Sigmodontinae*.
 - el clado D se han encontrado en América del Norte y se mantienen en roedores reservorios de la subfamilia *Neotominae* de la familia *Cricetidae*.

Este complejo incluye miembros altamente patógenos que causan fiebres hemorrágicas en América del Sur, como el **virus Junín** (JUNV) en Argentina, el **virus Machupo** (MACV) y el **virus Chapare** (CHAPV) en Bolivia, el **virus Guanarito** (GTOV) en Venezuela y el **virus Sabia** (SABV) en Brasil.

10.6.3. FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

El JUNV, causante de la **fiebre hemorrágica argentina** (FHA), conocida localmente como *mal de los rastros* o *mal de O'Higgins*, es endémico en las zonas agrícolas del norte-centro de Argentina. El principal reservorio del JUNV es el roedor *Calomys musculinus*, que presenta alta densidad en los campos de cultivo, junto con *Calomys laucha* y *Akodon azarae*. Durante la década de 1950, las prácticas agrícolas intensivas favorecieron la expansión descontrolada de estos roedores, lo que coincidió con los primeros brotes de FHA. Inicialmente, el área afectada por la enfermedad cubría menos de 16.000 km² en el noroeste de la provincia de Buenos Aires, con una población en riesgo estimada en 270.000 habitantes. Con el paso de los años,

el área endémica se expandió a aproximadamente 150.000 km², abarcando una población en riesgo estimada en 5.000.000 de habitantes. Esta área incluye el noroeste de la provincia de Buenos Aires, el sureste de la provincia de Córdoba, el sur de la provincia de Santa Fe y el noreste de la provincia de La Pampa.

Los brotes de FHA han sido influenciados por cambios en la gestión de cultivos, un aumento en la población de roedores y una mayor exposición humana a estos reservorios. Las áreas agrícolas de Buenos Aires, especialmente donde se cultivan maíz, soja y girasol, han experimentado ciclos de población de roedores que contribuyen a los brotes.

La epidemiología de FHA revela una serie de patrones significativos en su incidencia y distribución. La enfermedad afecta a los hombres cuatro veces más que a las mujeres, debido a la mayor exposición ocupacional a los reservorios de roedores. Es notablemente más prevalente en áreas rurales en comparación con las urbanas.

Se distinguen distintos escenarios de transmisión de la FHA:

- **Escenario Clásico:** incluye el *área endémica tradicional*, coincidiendo geográficamente con la zona núcleo del complejo agroindustrial cerealero de exportación del país, en donde, el lugar de residencia y el de contagio se encuentran dentro de este territorio.
- **Escenario Emergente:** los afectados residen y se contagian fuera del área endémica sin haber viajado en las 3 semanas previas a enfermar. Estas áreas representan nuevos focos de transmisión.
- **Escenario Reemergente:** son áreas históricas de transmisión donde no se habían notificado casos en los últimos 10 años, pero donde la enfermedad ha vuelto a surgir.
- **Escenario Viajero:** describe los casos de individuos que han transitado por zonas clásicas o emergentes-reemergentes pero no residen en ellas. Aquí se incluyen tanto viajeros como trabajadores que migran estacionalmente o transitan de manera eventual para desempeñar labores vinculadas al complejo agroindustrial.

10.6.3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FH. La FHA es una enfermedad viral aguda grave, con un período de incubación de 1 a 2 semanas y un inicio insidioso. Aunque todas las fiebres hemorrágicas virales tienen un comienzo similar, la interacción específica entre el virus y el hospedador determina la evolución de la enfermedad. La respuesta inmune del hospedador es clave para controlar la infección. Aunque el mecanismo exacto de la hemorragia y el aumento de la permeabilidad vascular no se comprende del todo, se ha observado que el virus puede invadir directamente el endotelio vascular. La secreción de citoquinas por los macrófagos podría contribuir a los cambios circulatorios asociados a un peor pronóstico.

Los síntomas iniciales incluyen fiebre, decaimiento, pérdida de apetito y cefalea, acompañados de mialgias, lumbalgias, dolor retroocular, mareos, epigastralgia,

náuseas y vómitos. En algunos casos, se presentan sangrados leves como epistaxis y gingivorragias. No se observan manifestaciones catarrales ni signos broncopulmonares. Durante la 1ª semana, son comunes el enrojecimiento facial, erupciones cutáneas y petequias, además de síntomas oculares como inyección conjuntival y edema periorbitario. También pueden presentarse bradicardia relativa, hipotensión postural y síntomas neurológicos como irritabilidad, somnolencia, temblor fino y ataxia moderada. No se observan hepatomegalia ni esplenomegalia.

Durante la 2ª semana de la enfermedad, se observa una mejoría en el 70-80% de los pacientes. Sin embargo, en el 20-30% restante, pueden aparecer manifestaciones hemorrágicas o neurológicas severas, shock o complicaciones bacterianas.

Se distinguen 3 formas clínicas de la enfermedad: leve, común y grave, con esta última subdividida en formas hemorrágicas, neurológicas o mixtas.

La convalecencia es prolongada, durando entre 1 y 2 meses. Durante este período, los pacientes pueden experimentar astenia, hipoacusia, trastornos de la memoria, irritabilidad y pérdida transitoria del cabello.

La mortalidad por FHA sin tratamiento es del 20-30%. Sin embargo, con un tratamiento adecuado, como la administración de plasma de convaleciente dentro de los primeros 8 días desde el inicio de los síntomas, la mortalidad se reduce al 1%.

10.6.3.2. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN. La FHA es una enfermedad de denuncia obligatoria y de notificación inmediata al SISA ante caso sospechoso. El JUNV puede ser difícil de diagnosticar precozmente debido a la similitud de sus síntomas con otras enfermedades febriles.

Se debe considerar como **caso sospechoso** de infección por JUNV: *paciente con síndrome febril inespecífico dentro del área endémica o con visita a la misma en las 3 semanas previas*. Se debe solicitar Hemograma con plaquetas, Eritrosedimentación y Análisis de orina.

Durante la 1ª semana de infección, se observa una progresiva leucopenia y trombocitopenia, pudiéndose encontrar proteinuria, hematuria y sedimento urinario con cristales hialinos y granulares, así como glóbulos rojos. Ante un CASO SOSPECHOSO (leucocitos $\leq 4.000/\text{mm}^3$ y plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$) o CASO PROBABLE (leucocitos $\leq 2.500/\text{mm}^3$ y plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$) se debe administrar plasma inmune (3.500 UT/Kg) dentro de los 8 días de iniciada la enfermedad lo que disminuye la letalidad del 30% al 1%.

La confirmación del diagnóstico mediante estudios virológicos se realiza en Laboratorios de Referencia y pretende lograr 2 objetivos:

- Confirmar o descartar el diagnóstico de FHA en todos los casos notificados.
- Generar información sobre las personas que tienen Acs a-JUNV para incluirlos como potenciales donantes de plasma inmune para el tratamiento.

La detección de Acs IgM e IgG a-JUNV mediante EIA son útiles para confirmar infecciones recientes como pasadas. Sin embargo, la interpretación de los resultados puede ser complicada debido a la persistencia a largo plazo de los Acs IgG en individuos que han sido previamente infectados. Esto puede generar dificultades en la

diferenciación entre infecciones actuales y pasadas. Se recomienda el uso de *muestras pareadas de suero* para demostrar seroconversión: una 1° muestra tomada durante el período agudo (antes de la transfusión de plasma inmune) y una 2° muestra en la fase de convalecencia (entre 30 y 60 días después).

La detección del ARN-JUNV por métodos de RT-qPCR es el método más eficiente para detectar el virus en etapas tempranas. Sin embargo, una prueba negativa no descarta el diagnóstico, y el tratamiento debe basarse en la evaluación clínica temprana. Otra opción es el aislamiento viral por cultivo en un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad.

La principal medida preventiva para la FHA es la **vacunación de la población del área endémica de esta enfermedad**. *Candid#1* es una vacuna a virus vivo atenuado y altamente eficaz que se aplica en una única dosis y forma parte del Programa Nacional de Inmunizaciones desde el año 2007. Su desarrollo es el resultado de un proyecto internacional que involucró al Ministerio de Salud de la Nación, al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH-ANLIS), a la OPS y al *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*. La inmunogenicidad de la vacuna *Candid#1* fue superior al 95%, medida por detección de Acs neutralizantes. Los Acs vacunales se detectan a partir del día 15 a la vacunación y para el día 60, más del 90% de los receptores ya habrá desarrollado su respuesta inmune. Aunque la introducción de la vacuna viva atenuada *Candid#1* en la década de 1990 ha reducido drásticamente el número de casos, la FHA no está erradicada. En 2018, se reportaron solo 13 casos confirmados, frente a los 400-500 casos anuales registrados antes de 1992. A pesar de la disminución de casos, se han reportado infecciones recientes en Córdoba en julio de 2022, lo que subraya la necesidad de mantener estrictas medidas de control. Las condiciones que deben reunir las personas que deseen vacunarse son:

- residir o desarrollar actividades en las localidades de las 4 provincias donde se han presentado casos de FHA en los últimos años.
- hombres y mujeres mayores de 15 años (no deben estar embarazadas o amamantando).
- no haber recibido vacuna *Candid#1* anteriormente ni otras vacunas y/o gammaglobulinas en el mes previo ni recibirlas en el mes posterior.
- no presentar cuadros agudos o crónicos descompensados, ni estar recibiendo corticoides sistémicos o presentar cuadros de inmunosupresión.

Bibliografía

- Morales A, Fabbri C. Estado actual del diagnóstico de Dengue, Chikungunya, Zika y otros arbovirus en Argentina. *Actualizaciones en SIDA e Infectología* 2016;24(93):111-117.
- OPS. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. [Internet]. Washington, D.C, 2022. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56321>.
- OPS. Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos de dengue. [Internet], 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/sites/default/files/2023-12/denvalgoritmo-deteccion-por-laboratorio2023sp.pdf>.
- Soni S, Gill VJS, Anusheel, Singh J, Chhabra J, Gill GJS, Bakshi R. Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. *Cureus* 2023;15(7):e41717.
- Santos LLM, de Aquino EC, Fernandes SM, Ternes YMF, Feres VCR. Dengue, chikungunya, and Zika virus infections in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Rev Panam Salud Publica* 2023;47:e34.
- Costa BKD, Sato DK. Viral encephalitis: a practical review on diagnostic approach and treatment. *J Pediatr (Rio J)* 2020;96 Suppl 1(Suppl 1):12-19.
- Kok BH, Lim HT, Lim CP, Lai NS, Leow CY, Leow CH. Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Res* 2023;324:199018.
- Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis* 2017;215(suppl_2):S89-S95.
- Pang J, Chia PY, Lye DC, Leo YS. Progress and Challenges towards Point-of-Care Diagnostic Development for Dengue. *J Clin Microbiol* 2017;55(12):3339-3349.

Capítulo 11

ONCOGÉNESIS VIRAL

Germán R. **Perez**
Diego **Chouhy**

11.1. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES CARCINÓGENOS

La *International Agency for Research on Cancer* (IARC), dependencia de la OMS, desarrolla monografías en las cuales se clasifican diversos agentes de acuerdo con su potencial carcinógeno para los seres humanos y los animales. Un agente es definido como *carcinógeno* si produce un incremento en la incidencia de neoplasias malignas, ya sea reduciendo su tiempo de latencia o incrementando su gravedad o su capacidad de multiplicación.

La IARC clasifica en 4 grupos a los compuestos o factores físicos, basándose en pruebas científicas existentes sobre carcinogénesis:

- **Grupo 1 - carcinógeno para el ser humano:** hay pruebas suficientes que confirman que puede causar cáncer a los seres humanos.
- **Grupo 2A - probablemente carcinógeno para el ser humano:** hay pruebas suficientes de que puede causar cáncer a los seres humanos, pero actualmente no son concluyentes.
- **Grupo 2B - posiblemente carcinógeno para el ser humano:** hay algunas pruebas de que puede causar cáncer a los seres humanos, pero de momento están lejos de ser concluyentes.
- **Grupo 3 - no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano:** actualmente no hay ninguna prueba de que cause cáncer a los seres humanos.
- **Grupo 4 - probablemente no carcinógeno para el ser humano:** hay pruebas suficientes de que no causa cáncer a los seres humanos.

Según el IARC, aproximadamente el 12% (2.300.000 casos nuevos) de los cánceres mundiales en 2020 fueron atribuibles a agentes infecciosos que incluyen bacterias, virus y parásitos, con una distribución geográfica diferente entre los países de ingresos bajos y altos. Tras los hallazgos epidemiológicos y biológicos, la IARC clasificó como **agentes biológicos del Grupo 1** a los siguientes virus:

- **virus de la hepatitis B** (HBV)
- **virus de la hepatitis C** (HCV)
- **virus del papiloma humano de alto riesgo** (HPV-AR) – varios tipos.
- **virus de Epstein-Barr** (EBV)
- **herpesvirus humano tipo 8** (HHV-8)
- **virus linfotrópico de células T humanas tipo 1** (HTLV-1)

El **virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1** (HIV-1) se incluye también en el Grupo 1 por tener un papel cancerígeno indirecto, debido al mayor riesgo de cáncer

como consecuencia de la supresión inmunitaria inducida por el virus en personas infectadas.

Cabe destacar que, en 2018, cerca del 64% de los cánceres atribuibles a infecciones estaban relacionados con virus: HPV, HBV, HCV y EBV.

Los **virus oncogénicos humanos del Grupo 1**, a pesar de sus diferencias biológicas y estructurales, comparten rasgos comunes:

- son una causa necesaria para el desarrollo del cáncer, pero no la única.
- establecen infecciones persistentes y han desarrollado estrategias para evadir las respuestas inmunitarias del hospedero, que son cruciales para eliminar las infecciones virales. Algunos surgen predominantemente en el contexto de inmunosupresión del hospedero, inflamación crónica o antecedentes genéticos del hospedero.

11.2. VIRUS ONCOGÉNICOS CON GENOMA ARN

Los virus oncogénicos con genoma ARN inducen la transformación celular y la inmortalización a través de diferentes mecanismos. En el caso de los retrovirus animales:

- suelen portar oncogenes de origen celular o interfieren con los oncogenes celulares.
- pueden promover la transformación celular expresando proteínas accesorias capaces de activar genes celulares que promueven la proliferación o previenen la apoptosis.

Se distinguen 3 mecanismos de oncogénesis por retrovirus:

- **transducción de oncogenes:** donde los retrovirus pueden capturar secuencias celulares e incorporarlas a sus genomas que luego se expresan como oncogenes virales en otras células. Aquí, la poliadenilación del genoma viral es ineficiente, lo que permite que las secuencias celulares se empaqueten en viriones. Durante la transcripción inversa, estas secuencias se pueden incorporar al genoma viral. Este mecanismo no ha sido descrito en seres humanos.
- **cis-activación:** donde los retrovirus que actúan en *cis* pueden activar los oncogenes mediante mutagénesis insercional (proceso en el que el ADN viral se integra cerca de un protooncogén de la célula hospedera). Este proceso es lento y requiere una extensa replicación e integración viral. La integración retroviral (provirus) puede estimular la actividad del oncogén mediante la inserción de un promotor o causar translocaciones cromosómicas, que pueden conducir a la transformación celular.
- **trans-activación:** donde los retrovirus transportan elementos (genes que codifican proteínas) que activan genes celulares (que promueven el crecimiento y la supervivencia celular), desregula el ciclo celular (que puede provocar inestabilidad genómica e inmortalización celular), interrumpe la apoptosis (que puede provocar la supervivencia y la proliferación celular) y/o induce inestabilidad genómica.

Entre los retrovirus, el HTLV-1 es el único virus oncogénico para los humanos y está implicado en el desarrollo de la leucemia/linfoma de células T del adulto (LLTA). Si bien el mecanismo preciso detrás de la patogénesis aún no está claro, las proteínas virales **tax** y **HBZ** juegan un rol importante en la tumorigénesis:

- *proteína tax*: activa vías de señalización celular, induce la producción de citocinas proinflamatorias, participa en el inicio de la transformación neoplásica, etc.
- *proteína HBZ*: promueve la proliferación de células T, induce la producción de CCL21 y CCR4 en células infectadas, desempeña un papel en el mantenimiento de las células leucémicas, regula la transcripción 5'UTR del HTLV-1, etc.

A diferencia del HTLV-1, el HCV ejerce indirectamente su efecto oncogénico causando principalmente inflamación, fibrosis y cirrosis, con un riesgo significativamente mayor de desarrollar hepatocarcinoma.

11.3. VIRUS ONCOGÉNICOS CON GENOMA ADN

Los virus oncogénicos de genoma ADN poseen proteínas virales necesarias para la replicación viral que puede interferir y perturbar vías celulares cruciales, lo que puede conducir al desarrollo del cáncer. Estas proteínas virales con actividad transformadora (*oncoproteínas*) pueden afectar a proteínas celulares cuya actividad supresora de tumores es esencial para prevenir la transformación celular.

A continuación se describen los virus con genoma de ADN oncogénicos más relevantes y sus mecanismos carcinogénicos asociados:

- **EBV** fue el primer virus oncogénico descrito (1964) por científicos británicos quienes encontraron partículas virales en células tumorales cultivadas derivadas de un cáncer linfático de Burkitt. EBV activa distintas vías de señalización por acción de sus proteínas. *LMP1* es una de las principales oncoproteínas virales que imitan la vía de señalización del receptor CD40, siendo esencial para la transformación de células B a través de la activación de múltiples vías celulares, como las cascadas NF- κ B, JNK y p38. *LMP2A* actúa como un homólogo funcional del receptor de células B (BCR) promoviendo la supervivencia de las células B y siendo absolutamente necesaria para la transformación del crecimiento de las células B derivadas del centro germinal del ganglio que son negativas al BCR. A diferencia de la *LMP1*, la *LMP2A* no causa ningún efecto adverso en la maduración de las células B a través de la activación de la vigilancia inmunitaria.
- **HHV-8**, también conocido como *Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi* (KSHV), es el agente causal de varias neoplasias: sarcoma de Kaposi (KS), linfoma de derrame primario (PEL) y enfermedad de Castleman multicéntrica (MCD). Los oncogenes virales desempeñan un papel central en la infección y la oncogenicidad. KSHV puede codificar oncoproteínas virales durante su fase de latencia (*LANA*, *vCyclin* y *vFLIP*) y durante su fase lítica (*vGPCR*, *vBcl-2*, *vIL-6*, *vIRF 1/vIRF 3*, *K1*, *K15* y *vPK*).
- **HBV**, al igual que HCV, actúa principalmente a través de un mecanismo carcinogénico indirecto al inducir inflamación crónica y daño hepático. Sin embargo, HBV también expresa proteínas con actividad transformadora, como la proteína *HBx*, que contribuye a su persistencia y pueden aumentar aún más el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma.
- **HPV**: La asociación entre ciertos genotipos de HPV y cánceres humanos fue descubierta hace unos 40 años por Harald zur Hausen quien recibió el Premio Nobel de Medicina en 2008. Los **HPV** son virus sin envoltura con una cápside icosaédrica

que encierra un genoma de ADN bicatenario y pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Se han identificado filogenéticamente más de 200 genotipos según la secuencia nucleotídica del gen L1 que codifica para la proteína de la cápside principal. El genoma prototipo del HPV16 consta de:

- una *región temprana* (E) que codifica proteínas reguladoras (E6, E7, E1, E2, E4 y E5) que están involucradas en la oncogénesis viral, la transcripción, la replicación y la liberación del virión.
- una *región tardía* (L) que codifica las proteínas estructurales principales (L1) y secundarias (L2) de la cápside viral.
- una *región de control larga* o *región reguladora ascendente* (URR).
- una *región no codificante* que contiene todos los elementos reguladores para la transcripción y el origen de la replicación viral.

Los HPV son virus heterogéneos que muestran un tropismo distinto por los epitelios:

- **HPV cutaneotrópicos:** forman parte de la flora normal de la piel, se transmiten por contacto casual piel a piel con una persona infectada o al compartir un objeto: La mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente en 1 a 2 años; se asocian a Cáncer de Piel No Melanoma en un grupo particular de individuos.
- **HPV mucosotrópicos:** infectan las superficies húmedas del cuerpo, como el cuello uterino, la vagina, la vulva, el pene, el ano, la boca y la garganta. Se transmiten por las relaciones sexuales vaginales, anales u orales, por contacto íntimo entre mucosas. Se clasifican en 2 grandes grupos:
 - *HPV de bajo riesgo oncogénico* (HPV-BR): rara vez causan cáncer (se encuentran en el Grupo 3 de la clasificación de la IARC), aunque algunos tipos pueden causar verrugas en genitales, ano, boca o garganta o en la zona circundante. Los más prevalentes son HPV6 y HPV11.
 - *HPV de alto riesgo oncogénico* (HPV-AR): causan varios tipos de cáncer (se encuentran en el Grupo 1 de la clasificación de la IARC). Se reconocen 12 tipos de HPV-AR: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58 y HPV59. Los más prevalentes son HPV16 y HPV18.

Las *proteínas tempranas E6 y E7 de los HPV-AR* han sido reconocidas como *oncoproteínas* ya que desempeñan un papel clave en la promoción de la carcinogénesis al dirigirse e inactivar proteínas celulares esenciales.

p53 es un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en la prevención de la carcinogénesis mediante la activación de las respuestas al daño del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis. La *oncoproteína E6 de los HPV-AR* se une a la p53 a través de la *proteína E6AP* (proteína asociada a E6) ocasionando la ubiquitinación de p53 y consecuentemente degradándola a través de la vía del proteasoma. Esto determina una pérdida de la actividad supresora tumoral con la consiguiente alteración de las vías celulares y una progresión hacia un fenotipo maligno de las células infectadas.

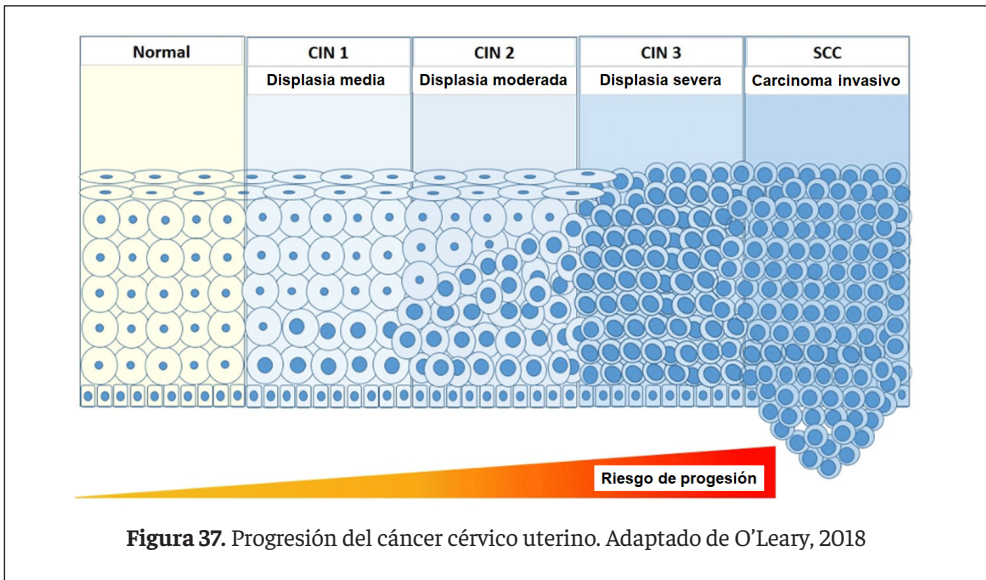
La *oncoproteína E7* es una fosfoproteína ácida que se une a la proteína supresora de tumores pRb, la cual tiene un papel central en el control del ciclo celular a través de la regulación negativa de la transición de G1 a S durante la división del ciclo celular. En las células infectadas por HPV-AR, la interacción E7-pRb conduce a la degradación de pRb a través de la vía ubiquitina-proteasoma. Esto posteriormente activa los factores de transcripción E2F con la progresión a la fase S del ciclo celular, la disregulación de la proliferación celular y la expresión de factores pro-proliferativos.

En general, la característica principal de los cánceres asociados a HPV es la expresión continua de E6 y E7, que es necesaria para el establecimiento y mantenimiento del fenotipo maligno. *Para que esto suceda, es esencial que exista una infección persistente por HPV.*

Casi todos los casos de carcinomas de células escamosas de cuello uterino (CCU) y anal son atribuibles a los HPV, mientras que la fracción informada de cánceres de vulva y pene relacionados con el HPV es menor. A nivel mundial, los HPV-AR son responsables de aproximadamente el 4,5% de los cánceres humanos.

La infección por HPV-AR es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en todo el mundo, y la mayoría de las infecciones (70% a 90%) se eliminan por la respuesta inmunitaria del hospedero en un plazo de 1 a 2 años. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o pueden dar lugar al desarrollo de lesiones transitorias (LSIL: *lesión intraepitelial escamosa de bajo grado*), que son eliminadas rápidamente por el sistema inmunitario. En una minoría de los casos (hasta el 10%) esto no ocurre y la infección puede volverse persistente lo que conduce al desarrollo de lesiones premalignas (HSIL: *lesión intraepitelial escamosa de alto grado*). Estas HSIL pueden luego retroceder o progresar hacia un carcinoma invasivo (Figura 37).

La persistencia del HPV puede conducir a la integración accidental del ADN-HPV en el genoma celular, lo cual puede determinar la pérdida de algunos genes virales (por ejemplo, E1 y E2). E2 es un represor transcripcional de E6 y E7, y su pérdida por disrupción del gen al integrarse el virus, conduce a la desregulación de E6 y E7 promoviendo la carcinogénesis. Por otro lado, la pérdida de E1 podría dar una ventaja de crecimiento selectivo y promover la expansión clonal. Las tasas de integración genómica del HPV aumentan con la gravedad de las lesiones cervicales, siendo superiores al 80% en el CCU. Se ha descubierto que HPV-18 está integrado en el 100% de los casos.



La principal estrategia de prevención del CCU es la vacunación. Las vacunas profilácticas consisten en la proteína L1 recombinante autoensamblada en VLPs libres de genoma que inducen Acs neutralizantes séricos:

- Cervarix® (GlaxoSmithKline): vacuna bivalente dirigida a HPV16 y HPV18.
- Gardasil® (Merck & Co): vacuna tetravalente contra HPV6, HPV11, HPV16 y HPV18.
- Gardasil 9® (Merck & Co): vacuna nonavalente que se dirige a 9 genotipos: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 y HPV58.

Todas ellas resultaron eficaces para reducir las infecciones virales anogenitales, así como las lesiones premalignas y malignas.

Además de la vacunación, para reducir la incidencia del CCU es necesaria una estrategia de prevención secundaria que consiste en programas de cribado basados en una prueba de ADN-HPV-AR, citología cervical (prueba de Papanicolau: *identifica células anormales entre las células exfoliadas del cuello uterino*) y un triaje de mujeres que han dado ADN-HPV-AR positivo para identificar y tratar las lesiones cervicales.

Las directrices actuales recomiendan como **prueba primaria la detección del ADN-HPV-AR** por ensayos moleculares debido a la alta sensibilidad para identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar lesiones cervicales de alto grado (HLSIL o \geq CIN2+) y CCU.

A diferencia del CCU, no existen pautas internacionales bien definidas para la detección del cáncer anal, de pene y de cabeza y cuello asociados a infección por HPV-AR.

Bibliografía

- Galati L, Chiantore MV, Marinario M, Di Bonito P. Human Oncogenic Viruses: Characteristics and Prevention Strategies-Lessons Learned from Human Papillomaviruses. *Viruses* 2024;16(3):416.
- Bangham CRM. HTLV-1 persistence and the oncogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2023;141(19):2299-2306.
- Luo Y, Liu Y, Wang C, Gan R. Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):93.
- Saha A, Robertson ES. Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *J Virol* 2019;93(13):e00238-19.
- Lopes AO, Marinho PDN, Medeiros LDS, de Paula VS. Human Gammaherpesvirus 8 Oncogenes Associated with Kaposi's Sarcoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(13):7203.
- Schiller JT, Lowy DR. An Introduction to Virus Infections and Human Cancer. *Recent Results Cancer Res* 2021;217:1-11.
- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 2014;15(3):266-82.
- O'Leary JJ, White C, Spillane C et al. Cervical screening: A new way forward (tests of risk and tests of disease). *HRB Open Res* 2018;1:3. DOI: <https://doi.org/10.12688/hrbopenres.12794>

Diagnóstico en Virología

Textos provistos por el autor

UNR EDITORA

EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Secretaría de Extensión Universitaria

Urquiza 2050 - S2000AOB / Rosario - República Argentina

www.unreditora.unr.edu.ar